

Mellina Damasceno Rachid Santos

***Desenvolvimento de método cromatográfico
(HPLC-UV) para a determinação de ácidos
fenólicos extraídos por ultra-som de
forrageiras tropicais***

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Co-orientador: Dr. Jailton da Costa Carneiro

JUIZ DE FORA

2009

Dedico aos meus pais,
ao Luiz Mário e a
todos que me
incentivaram.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Auxiliadora, por ter me dado essa grande oportunidade de trabalhar e aprender com ela. Agradeço pela amizade, incentivo, paciência e atenção, além dos conselhos que valerão para minha vida profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Renato Camargo Matos, sempre disposto a ajudar e com o qual também aprendi muito, agradeço pelas boas conversas, atenção e apoio.

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

Aos professores do Departamento de Química pelos ensinamentos, contribuindo para a minha formação profissional.

Aos funcionários Fernando, Serginho, Mariângela, Gedair, Simone e Alice.

À Aline pela amizade, companhia e colaboração em algumas etapas deste trabalho. Aos amigos Vanézia, Luís e Pollyana que também estavam sempre dispostos a me ajudar, pelas discussões proveitosas e pelas conversas descontraídas. Da mesma forma, agradeço também ao Rafael, Michele, Diego, Adriana, Fernando, Rômulo e João.

Aos amigos Vivi e Rogério pelo carinho, conselhos e boas conversas.

Aos meus pais, Tomé e Marília, por acreditarem na minha capacidade, pelo amor incondicional, paciência e apoio. Ao Luiz Mário, pelo amor, cumplicidade, incentivo e compreensão.

Aos demais amigos e colegas que estiveram ao meu lado durante essa caminhada e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fapemig e PROPESQ/UFJF pelo apoio financeiro.

RESUMO

O desempenho dos bovinos em regime de pastejo pode ser melhorado com o aumento da digestibilidade da forrageira. Os ácidos p-cumárico e ferúlico estão associados aos componentes da parede celular através de ligações éster ou éter, podendo influenciar negativamente na digestibilidade das forrageiras. O presente trabalho propõe uma metodologia de extração com ultra-som e separação por HPLC dos ácidos ferúlico, p-cumárico, m-cumárico, o-cumárico, cafeico e ácido chiquímico, e a quantificação dos ácidos ferúlico e p-cumárico éster ligados em forrageiras tropicais. A metodologia de análise foi desenvolvida em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção absorciométrica no UV e coluna de fase reversa C-18. Composição e pH da fase móvel, programação dos comprimentos de onda de detecção foram parâmetros estudados na otimização do método. No estudo da composição da fase móvel, foram testados diferentes solventes orgânicos e soluções aquosas em diferentes valores de pH, onde a melhor condição foi obtida com eluição isocrática usando como fase móvel acetonitrila/metanol/solução aquosa H₃PO₄ pH 2,05 (13:12,5:74,5). A fim de se diminuir o tempo do processo de tratamento das amostras, foi estudada a extração empregando o ultra-som, que se mostrou um processo mais rápido e reprodutível se comparado com a extração em banho ultratermostático. Foi feita a avaliação do método aplicando padronização externa e padronização interna. A padronização interna usando o ácido m-cumárico como padrão *surrogate* e o ácido o-cumárico como padrão interno, produziu bons resultados, dentre eles limites de detecção de 0,09 e 0,04 mg/L para os ácidos p-cumárico e ferúlico, respectivamente, e valores de recuperação que variaram de 83 a 99 %. Sendo assim, a metodologia implementada foi aplicada a análise de 43 amostras de forrageiras, fornecidas pela Embrapa Gado de Leite, de quatro espécies: *Cynodon nlemfuenses* cv. Florona, *Cynodon dactylon* cv. Florakirk, *Panicum maximum* cv. Mombaça e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Foram analisadas as frações caule e folha, cujas faixas de valores encontrados foram de 3,63 a 9,04 mg/g peso seco para o ácido p-cumárico e 3,35 a 7,69 mg/g peso seco para o ácido ferúlico.

Palavras-chave: Forrageiras. Ácidos fenólicos. Ultra-som. HPLC.

ABSTRACT

Livestock performance can be improved by increasing the digestibility of forage. The p-coumaric acid and ferulic acid are associated with the components of the cell wall by linking ester or ether, which can negatively influence the digestibility of forage. This paper proposes a method for ultrasound based extraction and separation by HPLC for ferulic acid, p-coumaric acid, m-coumaric acid, o-coumaric acid, caffeic acid and shikimic acid, and quantification of ferulic acid and p-coumaric acid ester linked to cell wall in samples of tropical forages. The method of analysis was optimized in a high performance liquid chromatography with UV-VIS detector MWD and a reverse-phase column C-18. Composition and pH of the mobile phase and wavelengths of detection were parameters studied in the optimization of the method. In the study of the composition of mobile phase were tested various organic solvents and aqueous solutions at different pH values, where the best condition was obtained with isocratic elution using as mobile phase acetonitrile / methanol /H₃PO₄ pH 2.05 (13:12 , 5:74,5). In order to reduce the time in the processing of samples, the extraction was studied using the ultrasound, where it proved to be a more rapid and reproducible compared to the bath with programmed temperature. Was the assessment of method applying external calibration and internal calibration. As the internal calibration using the o-coumaric acid as internal standard and the m-coumaric acid as surrogate standard showed good results, including detection limits of 0.09 and 0.04 mg / L for p-coumaric acid and ferulic acid, respectively, and the recovery values ranging from 83 to 99%, we chose to quantify the samples using this method. Thus, the optimized methodology was applied to 43 samples of forage (supplied by Embrapa Gado de Leite) of four species: *Cynodon nlemfuensis* cv. Florona, *Cynodon dactylon* cv. Florakirk, *Panicum maximum* cv. Mombaça and *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. We analyzed stem and leaves of these samples, the range of values found was from 3.63 to 9.04 mg / g dry weight for the p-coumaric acid and 3.35 to 7.69 mg / g dry weight to ferulic acid.

KEYWORDS: Forage. Phenolic acids. Ultrasound. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Esquema de formação dos álcoois precursores da lignina adaptado de Soest (1994) por Santana <i>et al.</i> (2006).....	17
FIGURA 1.2	Estruturas dos ácidos fenólicos estudados.....	19
FIGURA 2.1	Esquema do preparo das soluções trabalho para o teste de estabilidade das soluções padrão. FM*: ACN / MeOH / solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5).....	30
FIGURA 2.2	Esquema de representação da extração branda em banho ultratermostático dos ácidos fenólicos.....	32
FIGURA 3.1	Gráficos da influencia do pH no tr, na área e na simetria dos ácidos eluídos com FM composta por solução de ácido ou tampão e MeOH.....	42
FIGURA 3.2	Aplicação do método de desenvolvimento triangular para a separação dos quatro ácidos. Cromatogramas da mistura padrão dos ácidos 10,00 mg/L. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm), fluxo de 1mL/min, detecção em 236nm e em diferentes FM.....	44
FIGURA 3.3	Cromatograma da mistura padrão dos seis ácidos na concentração de 20,00 mg/L. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm); FM: ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); fluxo: 1mL/min; pressão de trabalho 110 bar.....	45
FIGURA 3.4	Cromatogramas da mistura padrão dos seis ácidos na concentração de 20,00 mg/L. A - Sobreposição dos sinais registrados em 236nm e 316nm. B - Cromatograma obtido após a leitura com programação de comprimento de onda. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm); FM: ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5);Fluxo: 1mL/min.....	47

FIGURA 3.5	Cromatogramas do teste de estabilidade das soluções padrões. A: solução A; B: solução B; C: solução C; D: solução D; E: solução E; F: solução F. FM: ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); Fluxo: 1mL/min.....	50
FIGURA 3.6	Cromatogramas da mistura padrão dos seis ácidos na concentração de 6,00 mg/L diluída em fase móvel na data da injeção, solução intermediária diluída em fase móvel e solução estoque diluída em metanol. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm); FM: ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); Fluxo: 1mL/min.....	51
FIGURA 3.7	Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos ferúlico e p-cumárico obtidas da extração em ultra-som de 25,0 mg de Mombaça folha.....	52
FIGURA 3.8	Gráficos do fator de resposta dos ácidos chiquímico, cafeico, ferúlico, p-cumárico, m-cumárico e o-cumárico por padronização externa.....	54
FIGURA 3.9	Curvas analíticas por padronização externa obtidas para a injeção em triplicata da mistura padrão dos ácidos chiquímico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, m-cumárico e o-cumárico nas concentrações 0,00; 3,00; 6,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mg/L.....	56
FIGURA 3.10	Cromatograma obtido para amostra Mombaça folha fortificada com os ácidos chiquímico (5,00 mg/L), cafeico (2,00 mg/L), m-cumárico (3,70 mg/L) e o-cumárico (3,00 mg/L) para estabelecimento do LD e LQ. FM: ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); Fluxo: 1mL/min.	58
FIGURA 3.11	Cromatogramas da réplica 1 da amostra <i>Cynodon</i> . FM: ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5), fluxo: 1mL/min, detecção: a) 236nm, b) 286nm, c) 316nm.	59

FIGURA 3.12	Cromatogramas dos resultados da recuperação da extração no banho: a) branco; b) branco fortificado com 10,00 mg/L de cada ácido; c) amostra <i>Cynodon</i> ; d) amostra <i>Cynodon</i> fortificada com 10,00 mg/L de cada ácido. FM: ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5), fluxo: 1mL/min.....	60
FIGURA 3.13	Curvas das médias de concentração obtida para cada nível de fortificação de cada ácido no ultra-som versus no banho..	62
FIGURA 3.14	Gráfico com os percentuais de recuperação obtidos para a amostra, amostra fortificada e branco fortificado utilizando padrões interno e <i>surrogate</i>	64
FIGURA 3.15	Esquema de representação para a extração das amostras de forrageiras em ultra-som para a quantificação dos ácidos fenólicos por padronização interna.....	65
FIGURA 3.16	Gráficos de fator de resposta dos ácidos chiquímico, cafeico, ferúlico e p-cumárico por padronização interna.....	67
FIGURA 3.17	Curvas analíticas por padronização interna obtidas para a injeção em triplicata da mistura padrão dos ácidos chiquímico, cafeico, p-cumárico e ferúlico nas concentrações 0,00; 3,00; 6,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mg/L...	68
FIGURA 3.18	Gráfico com os percentuais de recuperação obtidos para a amostra, amostra fortificada e branco fortificado utilizando padronização interna e externa.....	72
FIGURA 3.19	Concentrações dos ácidos p-cumárico e ferúlico encontradas nas amostras <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu, <i>Cynodon nlemfuenses</i> cv. Florona e <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1	Ácidos fenólicos de ocorrência natural (adaptada de Robbins, 2003).....	18
TABELA 1.2	Tratamento dado a diferentes amostras para quantificação de ácidos fenólicos por HPLC.....	24
TABELA 2.1	Classificação das amostras de forrageira analisadas.....	40
TABELA 3.1	Valores de λ de leitura do detector programados em função do tempo de análise.....	46
TABELA 3.2	Condição otimizada para análise no HPLC.....	47
TABELA 3.3	Parâmetros de separação obtidos para mistura padrão dos seis ácidos (20,0 mg/L).....	48
TABELA 3.4	Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos p-cumárico e ferúlico para a amostra Mombaça folha extraída em banho a 20° C por 24h e em ultra-som a temperatura ambiente por 2h.....	53
TABELA 3.5	Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade obtidos para uma massa da amostra Mombaça folha de 25,0 mg (n = 6).....	57
TABELA 3.6	Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos p-cumárico e ferúlico na amostra <i>Cynodon</i> (25,0 mg) em diferentes comprimentos de onda.....	58
TABELA 3.7	Comparação entre o percentual de recuperação (DPR) alcançado ao fortificar 25,0 mg da amostra <i>Cynodon</i> com mistura padrão dos ácidos em 3 níveis de fortificação (5,00 , 7,50 e 10,00 mg/L).....	61
TABELA 3.8	Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos p-cumárico, ferúlico e recuperação do padrão <i>surrogate</i> para a amostra <i>Cynodon</i> extraída em ultra-som por 120 minutos, calculadas por padronização interna.....	63
TABELA 3.9	Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade obtidos com padronização externa e padronização interna.....	69

TABELA 3.10	Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos ferúlico e p-cumárico e recuperação do padrão <i>surrogate</i> obtidos na análise da amostra <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em diferentes dias.....	69
TABELA 3.11	Percentuais médios de recuperação e desvios padrões relativos alcançados para a amostra e branco fortificados com mistura padrão dos ácidos em 3 níveis de fortificação (5,0 , 7,5 e 10,0 mg/L) e adicionados de padrão <i>surrogate</i> na concentração final de 10,0 mg/L.....	71
TABELA 3.12	Concentrações e intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$), expressos em mg/g peso seco, dos ácidos ferúlico e p-cumárico, recuperação do padrão <i>surrogate</i> e digestibilidade encontrados na repetição 1 (R1) das amostras <i>Cynodon nlemfuenses</i> cv. Florona , <i>Cynodon dactylon</i> cv. Florakirk, <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça e <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu.....	74
TABELA 3.13	Concentrações e intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$), expressos em mg/g peso seco, dos ácidos ferúlico e p-cumárico, recuperação do padrão <i>surrogate</i> e digestibilidade encontrados na repetição 2 (R2) das amostras <i>Cynodon nlemfuenses</i> cv. Florona , <i>Cynodon dactylon</i> cv. Florakirk, <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça e <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu.....	75
TABELA 3.14	Comparação dos níveis de concentração dos ácidos p-cumárico e ferúlico obtidos em diferentes espécies de forrageiras.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ASTM	American Society for Testing Materials
Ca	Concentração adicionada na amostra
CAF	Ácido cafeico
Cal	Calibração
CE	Eletroforese Capilar
CHI	Ácido chiquímico
Cm	Concentração medida na amostra
cv.	Cultivar
DPR	Desvio padrão relativo percentual
FDA	Fibras de detergente ácido
FDN	Fibras de detergente neutro
FER	Ácido ferúlico
FM	Fase móvel
GC-MS	Cromatografia a gás com espectrômetro de massa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
irr.	Irrigação
LD	Limite de detecção do método
LQ	Limite de quantificação do método
M	mol/L
m-CUM	Ácido m-cumárico
MeOH	Metanol
MIX 6	Mistura padrão contendo os 6 ácidos diluídos em metanol ou acetonitrila, obtendo-se a concentração final de 10 mg/L
MS	Espectrômetro de massa
MWD	Detector UV-VIS de múltiplos comprimentos de ondas
o-CUM	Ácido o-cumárico
p-CUM	Ácido p-cumárico
PI	Padrão interno
PS	Padrão <i>surrogate</i>
PTFE	Teflon

r	Coeficiente de Pearson
R1	Repetição das amostras 1
R2	Repetição das amostras 2
rpm	Rotações por minuto
RPS	Recuperação percentual do padrão <i>surrogate</i>
T	Temperatura
THF	Tetraidrofurano
tr	Tempo de retenção
tr _r	Tempo de retenção relativo
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
US	Ultra-som
UV	Ultra violeta.
W _{1/2}	Largura do pico à meia altura
150N	Adubação com 150kg/ha de Nitrogênio
300N	Adubação com 300kg/ha de Nitrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	ÁCIDOS FENÓLICOS.....	18
1.2	LIGNINA E DIGESTIBILIDADE.....	20
1.3	DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES SELECIONADAS PARA ESTUDOS.....	21
1.4	TÉCNICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS.....	22
1.5	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS.....	24
1.5.1	APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM NA EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS.....	25
1.6	OBJETIVOS.....	26
1.6.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	26
2	MATERIAL E MÉTODO.....	27
2.1	REAGENTES.....	27
2.2	OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR HPLC.....	27
2.2.1	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	27
2.2.1.1	ESTUDO DO pH DA FASE MÓVEL.....	28
2.2.1.2	ESTUDO DA PROPORÇÃO DO SOLVENTE NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	28
2.2.2	ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO.....	29
2.3	ESTUDO DA EXTRAÇÃO DA AMOSTRA.....	30
	BANHO ULTRATERMOSTÁTICO.....	31
	BANHO ULTRASSÔNICO.....	31
2.4	AVALIAÇÃO DO MÉTODO.....	33
2.4.1	PADRONIZAÇÃO EXTERNA.....	33
2.4.1.1	ESTUDO DA RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO.....	33
2.4.1.2	CURVAS ANALÍTICAS.....	33
2.4.1.3	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO E REPETITIVIDADE.....	34
2.4.1.4	SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA OS ÁCIDOS P-CUMÁRICO E FERÚLICO.....	34
2.4.1.5	ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS.....	35
2.5	PADRONIZAÇÃO INTERNA.....	35

2.5.1	ESTUDOS PARA ESTABELEECER O PADRÃO INTERNO E O PADRÃO <i>SURROGATE</i>	36
2.5.2	AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO INTERNA	37
2.5.2.1	RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO	37
2.5.2.2	CURVAS ANALÍTICAS.....	37
2.5.2.3	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO, REPETITIVIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	38
2.5.2.4	ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS....	38
2.6	AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS.....	39
2.6.1	CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	41
3.1.1	ESTUDO DO pH DA FASE MÓVEL	41
3.1.2	ESTUDO DA PROPORÇÃO DO SOLVENTE NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	43
3.1.3	PROGRAMAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA PARA DETECÇÃO.....	45
3.1.4	CONDIÇÃO OTIMIZADA PARA ANÁLISE NO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA.....	47
3.2	ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS PADRÕES.....	49
3.3	EXTRAÇÃO DA AMOSTRA	52
3.4	AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO EXTERNA	53
3.4.1	RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO	53
3.4.2	CURVAS ANALÍTICAS.....	55
3.4.3	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO E REPETITIVIDADE.....	57
3.4.4	SELETIVIDADE.....	58
3.4.5	ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS....	59
3.5	PADRONIZAÇÃO INTERNA	62
3.5.1	ESTUDOS PARA ESTABELEECER O PADRÃO INTERNO E O PADRÃO <i>SURROGATE</i>	62

3.5.2	AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO INTERNA	66
3.5.2.1	RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO	66
3.5.2.2	CURVAS ANALÍTICAS.....	67
3.5.2.3	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO, REPETITIVIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	68
3.5.2.4	ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS....	70
3.6	DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS P-CUMÁRICO E FERÚLICO NAS AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS.....	72
3.6.1	ANÁLISE DAS AMOSTRAS	77
3.6.1.1	<i>BRACHIARIA BRIZANTHA</i> CV. MARANDU	77
3.6.1.2	<i>CYNODON NLEMFUENSE</i> CV FLORONA	78
3.6.1.3	<i>PANICUM MAXIMUM</i> CV. MOMBAÇA	78
3.6.1.4	<i>CYNODON DACTYLON</i> CV. FLORAKIRK.....	79
3.6.2	CONSIDERAÇÕES	80
3.6.3	COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS.....	80
4	CONCLUSÃO.....	83
5	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	84
6	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

Do ponto de vista qualitativo, algumas características químico-bromatológicas inerentes às forrageiras tropicais, tais como as elevadas concentrações de lignina e de parede celular, comprometem o valor nutritivo da forragem e também contribuem para o baixo desempenho dos bovinos em regime de pastejo. Para uma melhor caracterização das forrageiras, são necessárias avaliações que permitam conhecimento detalhado da composição química de plantas forrageiras.

A parede celular das forrageiras é composta principalmente por celulose, mas pode estar impregnada com lignina. Segundo Boudet (2000), de uma maneira geral, nas plantas a lignina é o segundo componente em abundância depois da celulose e contém cerca de 30% do carbono orgânico na biomassa vegetal. Estudos mostram que a lignina é o principal fator limitante na degradação da parede celular pelo rumem, devido ao fato de estar associada aos carboidratos estruturais, como por exemplo celulose e hemicelulose, da parede celular [2, 3].

A lignina é um polímero formado por três álcoois, p-coumaril, coniferil e sinapil, que se interligam numa malha complexa, resistente à hidrólise ácida e alcalina e a vários complexos enzimáticos, inclusive as enzimas microbianas e tissulares do trato gastrintestinal dos animais superiores. À medida que as plantas forrageiras amadurecem, maior é a concentração da lignina, bem como maior é seu efeito deletério sobre a utilização da parede celular por parte do rúmen [4]. A lignina tem como funções fortalecer a parede celular e facilitar o transporte de água, além disso, ela impede a degradação dos polissacarídeos da parede celular, deste modo, atua como a principal linha de defesa contra doenças, insetos e outros herbívoros [5].

A lignificação é um processo bioquímico que abrange a biossíntese dos álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil, seu transporte e a polimerização na parede celular. A FIGURA 1.1 representa o esquema, adaptado de Soest (1994) por Santana *et al.* [6], de formação destes álcoois precursores da lignina.

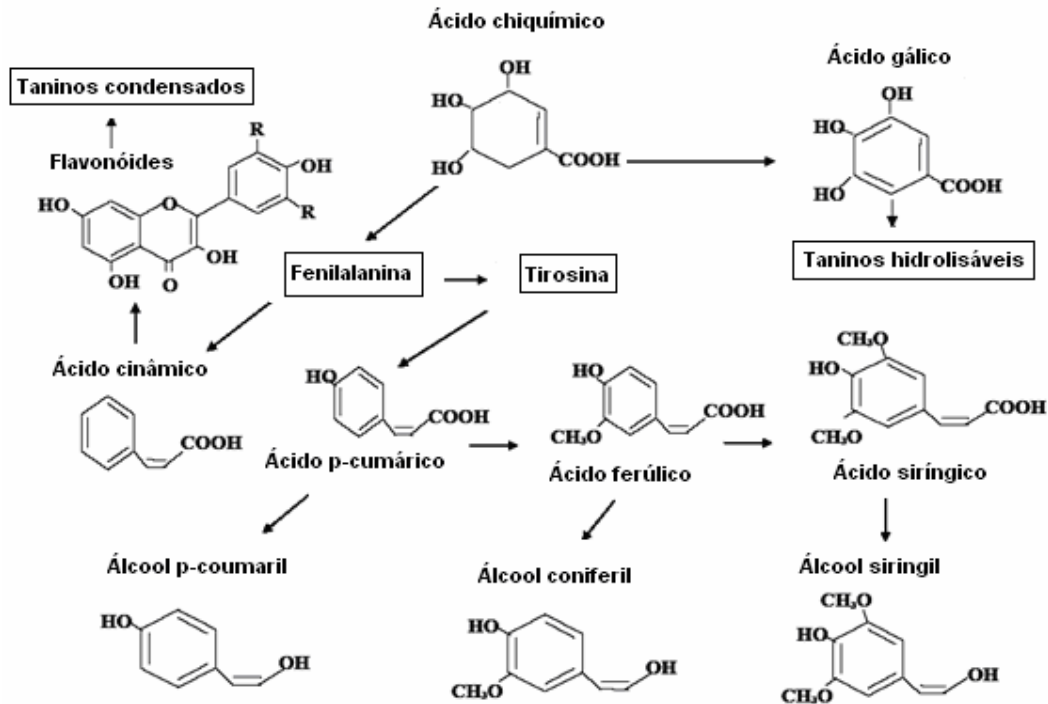


FIGURA 1.1: Esquema de formação dos álcoois precursores da lignina adaptado de Soest (1994) por Santana *et al.* (2006).

A definição de lignina pode variar de acordo com o enfoque do trabalho, devido à grande variedade de maneiras de tratamento para seu isolamento. Alguns autores trabalham com os conceitos de lignina “core” e lignina “non core”. A lignina “core”, também conhecida como lignina Klason ou lignina em detergente ácido, refere-se ao polímero de fenilpropanóide depositado na parede celular pela polimerização dos álcoois precursores coniferil, sinapil e p-coumaril, e é determinada rotineiramente nas análises laboratoriais através do método da lignina insolúvel em ácido sulfúrico 72% [4].

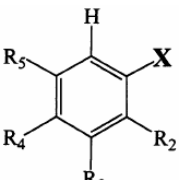
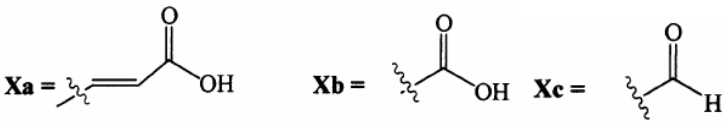
A lignina “non core” consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, e está representada por ácidos p-hidroxicinâmico éster-ligados, dentre eles os ácidos p-cumárico e ferúlico (e seus dímeros) [7].

Alguns estudos sugerem a existência de alguma correlação negativa entre esses dois tipos de lignina e o teor de fibras e digestibilidade [2, 3, 8-15].

1.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

De uma maneira geral, os ácidos fenólicos são fenóis que possuem uma função ácido carboxílico. No entanto quando se referem aos metabólitos de plantas, representam um grupo definido de ácidos orgânicos de ocorrência natural. Dentro dessa classe estão os ácidos hidroxicinâmicos (Xa) e hidroxibenzóico (Xb), que apresentam o mesmo esqueleto, variando o número e a posição do grupo hidroxila, e ainda inclui alguns aldeídos análogos (Xc), como por exemplo a vanilina. Na TABELA 1.1 são mostrados alguns ácidos fenólicos de ocorrência natural e suas respectivas estruturas [16].

TABELA 1.1: Ácidos fenólicos de ocorrência natural (adaptada de Robbins, 2003).

Estrutura base		Substituinte na posição X				
						
Grupos substituintes					Nome do composto	
R₂	R₃	R₄	R₅	X		
H	H	H	H	a	Ácido cinâmico	
-OH	H	H	H	a	Ácido o-cumárico	
H	H	-OH	H	a	Ácido p-cumárico	
H	-OH	H	H	a	Ácido m-cumárico	
H	-OCH ₃	-OH	H	a	Ácido ferúlico	
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	Ácido sinápico	
H	-OH	-OH	H	a	Ácido cafeico	
H	H	H	H	b	Ácido benzóico	
-OH	H	H	H	b	Ácido salicílico	
H	H	-OH	H	b	Ácido p-hidroxibenzóico	
H	-OCH ₃	-OH	H	b	Ácido vanílico	
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	Ácido siríngico	
-OH	H	H	-OH	b	Ácido gentísico	
-OH	-OH	-OH	-OH	b	Ácido gálico	
H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	b	Ácido veratríco	
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	Siringaldeído	
H	-OCH ₃	-OH	H	c	Vanilina	

Os ácidos fenólicos podem apresentar várias atividades biológicas, dentre elas antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica, antibacteriana e fungicida [17-21]. Eles acumulam-se em várias partes da planta e não

apresentam uma distribuição homogênea nos tecidos vegetais. A maior parte encontra-se associada a componentes estruturais, outros na forma de flavonóides e uma minoria como ácidos livres [16,22]. Além disto, os estágios de maturação das plantas influenciam na concentração destes ácidos.

Quanto à associação aos componentes estruturais, eles podem estar ligados à lignina “core”, aos polissacarídeos ou a ambos simultaneamente [9,23].

A FIGURA 1.2 mostra a estrutura dos ácidos fenólicos estudados no presente trabalho, sendo os ácidos p-cumárico e ferúlico os principais ácidos fenólicos presentes em plantas, onde estes estão associados aos componentes da parede celular através de ligações éster ou éter. O ácido p-cumárico, em sua grande maioria está associado à lignina “core”. O ácido ferúlico pode formar uma ligação cruzada entre a lignina “core” e a hemicelulose, encontrando-se éter-ligado à lignina e éster-ligado à hemicelulose [9,23,4]. Essa ligação, de acordo com Sun *et al.* [23] tem influencia sobre o crescimento da parede celular, suas propriedades mecânicas e biodegradabilidade.

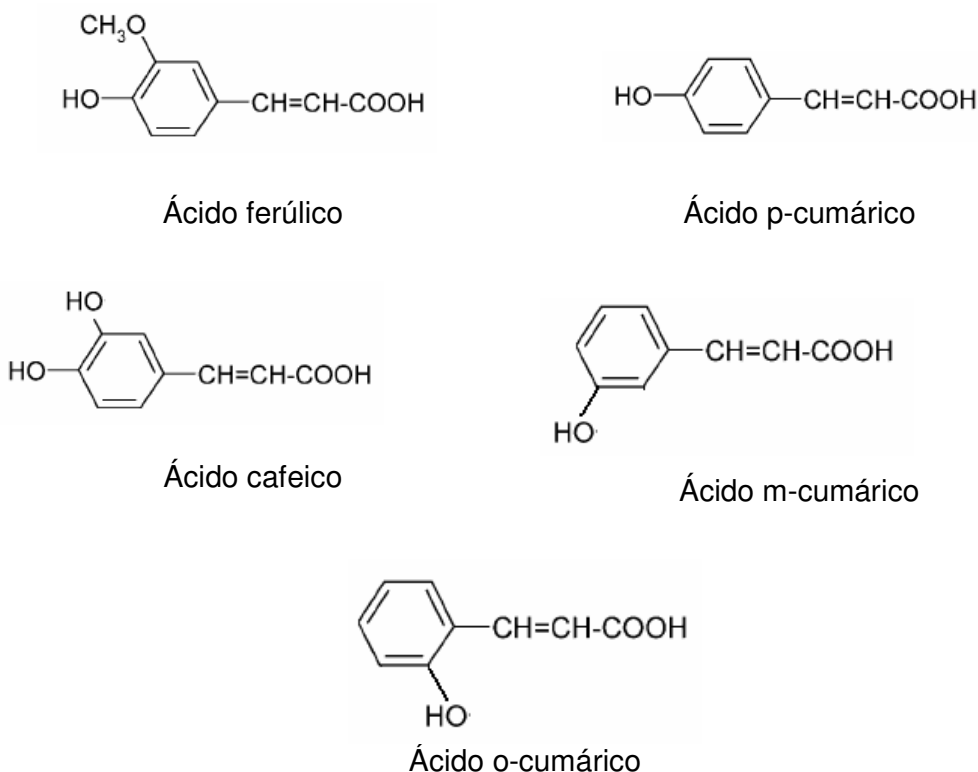


FIGURA 1.2: Estruturas dos ácidos fenólicos estudados.

1.2 LIGNINA E DIGESTIBILIDADE

As primeiras observações de correlação negativa entre o conteúdo de lignina e a digestibilidade das forrageiras foram realizadas no início do século XX [25]. A partir de então, os estudos se concentraram, principalmente, no efeito da lignina “core” sobre a digestibilidade de forrageiras. A partir da década de 70, iniciaram-se os trabalhos com a lignina “non-core” e sua influência na digestibilidade [8].

Embora as gramíneas apresentem menores teores de lignina “core” que as leguminosas, as correlações negativas entre a lignina e a digestibilidade são mais significativas em gramíneas. A explicação pode estar na maior concentração de hemicelulose encontrada em gramíneas. Como a lignina se liga covalentemente à hemicelulose, seu efeito seria mais prejudicial para a digestibilidade das gramíneas que das leguminosas [4]. Outra possibilidade reside nas diferenças em composição monomérica da lignina entre gramíneas e leguminosas.

Jung [9] sugeriu que não somente a quantidade, mas também a composição da lignina “core” pode influenciar na digestibilidade da fibra. Apesar desta sugestão, Grabber *et al.* [26] demonstraram que ligninas com diferentes proporções das unidades guaiacil, siringil e p-hidroxifenil influenciam a digestibilidade da parede celular de maneira semelhante, sugerindo que a composição da lignina não altera significativamente as interações entre a lignina e outros componentes da parede celular.

Os ácidos fenólicos (lignina “non core”) presentes na parede celular das forrageiras mereceram maior atenção por parte dos pesquisadores a partir dos estudos de Hartley [8], que demonstrou que dos ácidos presentes, a concentração de ácido p-cumárico é a que apresenta maior efeito negativo sobre a digestibilidade das forrageiras.

O mesmo foi verificado por Komprda *et al.* [10], que quantificou os ácidos ferúlico e p-cumárico em diferentes estágios vegetativos da *Medicago sativa*. Os autores encontraram correlações negativas entre a concentração de ácido p-cumárico ligado à parede celular e o teor de fibras de detergente neutro (FDN) e de detergente ácido (FDA), mas para o ácido ferúlico as correlações

não foram significativas. Por outro lado, Casler & Jung [15] encontraram uma correlação negativa entre a concentração de ácido ferúlico e a digestibilidade em gramíneas.

A influência da natureza e a concentração dos ácidos fenólicos, na digestão da parede celular vegetal por ruminantes também foi demonstrada por Brito *et al.* [13]. Neste estudo, a concentração e proporção de ácidos p-cumárico e ferúlico sugerem diferença de digestibilidade e ao tipo de condensação da lignina presente nos tecidos vegetais. Tais compostos apresentaram maior relação com digestibilidade da matéria seca.

1.3 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES SELECIONADAS PARA ESTUDOS

Os sistemas de pastejo para produção de leite baseiam-se principalmente na utilização de gramíneas forrageiras tropicais, as quais possuem elevados potenciais produtivos e bons valores nutritivos. O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), juntamente com gramíneas dos gêneros *Brachiaria*, *Cynodon* e *Panicum*, têm sido as forrageiras mais utilizadas nestes sistemas [27-32].

O interesse dos pecuaristas pelo gênero *Cynodon* vem aumentando ultimamente para compor sistemas de pastejo rotacionado. As gramíneas pertencentes a este gênero possuem algumas características forrageiras desejáveis como boa cobertura do solo, crescimento rápido, elevada produção de matéria seca por área, adaptação ao clima tropical, favorável relação folha/caule e alto valor nutritivo. As cultivares da espécie *Cynodon dactylon* ou grama bermuda mais conhecidas são: Coast-cross 1, Tifton 78, Florakirk e Tifton 85. Entre as cultivares da espécie *Cynodon nlemfuenses* ou grama estrela mais conhecidas destacam-se: Florico, Florona e Africana. A grama estrela e as gramas bermudas desenvolvem melhor durante a estação quente, enquanto que a Florico, Florona e Tifton-85, continuam a desenvolver em dias curtos e frios, desde que tenham condições adequadas de fertilidade e umidade [33].

A espécie *Panicum maximum* tem sido utilizada há muito tempo no Brasil, especialmente em locais com solos de boa fertilidade. Espécie de alto potencial de produção, boa adaptação a uma grande faixa de climas, conta

com várias cultivares, dentre elas o Colonião, Tobiata, Tanzânia, Vencedor, Mombaça e Centenário, sendo que muitas ainda não são suficientemente conhecidas em sua fisiologia [30].

Dentre as forrageiras cultivadas, as gramíneas do gênero *Brachiaria* são as mais usadas no Brasil e são largamente utilizadas em pastagens na América Tropical. Informações citadas por Macedo (1995) indicam que cerca de 40 milhões de hectares (85% da área dos cerrados com pastagem) são cobertas por pastagens de *Brachiaria* formando extensos monocultivos, especialmente no Brasil Central e Amazônia. É uma forrageira que requer, em média, precipitação anual de 1000 mm e solos bem drenados, possuindo boa adaptabilidade em solos de baixa fertilidade natural, tolerando a acidez do solo [35].

1.4 TÉCNICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Um método bastante empregado na quantificação total de ácidos fenólicos é o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Neste método, o reagente Folin-Ciocalteu é adicionado em meio básico, formando um complexo azul, cuja absorvância é medida em 760nm e a concentração total é dada em função do ácido gálico. Porém, através deste método não é possível a identificação individual dos ácidos presentes na amostra [16,19].

Na identificação e quantificação destes ácidos em diferentes matrizes são empregadas técnicas como eletroforese capilar (CE) com detecção eletroquímica [36] e detecção fotométrica no UV [37-39]; biossensores [40], cromatografia a gás com espectrômetro de massa (GC-MS) [14,17,19,24,41,42]; cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com detecção UV [43] e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores MS [18,44,45], UV-Vis [11,12,20,42,43,46-55] e eletroquímico [48,56]. Onde GC e HPLC são as técnicas mais difundidas.

A vantagem da análise destes compostos por HPLC em relação a cromatografia a gás é que no primeiro não há a necessidade de derivação química dos analitos [45,57]. Porém o emprego de detectores com

espectrômetros de massa melhora a identificação dos componentes presentes nas amostras.

Poucos trabalhos são encontrados na literatura aplicando HPLC na quantificação de ácidos fenólicos em forrageiras. Jung & Shalita-Jones [46] quantificaram por HPLC os ácidos ferúlico e p-cumárico em três amostras de forrageiras (*Medicago sativa*, *Bromus inermis* e *Panicum uirgatum*) a fim de avaliar diferentes condições de extração. Jung [12] aplicou a mesma metodologia de separação para quantificar os ácidos ferúlico e p-cumárico éter e éster-ligados em amostras de milho (*Zea mays* L.)

Casler & Jung [15] aplicaram a metodologia de separação proposta por Jung & Shalita-Jones [46] para quantificar os ácidos ferúlico e p-cumárico em amostras de *Bromus inermis* Leyss, *Dactylis glomerata* L. e *Phalaris arundinacea* L., com o objetivo de determinar correlações entre lignina Klason, ácidos fenólicos e fibra de detergente neutro e ainda verificar sua influencia na digestibilidade dessas três espécies de forrageiras.

Também com o intuito de verificar correlações entre concentrações dos ácidos fenólicos e componentes químico-bromatológicos de seis espécies de forrageiras cultivadas em Portugal (*Festuca rubra* L., *Holcus mollis* L., *Holcus lanatus* L., *Agrostis setacea* Curtis, *Lolium perenne* L. e *Bromus inermis* Leyss), Rodrigues e colaboradores [55] aplicou a separação por HPLC com eluição por gradiente para determinar as concentrações dos ácidos ferúlico e p-cumárico.

Já Komprda *et al.* [10], utilizando da mesma técnica, quantificou os ácidos ferúlico e p-cumárico em amostras de *Medicago sativa*, L. em diferentes estágios de maturação e no líquido ruminal em diferentes tempos de incubação.

No Brasil, Deschamps & Ramos [11] e Brito *et al.* [13] quantificaram por HPLC os ácidos ferúlico e p-cumárico em amostras cultivadas no estado de Santa Catarina. Deschamps & Ramos [11] otimizaram uma metodologia de separação para sete ácidos fenólicos e a aplicou em amostras de bagaço de cana, de capim-elefante cv. Empasc-307-Testo (acesso IJ-7136) e de mandioca cv. Pernambucana. Brito *et al.* [13], através da mesma metodologia analítica quantificou os mesmos ácidos em amostras de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*.

1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Certas amostras requerem algum tipo de tratamento para eliminar possíveis interferentes ou no caso de plantas, para liberar os ácidos que possam estar ligados a algum componente da parede celular. Dentre os métodos de extração estão a extração com solventes orgânicos, hidrólise alcalina e hidrólise ácida, onde esta última libera somente parte dos compostos ligados à parede celular [10]. Na TABELA 1.2 são mostrados exemplos de tratamento dado a alguns tipos de matrizes para a quantificação dos ácidos fenólicos por HPLC.

TABELA 1.2: Tratamento dado a diferentes amostras para quantificação de ácidos fenólicos por HPLC.

MATRIZ	Tratamento dado à amostra	Referência
Vegetais	Hidrólise ácida	[45]
Cereais	Extração com metanol/água (50:50)	[53]
Cereais	Hidrólise alcalina (Extração severa e branda)	[23]
Forrageiras	Hidrólise alcalina (Extração severa e branda)	[12]
	Hidrólise alcalina (Extração branda)	[11]
Vinho	Filtro de membrana PTFE 0,20µm	[50]
Azeite de Oliva	Extração com metanol/água (80:20)	[49]

A hidrólise alcalina é o principal tipo de extração aplicado a amostras de forrageira na quantificação de ácidos fenólicos. Essa extração permite quantificar os ácidos fenólicos totais, os éster ligados e os éter ligados separadamente, devido ao fato de se poder realizar dois tipos de hidrólise, que são os seguintes [11,23]:

* Extração branda: a amostra é tratada com uma solução de NaOH 1M, a 20°C por 24 h, que quebra somente as ligações éster.

* Extração severa: a amostra é tratada com uma solução de NaOH 4 M a 170°C por 2 h, que quebra tanto as ligações éster quanto as ligações éter.

Sendo assim, a extração severa permite a quantificação dos ácidos fenólicos totais, e a diferença entre a concentração de ácidos fenólicos totais e a concentração de ácidos fenólicos éster ligados, fornece a concentração de ácidos fenólicos éter ligados.

1.5.1 APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM NA EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS

A irradiação de ultra-som em soluções aquosas induz o fenômeno de cavitação acústica no meio líquido, que se trata da formação, crescimento e implosão de bolhas de gás. A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e tratamento de amostras e para descontaminação de efluentes, devido às modificações físicas e químicas resultantes deste processo, o que tem impulsionado novas estratégias de preparo de amostras. Em sistemas heterogêneos, o tratamento é favorecido devido a fenômenos de emulsão nas interfaces de sistemas líquido-líquido, lixiviação na superfície em sistemas sólido-líquido, erosão, fragmentação e aumento da área superficial de partículas sólidas em decorrência das ondas de choque originadas da implosão das micro-bolhas, e a diminuição do gradiente de concentração pelo aumento do transporte de massas ocasionado pela turbulência e micro-jatos [58-60].

Recentemente, tem-se aplicado o ultra-som como uma alternativa de métodos tradicionais de extração, devido à simplicidade de operação, diminuição no tempo de extração, condições mais seguras para o analista, uma vez que os métodos possibilitam a operação à pressão e temperatura ambientes, além da redução do uso de ácidos e oxidantes, o que também minimiza as perdas de elementos voláteis e gera menos resíduos a serem descartados [60-62].

Há um grande número de estudos aplicando o banho ultrassônico no tratamento de amostras de solos e sedimentos [63-67], biológicas [68-70], alimentícias [71-73] e de óleos derivados de petróleo [74, 75]. Porém, no que

diz respeito a amostras de forrageiras, nenhum trabalho foi encontrado na literatura aplicando esse tipo de extração na quantificação de ácidos fenólicos.

1.6 OBJETIVOS

Otimização e aplicação da metodologia analítica por HPLC para determinação dos ácidos fenólicos precursores da lignina, ácido ferúlico e ácido p-cumárico e isômeros, em amostras de forrageiras tropicais utilizadas na alimentação de ruminantes.

1.6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Otimização dos parâmetros de separação e determinação simultânea dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV.

2. Otimização das etapas de tratamento e extração das amostras de forrageiras aplicando banho ultratermostático.

3. Desenvolvimento de uma metodologia para extração dos ácidos p-cumárico e ferúlico em amostras de forrageiras por tratamento alcalino brando e banho ultrassônico.

4. Comparação dos métodos de extração por banho ultratermostático e ultra-som.

5. Avaliação da aplicação dos ácidos m-cumárico e o-cumárico como padrão interno e padrão *surrogate*.

6. Aplicação da metodologia proposta para quantificação dos ácidos p-cumárico e ferúlico em quatro espécies de forrageiras (folha e caule).

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 REAGENTES

Nas análises e no preparo dos padrões e amostras foram utilizados reagentes (ácido fosfórico 85%, ácido acético glacial e fosfato monobásico de potássio) e solventes grau HPLC (Tedia Company Inc., USA). Os padrões de ácido ferúlico, cafeico, chiquímico, p-cumárico, o-cumárico e m-cumárico foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Demais reagentes (fosfato monobásico de sódio, acetato de sódio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico) foram adquiridos da Vetec. No preparo de soluções foi utilizada água destilada e deionizada produzida em um ultrapurificador (Milli-Q – Quantum Ex).

2.2 OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR HPLC

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

A identificação dos compostos foi baseada nos respectivos tempos de retenção obtidos para injeção de padrões externos dos ácidos estudados, bem como a comparação dos sinais obtidos em diferentes comprimentos de onda.

2.2.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

Os estudos foram baseados nos trabalhos descritos por: Komprda *et al.* [10]; Deschamps & Ramos [11]; Jung [12]; Sun *et al.* [23].

Durante o desenvolvimento da metodologia, foram avaliados alguns parâmetros cromatográficos, dentre eles: tempo de retenção (tr), fator de simetria¹, resolução, sensibilidade e tempo de análise.

Os testes iniciais envolveram a otimização da separação dos ácidos chiquímico (CHI), cafeico (CAF), p-cumárico (p-CUM) e ferúlico (FER) empregando uma fase móvel (FM) composta por um ou mais solventes orgânicos e por uma solução de ácido ou tampão. Para tanto, foram testados diferentes solventes orgânicos (metanol, acetonitrila, tetraidrofurano) e soluções de ácidos e soluções tampão em diferentes valores de pH (soluções de ácido fosfórico, ácido acético, tampão acetato e tampão fosfato).

2.2.1.1 ESTUDO DO pH DA FASE MÓVEL

A fim de se definir o pH da fase móvel (FM), testou-se as seguintes soluções e valores de pH:

- × soluções de ácido fosfórico pH=2,05 e 2,20.
- × solução de ácido acético pH=3,00.
- × tampão fosfato pH=2,05; 2,15; 2,50 e 3,00.
- × tampão acetato pH=3,50; 4,00 e 4,55.

Para cada valor de pH foram testadas condições de separação por eluição isocrática e por gradiente com cada um dos solventes orgânicos: metanol, acetonitrila e tetraidrofurano. Assim, para cada sistema, realizou-se um gradiente exploratório, e a partir deste foram selecionadas as condições iniciais para a otimização da separação isocrática.

2.2.1.2 ESTUDO DA PROPORÇÃO DO SOLVENTE NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

Para definir a proporção do solvente na fase móvel foi aplicado o diagrama triangular para a separação dos ácidos. Esse método é geralmente

¹ O fator de simetria dos picos calculado conforme (AGILENT, 2001) e leva em consideração a altura do pico, a altura dos pontos de inflexão e 4 valores de áreas parciais dois antes e dois após o ápice do pico. Este cálculo envolve diversas expressões e foi obtido pelo *software* Agilent Chemstation usado para aquisição dos dados durante as análises.

aplicado na otimização da separação de compostos utilizando uma fase móvel composta por solução aquosa de ácido e dois ou três solventes orgânicos. O desenvolvimento desse diagrama envolveu as seguintes etapas [77]:

1. Otimização da separação utilizando a FM composta por acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico pH=2,05.
2. Otimização da separação utilizando a FM composta por metanol e solução aquosa de ácido fosfórico pH=2,05.
3. Otimização da separação utilizando a FM composta por tetraidrofurano e solução aquosa de ácido fosfórico pH=2,05.
4. A otimização da separação com uma mistura de dois dos três solventes numa proporção de 1:1.
5. A separação com uma mistura 1:1:1 dos três solventes.

Após definir a melhor condição de separação para os ácidos chiquímico, cafeico, p-cumárico e ferúlico, foram incluídos os ácidos m-cumárico e o-cumárico, ajustando a proporção da fase móvel para se obter a separação destes seis ácidos.

Otimizada a condição de separação, partiu-se para a programação do detector de múltiplos comprimentos de onda na região do UV, dessa forma foi possível obter melhoria da sensibilidade de detecção dos compostos estudados, sendo um método mais eficiente que a leitura em apenas um único comprimento de onda.

2.2.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Foram preparadas soluções estoque 1000,0 mg/L de cada padrão de ácido em metanol e estocadas a 4°C. No dia da análise, partindo das soluções estoque, preparou-se uma solução intermediária contendo os seis ácidos na concentração de 100,0 mg/L e, a partir desta, preparou-se as soluções trabalho nas concentrações desejadas para a análise no HPLC.

A fim de se saber por quanto tempo as soluções poderiam ser estocadas a 4°C e qual o solvente mais apropriado para a diluição das soluções estoque, intermediária e de trabalho, foi realizado um estudo da estabilidade dos analitos nestas soluções.

Desta forma, foram preparadas as soluções estoques 1000,0 mg/L de cada padrão de ácido em metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), e a partir destas, preparou-se as soluções conforme mostrado no esquema da FIGURA 2.1, onde MIX 6 é uma solução padrão mistura composta pelos seis ácidos.

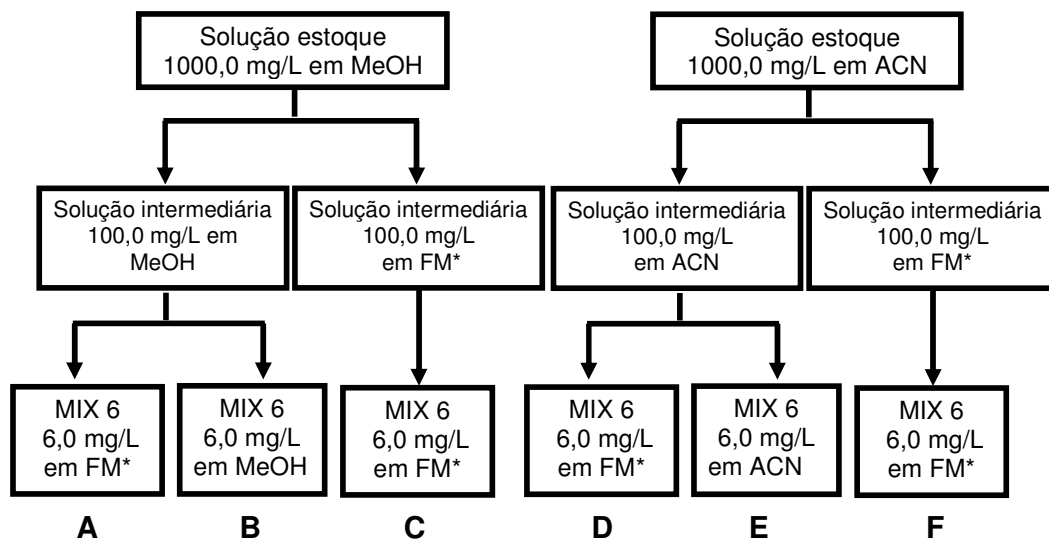


FIGURA 2.1: Esquema do preparo das soluções trabalho para o teste de estabilidade das soluções padrão.

*FM: ACN / MeOH / solução H_3PO_4 pH=2,05 (13:12,5:74,5).

As soluções A, B, C, D, E e F foram preparadas e injetadas no HPLC no dia do preparo e em seguida foram estocadas com as soluções estoques a 4°C. Novas soluções C e F foram preparadas a partir das soluções estoques armazenadas por 1, 7 e 17 dias, respectivamente. Essas soluções foram analisadas no HPLC no dia do preparo, juntamente com as soluções C e F preparadas no primeiro dia.

2.3 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DA AMOSTRA

Nesta etapa foram estudadas duas técnicas para extração das amostras: ultra-som e banho ultratermostático. O procedimento adotado foi selecionado com base no tempo de análise e eficiência da extração obtida através da recuperação de amostras fortificadas pelas duas técnicas e que será abordado no item 2.4.1.5.

BANHO ULTRATERMOSTÁTICO

O principal método de extração aplicado na quantificação dos ácidos fenólicos éster ligados à parede celular é a extração branda. A metodologia empregada para extração das amostras por esta técnica (FIGURA 2.2) foi baseada nos procedimentos descritos por Deschamps & Ramos [11]. A amostra Mombaça folha (25,0 mg) foi tratada com uma solução de NaOH 1M, a 20°C por 24 h em banho ultratermostático Cientec, modelo CT282.

BANHO ULTRASSÔNICO

A fim de se propor um método alternativo e mais rápido de extração, foi realizado um estudo para extração em ultra-som, substituindo o banho (20°C por 24 h). Neste estudo foi utilizado um banho ultrassônico Unique, modelo USC2850, com dois cristais piezelétricos, operando a frequência de 25 kHz e potência de 120 W. As amostras foram posicionadas acima dos cristais piezelétricos e em seguida foi colocada água suficiente para cobrir 2/3 dos tubos, de forma que o volume de amostra dentro destes ficasse submerso.

Desta forma a amostra Mombaça folha (25,0 mg) foi extraída a temperatura ambiente com uma solução de NaOH 1M em diferentes tempos de sonicação: 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 min. Este estudo foi realizado em triplicata e os resultados obtidos foram comparados com os da extração usual, estabelecendo-se o tempo ideal para a sonicação das amostras (FIGURA 2.2).

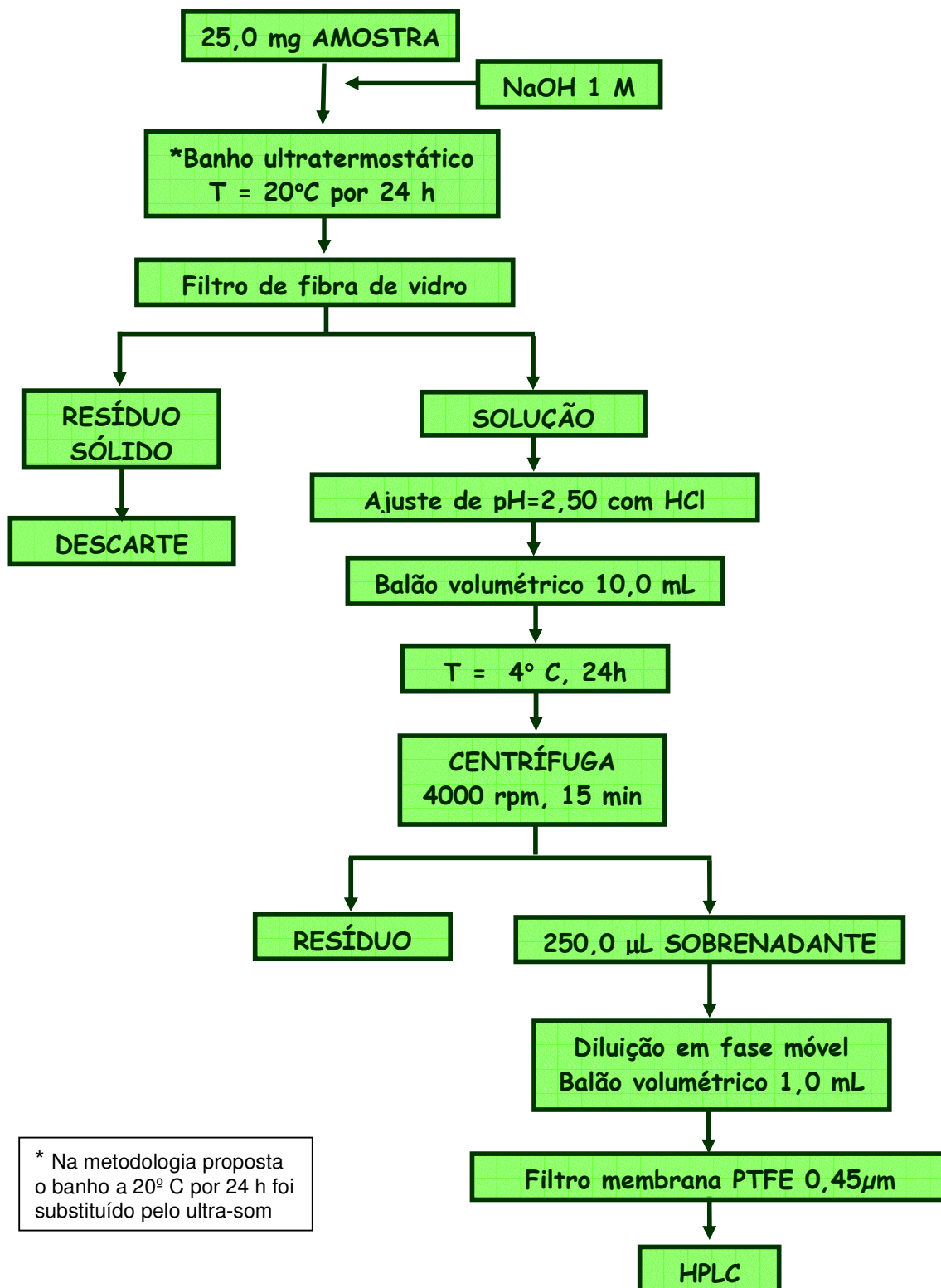


FIGURA 2.2: Esquema de representação da extração branda em banho ultratermostático dos ácidos fenólicos.

2.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO

Para a quantificação das amostras foram avaliados o método da padronização externa e a padronização interna.

2.4.1 PADRONIZAÇÃO EXTERNA

A avaliação do método otimizado foi feita através da análise de alguns parâmetros, dentre eles: resposta linear; limite de detecção; limite de quantificação; repetitividade; seletividade e exatidão (recuperação) do método. Todos os estudos foram realizados com análise em réplica e branco da análise.

2.4.1.1 ESTUDO DA RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO

A resposta linear corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação [78].

De acordo com Ribani *et al.* [78], um coeficiente de Pearson (r) maior que 0,999 é considerado somente como uma evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Desta forma, a resposta linear do método foi verificada também através dos gráficos de fator de resposta em função da concentração dos analitos [78,79]. A faixa de resposta linear estudada variou entre 3,00 e 30,00 mg/L, para tanto, foi construída uma curva de calibração, para os seis ácidos com os seguintes níveis de concentração: 3,00; 6,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00 e 30,00 mg/L.

2.4.1.2 CURVAS ANALÍTICAS

Para a quantificação dos compostos foram construídas curvas analíticas para cada analito. Foram injetados 20 μ L das soluções padrões trabalho da mistura dos seis ácidos fenólicos na faixa de concentração de 3,00 a 20,00 mg/L diluídos a partir da solução intermediária 100,00 mg/L. Para construção da curva analítica foram utilizados os níveis de concentração dentro da faixa de resposta linear do método e da faixa estimada para os níveis de concentração das amostras (3,00; 6,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mg/L).

2.4.1.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO E REPETITIVIDADE

O limite de detecção do método (LD) representa a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser confiavelmente distinguida de zero. Um dos métodos recomendados para a validação de uma metodologia propõe que o LD seja calculado como 3 vezes o desvio padrão da análise de pelo menos seis amostras com baixa concentração dos analitos [80].

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental [78]. O seu valor pode ser determinado como 10 vezes o desvio padrão da análise de pelo menos seis amostras com baixa concentração dos analitos.

Já a repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) [78].

Para se determinar a repetitividade e os limites de detecção e quantificação do método, seis réplicas da amostra Mombaça folha (25,0 mg) foram submetidas à extração em banho ultratermostático com uma solução de NaOH 1M, a 20°C por 24 h. Esse tipo de tratamento permite extrair da amostra somente os ácidos p-cumárico e ferúlico éster ligados. Logo, as amostras foram fortificadas com os demais ácidos (chiquímico, cafeico, m-cumárico e o-cumárico).

2.4.1.4 SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA OS ÁCIDOS p-CUMÁRICO E FERÚLICO

De acordo com Thompson *et al.* [80] a seletividade é a capacidade de um método de quantificar precisamente um analito na presença de interferentes. Desta forma optou-se por quantificar os ácidos ferúlico e p-cumárico nos comprimentos de onda de 236 e 286 nm e comparar os resultados com os obtidos no comprimento de onda de 316 nm, que foi o selecionado para a quantificação destes ácidos na programação de comprimento de onda. Não havendo diferenças significativas entre as

concentrações encontradas nos diferentes comprimentos de onda, garante-se que os picos de resposta são exclusivamente dos compostos de interesse.

2.4.1.5 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação no processo de extração da amostra *Cynodon dactylon* cv. Coast-cross, da mesma fortificada, do branco da amostra e do branco fortificado com uma mistura padrão dos ácidos.

Desta forma, foi realizada a extração da amostra e da mesma fortificada com os seis ácidos em três níveis de concentração: 5,00; 7,50 e 10,00 mg/L. Cada nível de concentração foi analisado em triplicata, aplicando a extração em banho ultratermostático e em ultra-som. Foi avaliada também a recuperação do branco da análise, sem adição de amostra, fortificado com os seis ácidos na concentração de 10,00 mg/L, em cinco repetições para as duas técnicas de extração estudadas.

2.5 PADRONIZAÇÃO INTERNA

O padrão interno (PI) e o padrão *surrogate* (PS) são utilizados para controle do desempenho do método e no auxílio da quantificação dos analitos. Tanto o PI, quanto o PS, são compostos que devem apresentar características semelhantes às dos compostos estudados, ter tempo de retenção próximo ao dos analitos, não reagir com o analito ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra [78,79].

O padrão interno é adicionado à amostra antes da injeção no HPLC, ele é utilizado para compensar as flutuações de sinal e de tempo de retenção ao longo das análises cromatográficas e para calcular a recuperação do padrão *surrogate*.

O padrão *surrogate* deve ser submetido a todo o processo de tratamento da amostra, desta forma, ele é adicionado à amostra antes da extração logo após a sua pesagem. Sua recuperação é calculada através da equação 3.2,

onde o critério para valores de recuperação estabelecido neste trabalho foi de 75% a 120%.

$$R\%(PS) = \frac{Cm(PS) \times Ca(PI)}{Cm(PI) \times Ca(PS)} \times 100 \quad [\text{Equação 2.2}]$$

Sendo: *Cm* a concentração medida na amostra

Ca a concentração adicionada na amostra

PS padrão *surrogate*

PI padrão interno

Aplicando a padronização interna, o padrão *surrogate* é utilizado no cálculo das concentrações dos analitos, onde são comparadas as razões das áreas e as razões das concentrações entre os padrões e as amostras. Calculada desta forma, a concentração obtida é corrigida em função da recuperação do padrão *surrogate*.

2.5.1 ESTUDOS PARA ESTABELEECER O PADRÃO INTERNO E O PADRÃO SURROGATE

No presente trabalho, dois compostos podem desempenhar ambas funções, que são os ácidos o-cumárico e m-cumárico. Logo, a fim de se determinar qual será utilizado como PI e qual será o PS, foram realizados dois estudos:

- I. Quantificação (em triplicata) da amostra *Cynodon dactylon cv. Coast-cross* utilizando os ácidos o-cumárico como PI e m-cumárico como PS: foi realizada a extração em ultra-som da amostra, da amostra fortificada e do branco fortificado, ambos adicionados os ácidos ferúlico, p-cumárico e m-cumárico (PS) na concentração de 10,00 mg/L. Antes da injeção de cada amostra, foi adicionado o ácido o-cumárico na concentração de 10,00 mg/L (PI).
- II. Quantificação (em triplicata) da amostra *Cynodon dactylon cv. Coast-cross* utilizando os ácidos m-cumárico como PI e o-cumárico como PS: foi realizada a extração em ultra-som da amostra, da amostra fortificada e do branco fortificado, ambos adicionados os ácidos ferúlico, p-cumárico e o-cumárico (PS) na concentração de 10,00 mg/L.

Antes da injeção de cada amostra, foi adicionado o ácido m-cumárico na concentração de 10,00 mg/L(PI).

Para cada estudo, foi calculado o percentual de recuperação dos analitos (ácidos ferúlico e p-cumárico) e do PS na amostra e no branco fortificados. Optou-se por usar como padrão *surrogate* o ácido que proporcionou maiores valores percentuais de recuperação.

2.5.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO INTERNA

Assim como foi feito para a padronização externa, procedeu-se a avaliação do método otimizado aplicando a padronização interna, onde os parâmetros analisados neste caso foram: resposta linear; limite de detecção; limite de quantificação; repetitividade, precisão intermediária e exatidão (recuperação) do método. Da mesma forma, todos os estudos foram realizados com a análise em réplica e branco da análise.

2.5.2.1 RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO

Foi construída uma curva de calibração, em triplicata, para os ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e chiquímico com os seguintes níveis de concentração: 3,00; 6,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00 e 30,00 mg/L. A todos os pontos da curva foram adicionados os ácidos m-cumárico (PS) e o-cumárico (PI) na concentração final de 10,00 mg/L cada. O comportamento linear foi avaliado através dos gráficos de fator de resposta em função da concentração dos analitos análise e do coeficiente de Pearson (r), onde adotou-se a condição de $r > 0,999$.

2.5.2.2 CURVAS ANALÍTICAS

Curvas analíticas foram construídas para cada um dos analitos. Foram injetados 20 μ L de soluções padrões trabalho da mistura dos seis ácidos fenólicos na faixa de concentração de 3,00 a 20,00 mg/L para os ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e chiquímico e 10,00 mg/L para o PI e o PS, diluídos a partir de uma solução intermediária 100,00 mg/L.

2.5.2.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO, REPETITIVIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Para se determinar a repetitividade e os limites de detecção e quantificação do método, seis réplicas da amostra *Cynodon dactylon* cv. Coast-cross (15,0 mg), adicionadas com o m-cumárico (PS) na concentração final de 10mg/L, foram submetidas à extração em ultra-som por 2h. Como citado no tópico 2.4.1.3, esse tipo de tratamento permite extrair da amostra somente os ácidos p-cumárico e ferúlico éster ligados, logo, as amostras foram fortificadas com os ácidos chiquímico e cafeico.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados respectivamente como 3 e 10 vezes o desvio padrão das análises [78, 80].

A avaliação da precisão intermediária foi realizada através da análise de uma mesma amostra em dias diferentes [78], onde utilizou-se neste estudo uma amostra de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. A precisão intermediária e repetitividade foram avaliadas através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) das análises [78].

2.5.2.4 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS

Assim como no tópico 2.4.1.5, a avaliação da exatidão do método foi realizada através da recuperação no processo de extração da amostra *Cynodon dactylon* cv. Coast-cross, da mesma fortificada, branco e do branco fortificados com uma mistura padrão dos ácidos. Porém neste caso, o estudo foi realizado aplicando somente a extração em ultra-som na condição final estabelecida no método.

Desta forma, foi realizada a extração de 25,0 mg da amostra e da mesma fortificada (em triplicata) com os padrões dos ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e chiquímico em três níveis de concentração: 5,00; 7,50 e 10,00 mg/L, onde em todas as amostras foram adicionadas solução padrão de m-cumárico (PS) obtendo-se a concentração final de 10,00 mg/L. Foi avaliada também a recuperação do branco da análise e do branco fortificado com os

mesmos padrões obtendo-se a concentração final de 10,00 mg/L para todos, em cinco repetições.

2.6 AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS

As gramíneas foram semeadas em novembro de 2001, na Estação Experimental da Agência Rural, no município de Anápolis-GO. As amostras foram oriundas do período das águas (outubro, dezembro, janeiro e fevereiro) dos anos 2004 e 2005. As amostras foram colhidas a cada 30 dias manualmente, com o auxílio de cutelo, secas em estufas de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas, moídas em moinho tipo faca de 1 mm e armazenadas em frascos de polietileno para posterior análise.

2.6.1 CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de forrageira foram fornecidas pela Embrapa Gado de Leite. No total foram 44 amostras de quatro espécies: *Cynodon nlemfuenses* cv. Florona, *Cynodon dactylon* cv. Florakirk, *Cynodon dactylon* cv. Coast-cross, *Panicum maximum* cv. Mombaça e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. As amostras foram classificadas e separadas em função do gênero, cultivar, fração (caule e folha), repetição (R1 ou R2), adubação (doses de Nitrogênio: 150 ou 300 kg/ha de N) e irrigação (com ou sem) (TABELA 2.1).

Como não existe amostra de referência para os compostos estudados em matriz de forrageira, para a avaliação do método foram empregadas amostras de Mombaça folha e de *Cynodon dactylon*, cv Coast-cross (folha e caule). Sendo esta última, amostra controle empregada pelo Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Leite para controle de qualidade de suas análises.

Como o interesse deste trabalho foi avaliar as concentrações de ácidos fenólicos no caule e na folha, separadamente, a amostra *Cynodon dactylon*, cv Coast-cross foi utilizada somente para avaliação do método devido ao fato de ser uma mistura das duas frações.

TABELA 2.1: Classificação das amostras de forrageira analisadas.

Amostra	Fração	Dose de N	Irrigação	repetição	CÓDIGO
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	caule	150	com	R1	A1
				R2	A2
		sem	R1	B1	
			R2	B2	
		300	com	R1	C1
			R2	C2	
	sem	R1	D1		
		R2	D2		
	folha	150	com	R1	E1
				R1	F1
		sem	R2	F2	
			R1	G1	
300		com	R2	G2	
		sem	R1	H1	
<i>Cynodon dactylon</i> cv. Florakirk	caule	150	com	R1	I1
				R2	I2
	folha	300	com	R1	J1
				R2	J2
<i>Cynodon nlemfuenses</i> cv. Florona	caule	150	sem	R1	K1
				R2	K2
	300	com	R1	L1	
			R2	L2	
	folha	150	com	R1	M1
				R2	M2
		sem	R1	N1	
			R1	O1	
		300	com	R2	O2
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	caule	150	com	R1	P1
				R2	P2
		sem	R1	Q1	
			R2	Q2	
		300	com	R1	R1
				R2	R2
	sem		R1	S1	
			R2	S2	
	folha	150	com	R1	T1
				R2	T2
			sem	R1	U1
				R2	U2
		300	com	R1	V1
				R2	V2
sem			R1	X1	
			R2	X2	

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

Valores não adequados de fator de simetria comprometem a reprodutibilidade do tempo de retenção, aumentam a imprecisão da quantificação, além de interferir nos cálculos da resolução e do número de pratos teóricos, portanto é conveniente que seus valores estejam entre 0,9 e 1,3. Além disso, valores de fator de simetria maiores que 1,5 podem indicar a necessidade de se trocar a coluna cromatográfica [79].

A análise dos valores de resolução (Equação 3.1) entre os pares de compostos devem ser acompanhados quando se pretende obter uma medida quantitativa da separação realizada [79]. De acordo com Collins *et al.* [81], valores de resolução superiores a 1,25 são suficientes para a quantificação.

$$R = \frac{(2.35/2)(tr_b - tr_a)}{W_{1/2_a} + W_{1/2_b}} \quad \text{[Equação 3.1]}$$

Onde tr_b e tr_a são os tempos de retenção do segundo e primeiro compostos a eluir, respectivamente; $W_{1/2a}$ e $W_{1/2b}$ são a largura do pico à meia altura para o primeiro e segundo composto a eluir respectivamente [82].

Inicialmente realizou-se um gradiente exploratório em diferentes valores de pH com cada um dos solventes orgânicos: metanol, acetonitrila e tetraidrofurano. E, a partir dos gradientes foram selecionadas as condições iniciais para a otimização da separação isocrática.

3.1.1 ESTUDO DO pH DA FASE MÓVEL

Para cada solvente orgânico (metanol, acetonitrila e tetraidrofurano) e cada valor de pH foi otimizada a melhor separação isocrática dos ácidos chiquímico, cafeico, p-cumárico e ferúlico, empregando uma fase móvel (FM) composta pelo solvente orgânico e por uma solução de ácido ou tampão, dependendo do valor de pH. Porém, em alguns casos, a melhor condição alcançada não proporcionou total separação dos ácidos.

A partir destes resultados, foram construídos gráficos dos tempos de retenção (t_r) em função do pH, área em função do pH e simetria em função do pH para as condições otimizadas para cada um destes solventes, onde na FIGURA 3.1 são mostrados esses gráficos para as condições otimizadas com o metanol (MeOH). Pela análise desses gráficos foi possível avaliar, juntamente com os cromatogramas, qual o valor de pH que proporcionou melhores parâmetros de separação (t_r , área, simetria, resolução, etc).

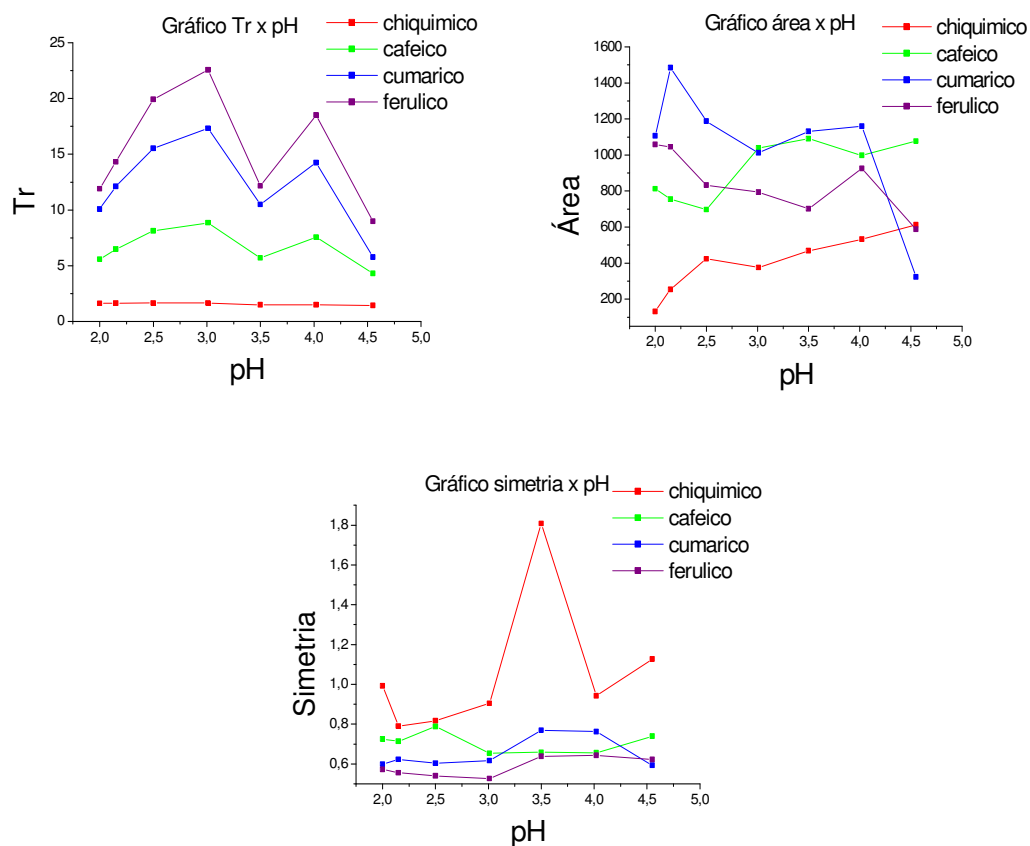


FIGURA 3.1: Gráficos da influência do pH no t_r , na área e na simetria dos ácidos eluídos com FM composta por solução de ácido ou tampão e MeOH.

Avaliando esses gráficos e os cromatogramas notou-se que para os três solventes, os valores mais baixos de pH apresentaram melhores perfis cromatográficos. Observou-se que o aumento de pH implicou num maior tempo de retenção dos compostos, logo, maior tempo de corrida (FIGURA 3.1).

Além disso, os ácidos ferúlico e p-cumárico apresentaram uma diminuição de área, devido ao aumento da área do pico secundário desses

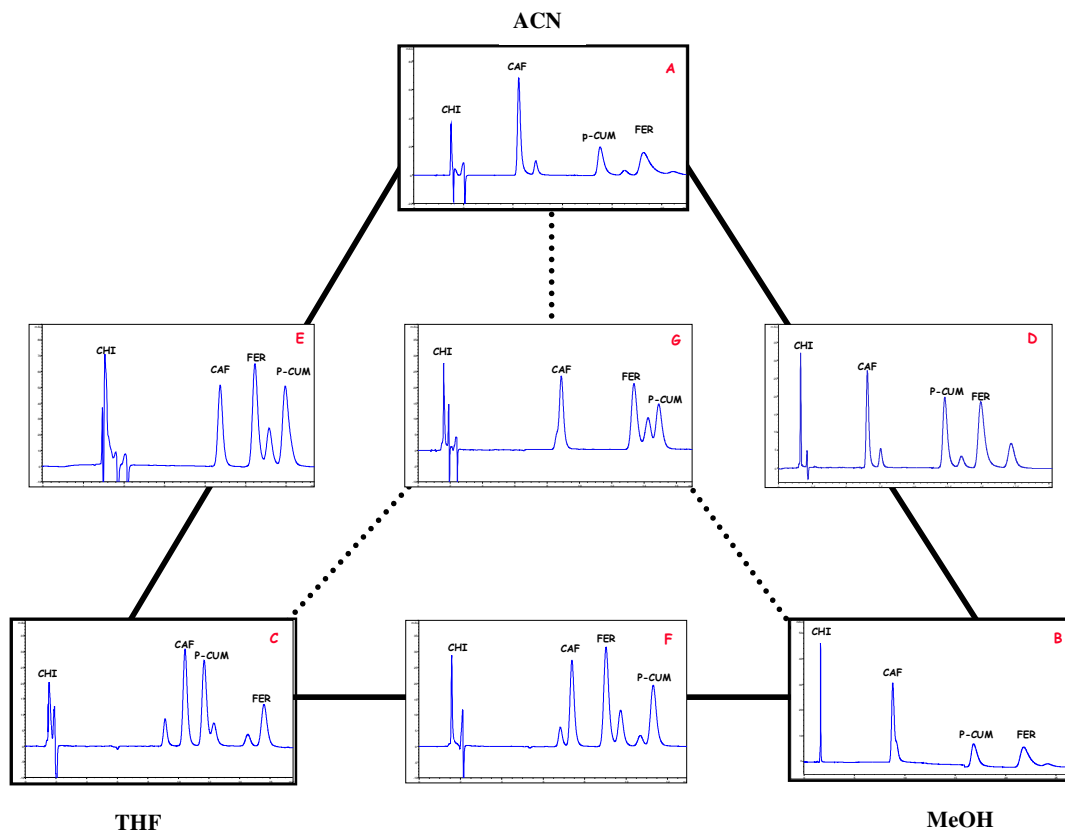
compostos. Isso pode ser explicado pelo fato dos estudos envolverem compostos fracamente ácidos (FIGURA 1.2), onde de uma maneira geral, os ácidos fenólicos apresentam valores de pKa em torno de 4,5 e 9,5 [83]. Desta forma optou-se em trabalhar com pH=2,05, pois neste valor de pH tem-se a supressão da ionização.

Para o valor de pH 2,05, foram otimizadas duas condições de separação, uma utilizando tampão fosfato, e outra utilizando solução aquosa de ácido fosfórico. Observou-se que os cromatogramas obtidos para essas duas condições não apresentaram diferenças consideráveis. Devido a esse fato, optou-se por trabalhar com a solução aquosa de ácido fosfórico em pH=2,05, pois o preparo da solução é mais simples e evita-se a cristalização de sais na coluna cromatográfica.

3.1.2 ESTUDO DA PROPORÇÃO DO SOLVENTE NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

A maior dificuldade enfrentada na otimização das condições de separação dos compostos foi alcançar a separação dos ácidos ferúlico, cafeico e p-cumárico de seus respectivos picos secundários. Como citado no tópico 2.2.1.2, no estudo da composição da fase móvel foi aplicado o diagrama triangular para a separação dos ácidos.

Inicialmente, foi estabelecida a melhor condição de separação para cada sistema, onde a fase móvel foi composta de solução aquosa de ácido fosfórico pH=2,05 e cada um dos três solventes orgânicos selecionados para o estudo (metanol, acetonitrila e tetraidrofurano). Neste caso foram estudados três sistemas, onde os cromatogramas nos vértices do triângulo (FIGURA 3.2.A, 3.2.B, 3.2.C) correspondem às condições otimizadas em cada sistema com a fase móvel composta pela solução aquosa de ácido fosfórico pH=2,05 e solventes, onde esses resultados representam as três primeiras etapas da otimização da separação através do diagrama triangular. Nas três condições os perfis cromatográficos não foram satisfatórios, ou por apresentar alargamento de banda (FIGURA 3.2.A), ou por apresentar coeluição dos compostos com seus respectivos picos secundários (FIGURA 3.2.B, 3.2.C), desta forma optou-se por testar a separação com uma mistura de solventes.



- A) ACN/solução H_3PO_4 pH=2,05 (18:82);
 B) MeOH/solução H_3PO_4 pH=2,05 (25:75);
 C) THF/solução H_3PO_4 pH=2,05 (20:80);
 D) ACN/MeOH/solução H_3PO_4 pH=2,05 (10:12,5:77,5);
 E) MeOH/THF/solução H_3PO_4 pH=2,05 (14:13:73);
 F) ACN/THF/solução H_3PO_4 pH=2,05 (9:18:73);
 G) ACN/MeOH/THF/solução H_3PO_4 pH=2,05 (6:8:7:79).

FIGURA 3.2: Aplicação do método de desenvolvimento triangular para a separação dos quatro ácidos. Cromatogramas da mistura padrão dos ácidos 10,00 mg/L. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm), fluxo de 1mL/min, detecção em 236nm e em diferentes FM.

Sendo assim, o segundo passo evoluiu a otimização da separação com uma mistura de dois dos três solventes (FIGURA 3.2.D, 3.2.E, 3.2.F) e finalmente a separação com a mistura dos três solventes (FIGURA 3.2.G). Onde a melhor separação foi proporcionada pela fase móvel composta por ACN/MeOH/solução H_3PO_4 pH=2,05 (10:12.5:77.5), a um fluxo de 1 mL/min e pressão de trabalho em torno de 100 bar (FIGURA 3.2.D).

Definida a condição de separação dos quatro ácidos (chiquímico, cafeico, p-cumárico e ferúlico), foram incluídos os ácidos m-cumárico e o-cumárico. Com a inclusão desses ácidos, foi necessária uma pequena alteração na composição da fase móvel, conduzindo a uma melhor resolução do cromatograma, chegando-se a seguinte condição final: ACN/MeOH/solução H₃PO₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5) (FIGURA 3.3).

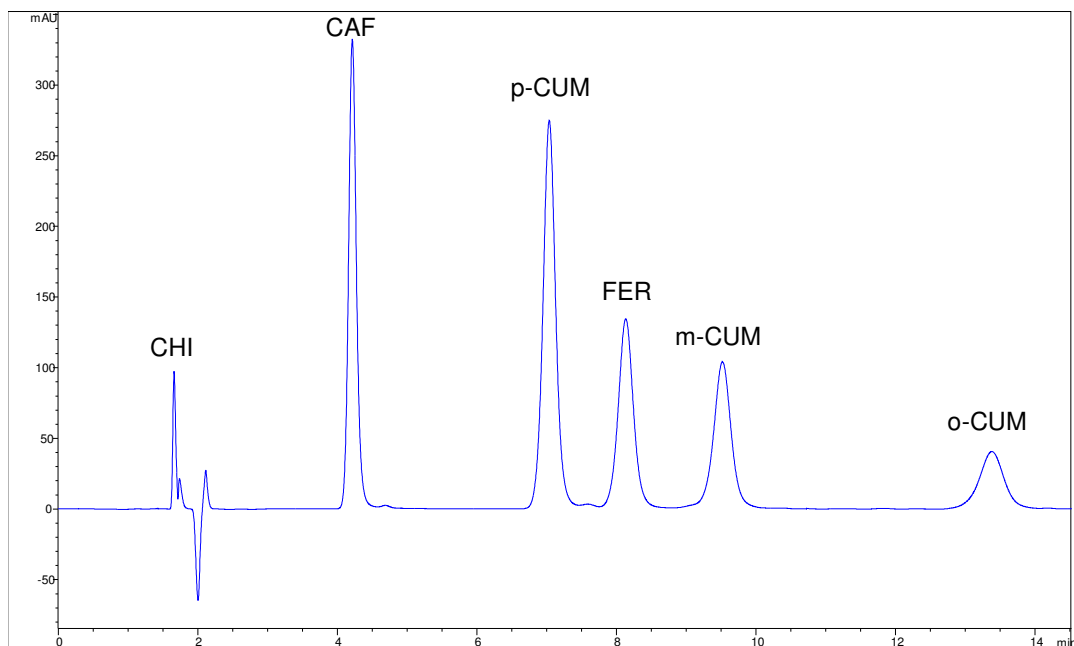


FIGURA 3.3: Cromatograma da mistura padrão dos seis ácidos na concentração de 20,00 mg/L. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm); FM: ACN/MeOH/solução H₃PO₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); fluxo: 1mL/min; pressão de trabalho 110 bar.

3.1.3 PROGRAMAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA PARA DETECÇÃO

Parâmetros como comprimento de onda para análise ($\lambda_{\text{análise}}$), largura da banda e até mesmo ajuste de linha base podem ser estabelecidos a fim de se aumentar a sensibilidade da análise e evitar interferências de compostos indesejáveis na detecção.

O detector de múltiplos comprimentos de onda permite monitorar simultaneamente até cinco comprimentos de onda distintos, com larguras de bandas diferentes ou não, obtendo-se assim cinco cromatogramas com sinais

diferentes para a mesma separação obtida para uma única injeção da amostra. Além do monitoramento contínuo em um único λ durante o tempo total para eluição da amostra, outro recurso é a programação dos parâmetros do detector ($\lambda_{\text{análise}}$, largura da banda e ajuste de linha base) em função do tempo de retenção dos compostos de interesse e possíveis interferentes.

Essa variação dos comprimentos de onda para detecção conforme o tempo de eluição proporciona o aumento da intensidade do sinal. Logo, melhora a sensibilidade, melhorando os limites de detecção e quantificação do método. Isso porque, a programação empregada para o detector leva em consideração os comprimentos de onda onde há máxima absorção dos analitos. Os comprimentos de onda e os respectivos intervalos selecionados para as análises são mostrados na TABELA 3.1.

TABELA 3.1: Valores de λ de leitura do detector programados em função do tempo de análise.

Compostos eluídos no intervalo	Intervalo (min)	λ (nm)
Ácido chiquímico	0 a 3,0	236
Ácidos cafeico, p-cumárico e ferúlico	3,0 a 9,1	316
Ácidos m-cumárico e o-cumárico	9,1 a 15	236

A FIGURA 3.4 A mostra a sobreposição dos cromatogramas registrados nos comprimentos de onda 236 nm e 316 nm, e a FIGURA 3.4 B mostra o cromatograma registrado com programação de comprimento de onda. Observa-se que ao utilizar a programação de comprimentos de onda foi possível obter incrementos de sinal para os ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico ao se comparar com a medição em comprimento de onda fixo em 236 nm, no qual inicialmente os estudos foram realizados.

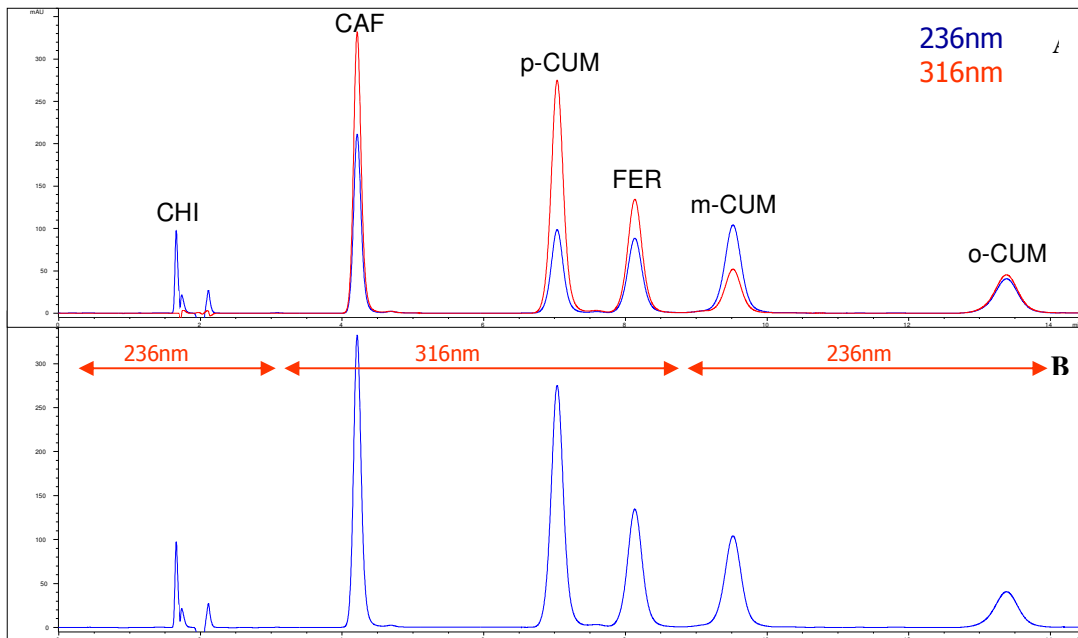


FIGURA 3.4: Cromatogramas da mistura padrão dos seis ácidos na concentração de 20,00 mg/L. A - Sobreposição dos sinais registrados em 236 nm e 316 nm. B - Cromatograma obtido após a leitura com programação de comprimento de onda. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μ m); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μ m); FM: ACN/MeOH/solução H₃PO₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); Fluxo: 1mL/min.

3.1.4 CONDIÇÃO OTIMIZADA PARA ANÁLISE NO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

A condição otimizada para análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência está esquematizada na TABELA 3.2.

TABELA 3.2: Condição otimizada para análise no HPLC.

Condição estabelecida	
Coluna	C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μ m)
Coluna de guarda	ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μ m)
Fase móvel	ACN/MeOH/solução H ₃ PO ₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5)
Fluxo da fase móvel	1mL/minuto
Tempo total da análise	15 minutos
Deteção	Programação do detector: 0 a 3 min: 236 nm; 3 a 9,1 min: 316 nm; 9,1 a 15 min: 236 nm

Os parâmetros cromatográficos e a respectiva ordem de eluição obtidos para análise em HPLC dos seis ácidos estudados nas condições otimizadas estão dispostos na TABELA 3.3. Onde, tempo de retenção relativo (tr_r) é um parâmetro que deve variar pouco no decorrer das análises, sendo assim um parâmetro de controle do desempenho do método, podendo ser aplicado na identificação de picos.

TABELA 3.3: Parâmetros de separação obtidos para mistura padrão dos seis ácidos (20,0 mg/L).

ANALITO	Tempo de retenção (min)	Resolução	Simetria	tr_r
Ácido chiquímico	1,660	-	0,91	-
Ácido cafeico	4,214	10,95	0,86	-
Ácido p-cumárico	7,037	9,03	0,95	1,670
Ácido ferúlico	8,133	1,76	0,96	1,930
Ácido m-cumárico	9,520	3,28	0,99	2,259
Ácido o-cumárico	13,382	7,02	1,05	3,176

Tempo de retenção relativo (tr_r) = $tr_{\text{analito}} / tr_{\text{ácido cafeico}}$

Vale ressaltar que a resolução do ácido ferúlico foi calculada considerando o pico secundário do ácido p-cumárico, que elui entre os dois compostos.

Conforme citado, Deschamps & Ramos [11] otimizaram um método de separação para sete ácidos fenólicos, dentre eles os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, o-cumárico e m-cumárico por padronização externa, onde o último composto a eluir foi o ácido o-cumárico, apresentando um tempo de retenção acima de 36 min, resultando em um tempo total de corrida de 45 min. Já no presente trabalho, o mesmo ácido apresenta um tempo de retenção de 13,382 min (TABELA 3.3), assim, cada corrida tem a duração de 15 min, que representa um grande ganho no tempo de análise se comparado com o método proposto por Deschamps & Ramos (2002).

A vantagem deste método sobre os demais trabalhos citados no item 1.4, é que foi possível otimizar a separação dos compostos estudados utilizando um eluição isocrática e fluxo de 1mL/min. Isso porque os demais autores trabalharam com fluxos de 1,5 e 3 mL/min ou com eluição por gradiente [10,12,15,46,55].

3.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS PADRÕES

Durante os estudos da FM, observou-se que os ácidos cafeico, p-cumárico e ferúlico apresentaram um pequeno pico secundário além do pico principal. Esse pico mostrou-se quase imperceptível quando as soluções foram preparadas e injetadas no dia do preparo das soluções estoques de 1000,0 mg/L. Porém, quando as soluções injetadas (soluções trabalho) foram preparadas alguns dias após o preparo da solução estoque, observou-se um aumento na área desses picos secundários, o que poderia comprometer as análises.

Como citado no item 2.3.2, as soluções utilizadas neste estudo foram preparadas conforme mostrado no esquema da FIGURA 2.1, onde MIX 6 é uma solução padrão mistura composta pelos seis ácidos.

A FIGURA 3.5 apresenta o resultados obtidos para as soluções estoque, intermediária e trabalho preparadas e analisadas no mesmo dia, sendo os cromatogramas referentes às injeções das soluções trabalho A, B, C, D, E e F. Observou-se que as soluções estoque, intermediária e trabalho diluídas em MeOH (solução B) ou ACN (solução E) não apresentaram resultados satisfatórios. Aparentemente o solvente empregado na diluição da solução trabalho foi o que mais influenciou no perfil do cromatograma, onde fica evidente que a melhor condição foi obtida através da diluição da solução trabalho em fase móvel, independente do solvente (MeOH, ACN ou FM) empregado para a diluição da solução intermediária.

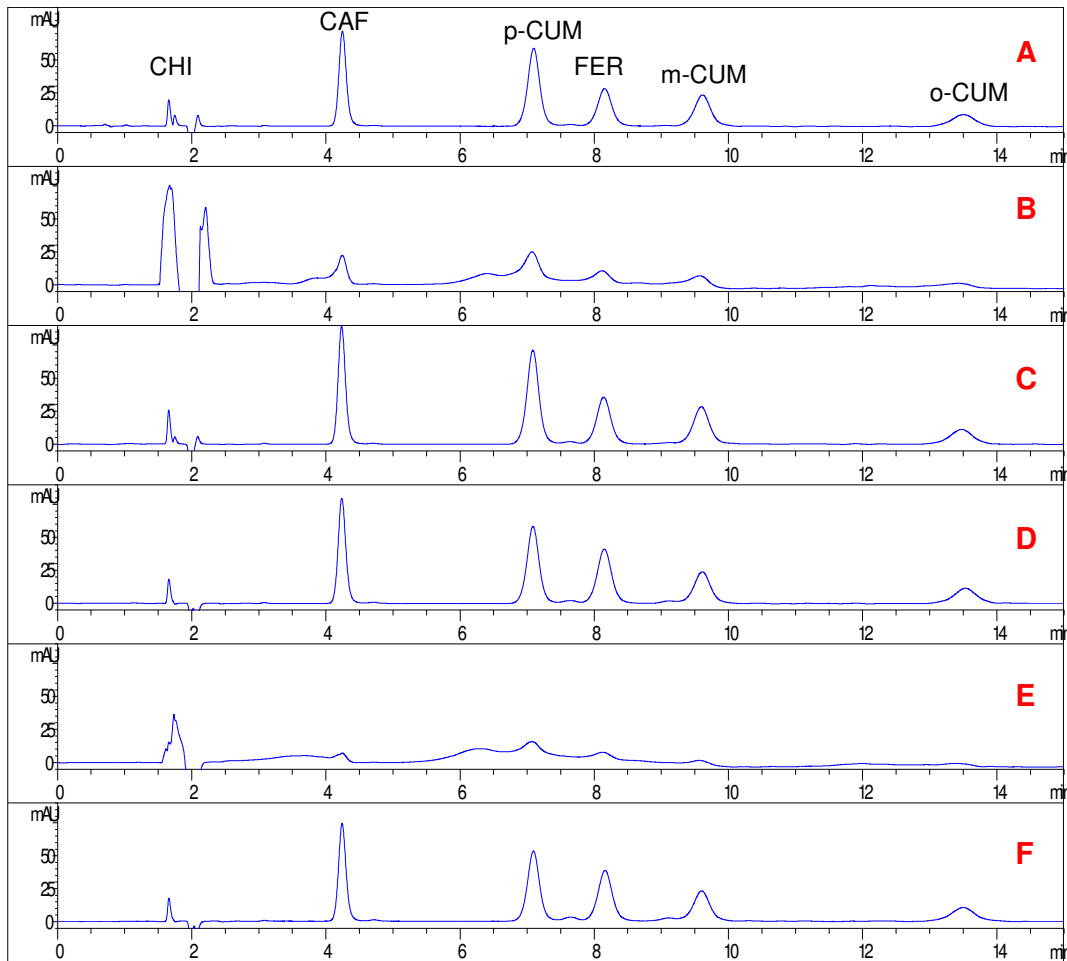


FIGURA 3.5: Cromatogramas do teste de estabilidade das soluções padrões. A: solução A; B: solução B; C: solução C; D: solução D; E: solução E; F: solução F. FM: ACN/MeOH/solução H_3PO_4 pH=2,05 (13:12,5:74,5); Fluxo: 1mL/min.

No caso das soluções preparadas a partir da estoque 1000,00 mg/L diluída em metanol, observou-se que na solução C (solução intermediária e solução trabalho diluídas em FM) os ácidos cafeico e p-cumárico apresentaram sinal um pouco maior se comparado com a solução A (solução intermediária diluída em MeOH e solução trabalho diluída em FM).

Já para a solução estoque 1000,00 mg/L diluída em acetonitrila, observou-se que o cromatograma da solução F (solução intermediária e solução trabalho diluídas em FM) não apresentou diferenças significativas frente ao cromatograma da solução D (solução intermediária diluída em ACN e solução trabalho diluída em FM).

Frente a esses resultados, escolheu-se realizar os testes de estabilidade com as soluções C e F. Assim, novas soluções C e F foram preparadas e injetadas 1, 7 e 17 dias após o preparo das soluções estoque. Estas amostras foram injetadas juntamente com as soluções C e F do primeiro dia.

Foi possível observar que as soluções C e F não foram estáveis de um dia para o outro, pois os picos secundários dos ácidos cafeico, p-cumárico e ferúlico apresentaram um aumento considerável em suas áreas.

Na FIGURA 3.6 estão os cromatogramas obtidos para a solução C injetada no dia do preparo da solução estoque e 1, 7 e 17 dias após. Foi possível observar um aumento considerável nas áreas dos picos secundários após uma semana, acarretando numa diminuição de 31 e 21% nas áreas dos picos principais dos ácidos p-cumárico e ferúlico, respectivamente. Vale ressaltar que a solução F apresentou o mesmo tipo de comportamento, concluindo-se que as soluções estoque 1000,00 mg/L foram estáveis por uma semana, onde a variação das áreas dos picos secundários foi mínima.

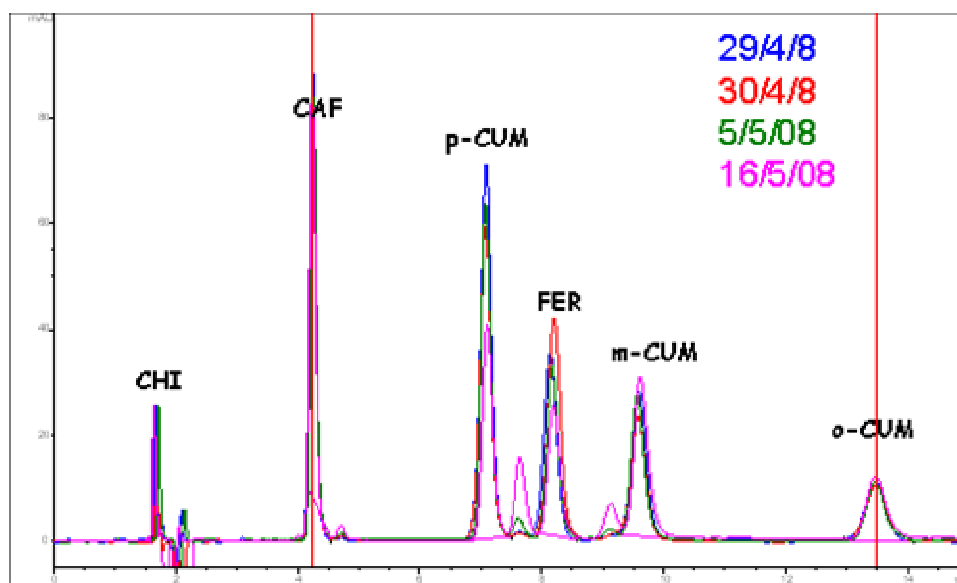


FIGURA 3.6: Cromatogramas da mistura padrão dos seis ácidos na concentração de 6,00 mg/L diluída em fase móvel na data da injeção, solução intermediária diluída em fase móvel e solução estoque diluída em metanol. Coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm); FM: ACN/MeOH/solução H₃PO₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); Fluxo: 1mL/min.

Notou-se que não houve diferenças entre os cromatogramas das soluções trabalho cuja solução estoque foi preparada em metanol ou em acetonitrila. Logo a condição selecionada foi com a diluição da solução estoque em metanol, solução intermediária em fase móvel e trabalho em fase móvel.

3.3 EXTRAÇÃO DA AMOSTRA

Os estudos de extração em ultra-som (US) foram realizados extraíndo a amostra (25,0 mg) a temperatura ambiente com uma solução de NaOH 1M nos seguintes tempos de sonicação: 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 min (item 2.4)

As análises foram realizadas em triplicata e para avaliar o tempo ideal de sonicação, foi construído um gráfico das médias das concentrações dos ácidos p-cumárico e ferúlico em função do tempo de sonicação (FIGURA 3.7). Observa-se que os tempos de sonicação entre 15 a 90 minutos não foram suficientes para extrair completamente os ácidos éster ligados, sendo que a concentração máxima foi alcançada na faixa entre 120 e 150 min de sonicação. Após 150 minutos de sonicação, houve uma queda nas concentrações, possivelmente devido a degradação dos analitos.

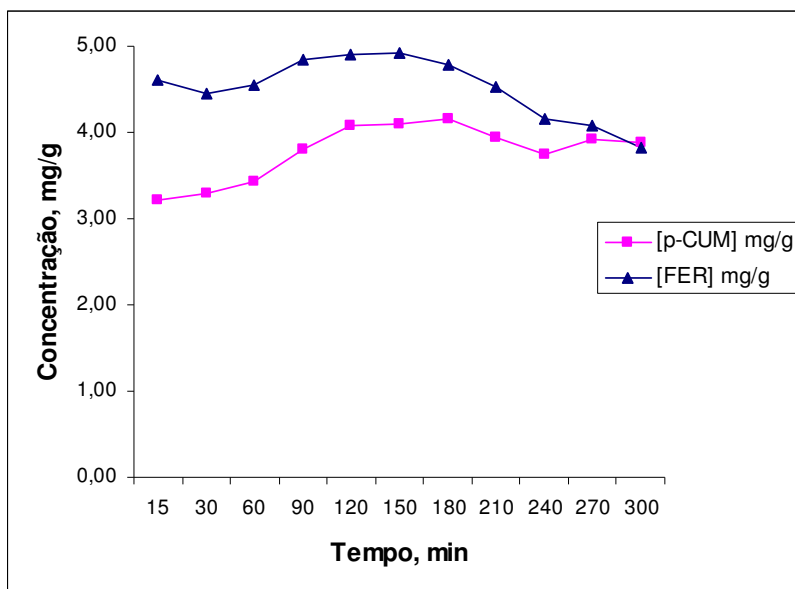


FIGURA 3.7: Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos ferúlico e p-cumárico obtidas da extração em ultra-som de 25,0 mg de Mombaça folha.

Comparando-se as concentrações obtidas para o tempo de sonicação de 120 min com as concentrações obtidas na extração em banho ultratermostático (TABELA 3.4), observou-se que o ultra-som apresentou menores valores de desvio-padrão, indicando menor dispersão dos dados, mostrando que este método é mais reproduzível.

TABELA 3.4: Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos p-cumárico e ferúlico para a amostra Mombaça folha extraída em banho a 20° C por 24 h e em ultra-som a temperatura ambiente por 2 h.

Réplica	BANHO (20° C por 24h)		US (t ambiente por 2h)	
	p-CUM (mg/g peso seco)	FER (mg/g peso seco)	p-CUM (mg/g peso seco)	FER (mg/g peso seco)
1	4,48	4,75	4,08	4,93
2	4,39	4,52	4,09	4,93
3	4,20	4,42	4,05	4,88
média	4,35	4,56	4,07	4,91
Sd	0,14	0,17	0,03	0,03
DPR	3,2	3,7	0,6	0,7

p-CUM = ácido p-cumárico; FER = ácido ferúlico; Sd = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

Aplicando o teste t entre os dois métodos de extração, obteve-se os valores de $t = 3,52$ e $t = 3,38$ para os ácidos ferúlico e p-cumárico, respectivamente. Como o valor tabelado de t, a 95% de confiança, é de 4,30, conclui-se que não há diferenças entre os dois métodos de extração. Desta maneira, optou-se por substituir a extração descrita na literatura (20° C por 24 h) pela extração por ultra-som a temperatura ambiente, sendo o tempo de 120 minutos de sonicação ideal para extração das amostras.

Além da melhor reprodutibilidade, o método proposto utilizando o ultra-som é mais rápido, sendo necessário apenas 2h para tratamento das amostras, enquanto que a extração no banho ultratermostático leva 24 h.

3.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO EXTERNA

3.4.1 RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO

Foi construída uma curva de calibração para os seis ácidos e para cada um deles foi determinado o fator de resposta dos pontos da curva, que é dado pela razão entre a área e a concentração do analito. Por fim, plotou-se o gráfico

de fator de resposta em função da concentração para os seis ácidos (FIGURA 3.8). Esses gráficos são geralmente construídos em função do logaritmo da concentração, mas como neste caso, o estudo da resposta linear não envolve uma faixa muito ampla de concentração, é válido traçar gráfico do fator de resposta em função da concentração do analito [79].

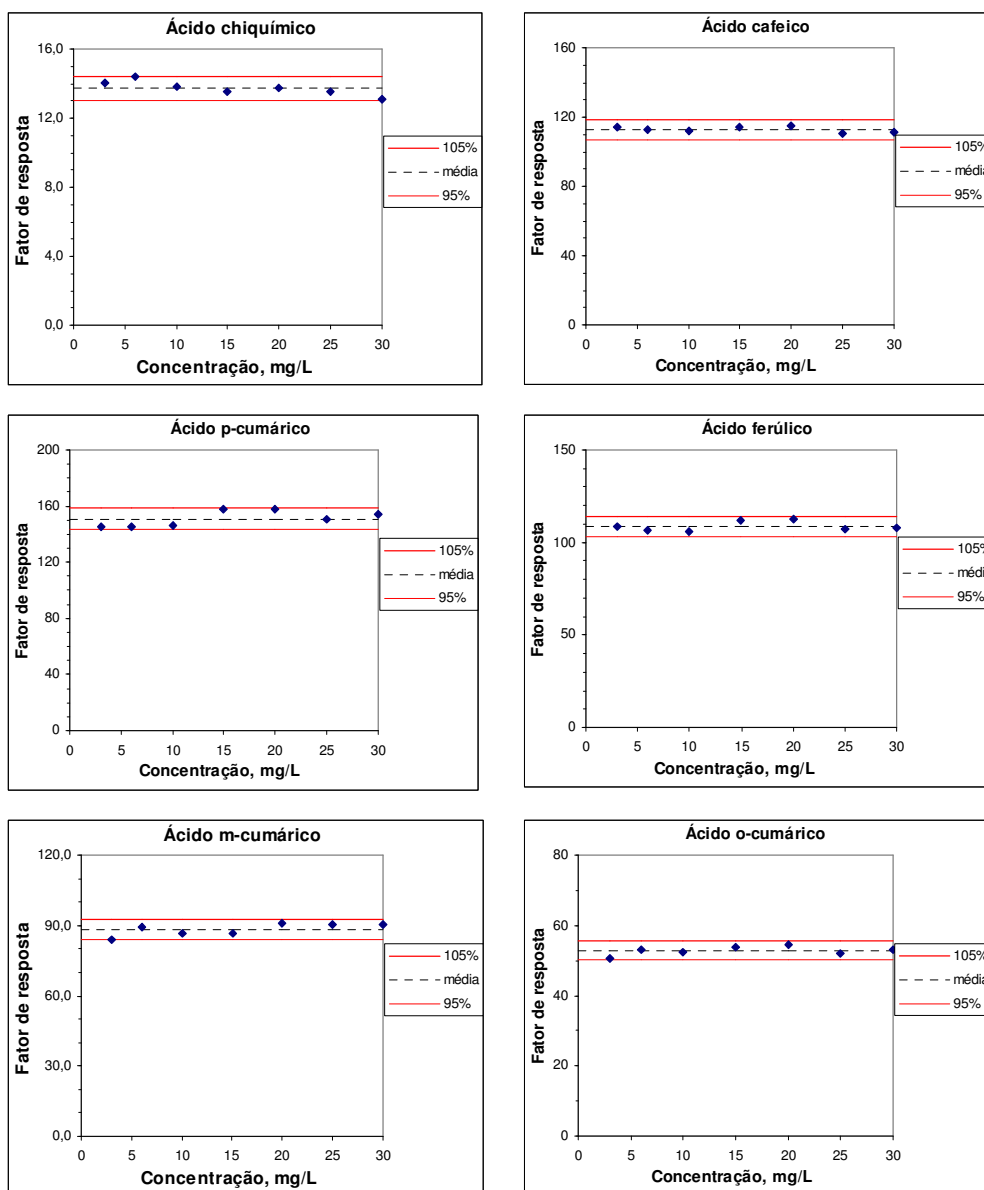


FIGURA 3.8: Gráficos do fator de resposta dos ácidos chiquímico, cafeico, ferúlico, p-cumárico, m-cumárico e o-cumárico por padronização externa.

Também foram traçadas nos gráficos, as linhas horizontais paralelas referentes à média dos valores de fator de resposta e à 95 e 105% dessa

média. Para que o método seja linear, os valores de fator de resposta devem ser independentes da concentração, e devem estar entre as linhas horizontais referentes a 95 e 105% da média dos valores de fator de resposta, podendo interceptá-las [78, 79]. E é o que observou-se na FIGURA 3.8, levando à conclusão de as curvas de calibração são lineares na faixa estudada.

3.4.2 CURVAS ANALÍTICAS

Como critério, as curvas analíticas devem apresentar coeficientes de correlação $r \geq 0,999$. Neste caso, os coeficientes de correlação para os 6 compostos variaram entre 0,99935 (ácido p-cumárico) e 0,99999 (ácido o-cumárico). A FIGURA 3.9 mostra as curvas analíticas para os 6 compostos conforme a ordem de eluição.

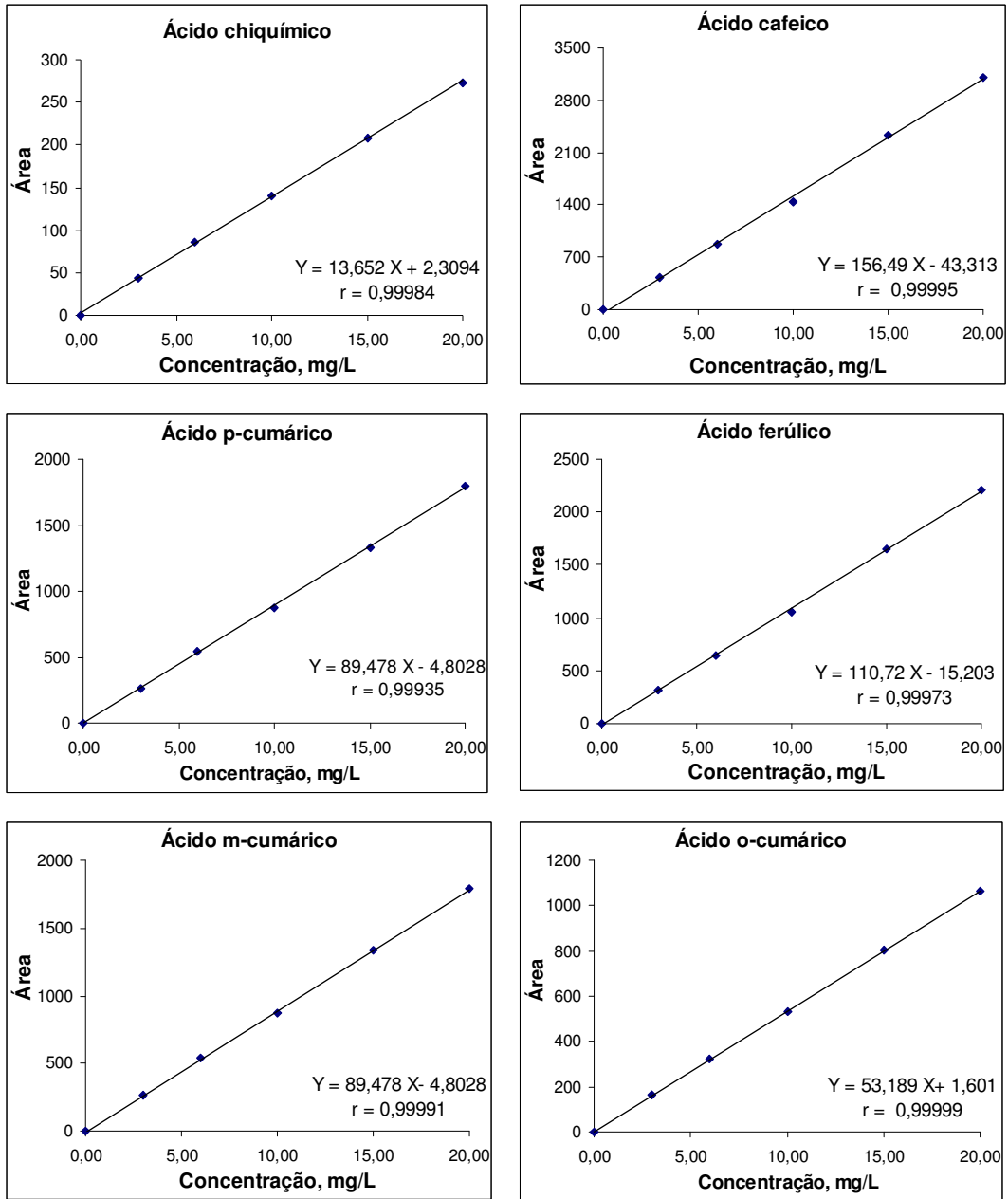


FIGURA 3.9: Curvas analíticas por padronização externa obtidas para a injeção em triplicata da mistura padrão dos ácidos chiquímico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, m-cumárico e o-cumárico nas concentrações 0,00; 3,00; 6,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mg/L.

3.4.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO E REPETITIVIDADE

Os valores dos limites de detecção do método (LD) e de quantificação do método (LQ) calculados para a matriz estão dispostos na TABELA 3.5, onde é possível observar que somente os ácidos p-cumárico, ferúlico, m-cumárico e o-cumárico apresentaram resultados.

TABELA 3.5: Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade obtidos para uma massa da amostra Mombaça folha de 25,0 mg (n = 6).

Analito	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	DPR (%)
Ácido chiquímico	-	-	-
Ácido cafeico	-	-	-
Ácido p-cumárico	0,33	1,11	4,3
Ácido ferúlico	0,33	1,12	4,1
Ácido m-cumárico	0,38	1,28	3,5
Ácido o-cumárico	0,41	1,36	4,4

LD = limite de detecção do método; LQ = limite de quantificação do método; DPR = desvio padrão relativo percentual

Apesar de ser detectado, o ácido chiquímico não foi quantificado na amostra fortificada, pois apresentou coeluição com componentes presentes na amostra e também provenientes dos reagentes adicionados durante o processo de extração (FIGURA 3.10). Também foi possível verificar que o ácido cafeico é instável às condições de extração, pois nenhum sinal foi detectado no tempo de retenção do composto (FIGURA 3.10). Por esses motivos, não foram estabelecidos os limites de detecção e quantificação para os ácidos chiquímico e cafeico.

Já os resultados referentes à repetitividade são satisfatórios considerando-se as etapas de tratamento e transferências envolvidos, bem como as características das amostras como, por exemplo, tamanho das partículas. Os valores encontrados estão em conformidade com os relatados por Dey *et al.* [52], que considera aceitável uma variação de até 10%.

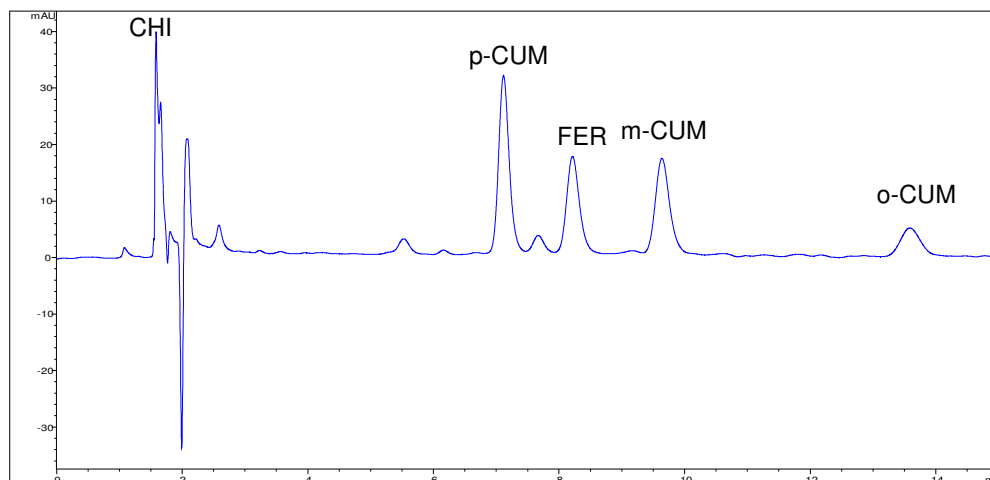


FIGURA 3.10: Cromatograma obtido para amostra Mombaça folha fortificada com os ácidos chiquímico (5,00 mg/L), cafeico (2,00 mg/L), m-cumárico (3,70 mg/L) e o-cumárico (3,00 mg/L) para estabelecimento do LD e LQ. FM: ACN/MeOH/solução H₃PO₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5); Fluxo: 1mL/min.

3.4.4 SELETIVIDADE

A amostra *Cynodon* (25,0 mg) foi extraída em triplicata em banho ultratermostático e os ácidos p-cumárico e ferúlico foram quantificados em três comprimentos de onda diferentes (236, 286 e 316 nm). Para avaliar quaisquer diferenças entre os valores de concentrações calculados nos três comprimentos de onda, aplicou-se o teste t entre as concentrações encontradas em 236 nm e 316 nm e entre 286 nm e 316 nm (TABELA 3.6).

TABELA 3.6: Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos p-cumárico e ferúlico na amostra *Cynodon* (25,0 mg) em diferentes comprimentos de onda.

	p-CUM (mg/g peso seco)			FER (mg/g peso seco)		
	236nm	286nm	316nm	236nm	286nm	316nm
Réplica 1	5,69	5,70	5,70	4,94	4,92	4,93
Réplica 2	6,06	6,07	6,03	4,84	4,83	4,86
Réplica 3	5,60	5,60	5,60	4,80	4,78	4,80
média	5,78	5,79	5,77	4,86	4,84	4,86
DPR (%)	4,2	4,3	3,9	1,4	1,5	1,3
t _{236/316}	0,045	-	-	0,041	-	-
t _{286/316}	-	0,082	-	-	0,415	-

p-CUM = ácido p-cumárico; FER = ácido ferúlico; DPR = desvio padrão relativo percentual

Observou-se que para todos os casos, o $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o t_{tabelado} (2,776), concluindo que não houve diferenças significativas (95% de confiança) entre os valores encontrados, o que mostra que os ácidos foram quantificados sem interferência de outros compostos presentes na matriz. Na FIGURA 3.11 tem-se os cromatogramas da amostra 1 nos três comprimentos de onda, onde é possível observar que não houve sinal de outros compostos que possam ter sido co-extraídos, mostrando interferência mínima na quantificação dos ácidos p-cumárico e ferúlico nos λ analisados.

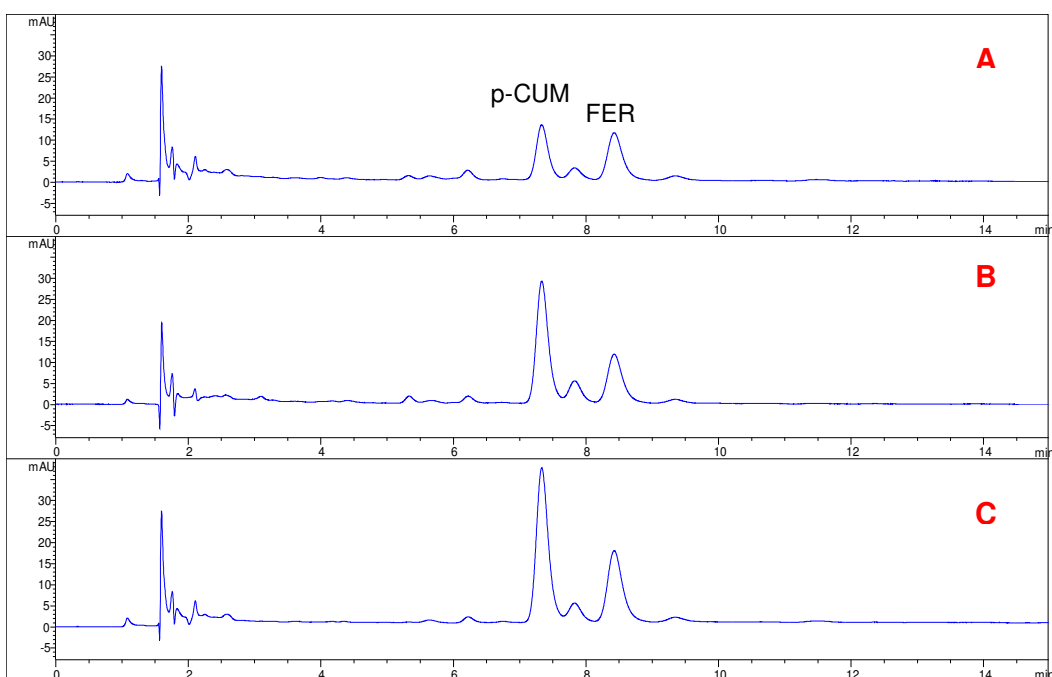


FIGURA 3.11: Cromatogramas da réplica 1 da amostra *Cynodon*. FM: ACN/MeOH/solução H_3PO_4 pH=2,05 (13:12,5:74,5), fluxo: 1mL/min, detecção: a) 236nm, b) 286nm, c) 316nm.

3.4.5 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS

Conforme citado no item 3.4.3 o ácido cafeico é instável às condições de extração, seja no banho ultratermostático ou no ultra-som. Na análise do branco fortificado, além da ausência de sinal referente ao ácido cafeico, nenhum pico adicional foi detectado além dos constituintes adicionados (FIGURA 3.12 B). E o ácido chiquímico não pôde ser quantificado, tanto na amostra fortificada quanto no branco fortificado, devido à sua co-eluição com

compostos presentes na matriz e no branco (FIGURAS 3.12 B e 3.12 D). Sendo assim, na TABELA 3.7 estão somente os resultados de recuperação dos ácidos ferúlico, p-cumárico, m-cumárico e o-cumárico.

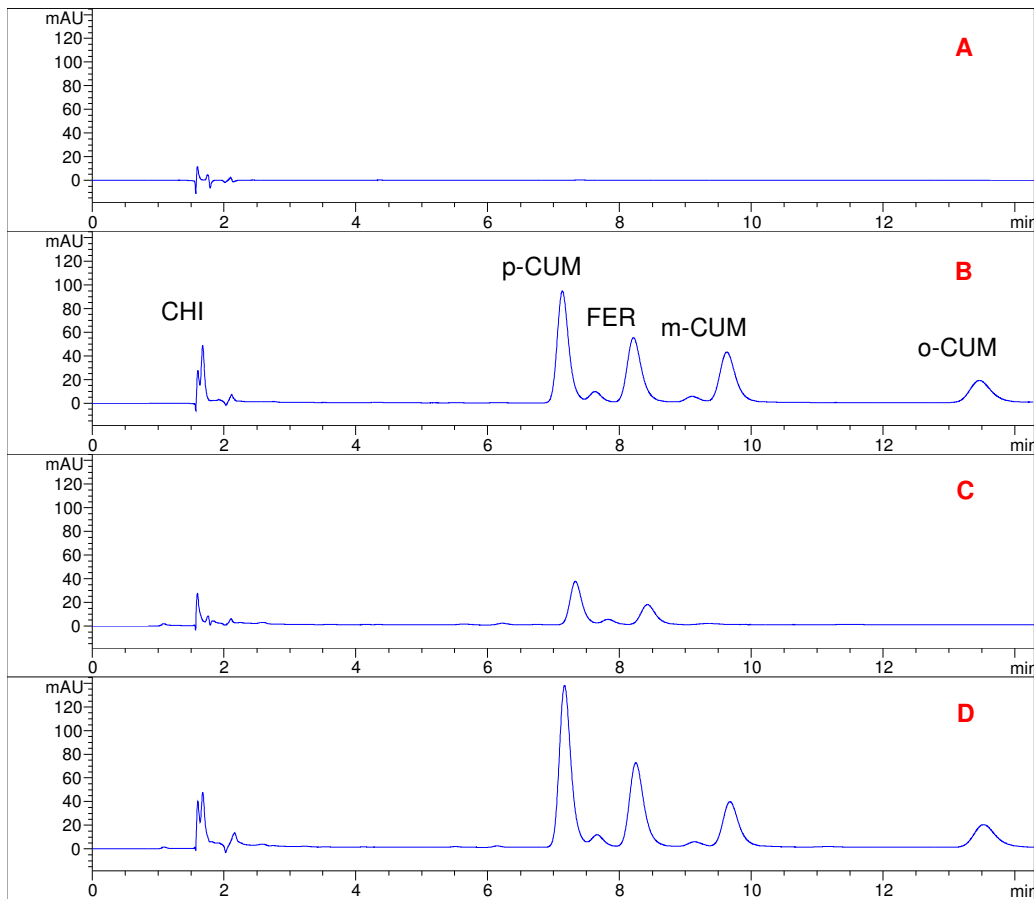


FIGURA 3.12: Cromatogramas dos resultados da recuperação da extração no banho: a) branco; b) branco fortificado com 10,00 mg/L de cada ácido; c) amostra *Cynodon*; d) amostra *Cynodon* fortificada com 10,00 mg/L de cada ácido. FM: ACN/MeOH/solução H₃PO₄ pH=2,05 (13:12,5:74,5), fluxo: 1mL/min

TABELA 3.7: Comparação entre o percentual de recuperação (DPR) alcançado ao fortificar 25,0 mg da amostra *Cynodon* com mistura padrão dos ácidos em 3 níveis de fortificação (5,00 , 7,50 e 10,00 mg/L).

Analito	Amostra	Níveis de Fortificação, mg/L	Percentual médio de recuperação,% (desvio padrão relativo, %)	
			banho	Ultra-som
Ác. p-cumárico	Amostra fortificada	5,00	88 (3,2)	85 (4,1)
		7,50	91 (4,5)	82 (3,9)
		10,00	94 (5,9)	86 (4,4)
	Branco fortificado	10,00	82 (3,9)	85 (3,0)
Ac. ferúlico	Amostra fortificada	5,00	89 (5,8)	85 (0,8)
		7,50	91 (4,8)	82 (2,4)
		10,00	93 (3,6)	89 (5,3)
	Branco fortificado	10,00	89 (3,3)	85 (3,0)
Ac. m-cumárico	Amostra fortificada	5,00	86 (2,6)	84 (1,1)
		7,50	88 (5,8)	83 (2,7)
		10,00	91 (2,4)	91 (2,0)
	Branco fortificado	10,00	95 (3,0)	95 (3,2)
Ac. o-cumárico	Amostra fortificada	5,00	92 (4,6)	90 (6,0)
		7,50	93 (6,0)	85 (3,1)
		10,00	93 (3,1)	91 (4,1)
	Branco fortificado	10,00	93 (4,2)	94 (2,4)

DPR = desvio padrão relativo percentual

Os valores de recuperação obtidos para a extração em ultra-som variaram de 82 a 91 %, sendo o valor médio de 86 % com DPR de 4 %. Já o banho apresentou maiores percentuais de recuperação, onde os valores variaram de 86 a 94 %, sendo o valor médio de 91 % com DPR de 3 %.

Embora a recuperação obtida no ultra-som tenha apresentado uma maior dispersão dos resultados, a sua distribuição foi aleatória em relação aos níveis de concentração. Já no caso do banho, notou-se que a recuperação média aumentou discretamente conforme o nível de fortificação da amostra. Esse aumento foi de 3% entre os níveis de fortificação para os ácidos p-cumárico e m-cumárico e de 2% para o ácido ferúlico.

Como mostra a FIGURA 3.13, foram construídas curvas com as médias de concentração de cada nível de fortificação de cada ácido no ultra-som em

função das médias de concentração de cada nível de fortificação de cada ácido no banho, a fim de se avaliar a correlação entre os valores obtidos nos dois tipos de extração. Analisando as curvas, em todos os casos, os valores do coeficiente de Pearson (r) e da inclinação se aproximam de um, e os valores dos interceptos aproximam-se de zero, indicando a existência de uma correlação entre os valores.

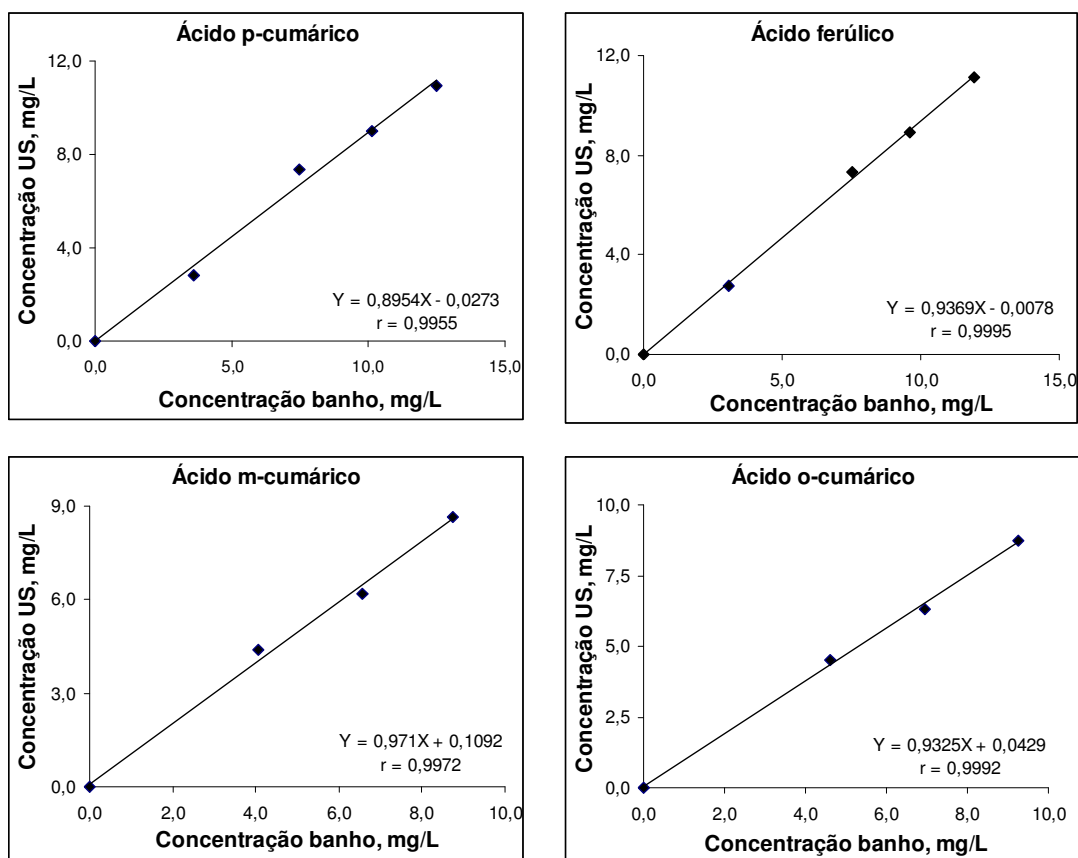


FIGURA 3.13: Curvas das médias de concentração obtida para cada nível de fortificação de cada ácido no ultra-som versus no banho.

3.5 PADRONIZAÇÃO INTERNA

3.5.1 ESTUDOS PARA ESTABELECEER O PADRÃO INTERNO E O PADRÃO *SURROGATE*

A fim de se determinar qual dos compostos se comporta melhor como padrão interno (PI) e como padrão *surrogate* (PS), foram realizados dois

estudos. Em cada condição testada foram analisadas, em triplicata, amostra, amostra fortificada e branco fortificado:

- × ESTUDO 1: O ácido o-cumárico foi usado como PI e m-cumárico como PS.
- × ESTUDO 2: O ácido m-cumárico foi usado como PI e o-cumárico como PS.

Na TABELA 3.8 são apresentados os resultados obtidos para a amostra *Cynodon dactylon* cv. Coast-cross aplicando a padronização interna, usando cada um dos ácidos como PS. Observa-se que o ácido m-cumárico apresentou maior percentual de recuperação, o que mostra que este ácido é menos suscetível a perdas durante o processo de extração.

TABELA 3.8: Concentrações (mg/g peso seco) obtidas dos ácidos p-cumárico, ferúlico e recuperação do padrão *surrogate* para a amostra *Cynodon* extraída em ultra-som por 120 minutos, calculadas por padronização interna.

	o-CUM como PS			m-CUM como PS		
	p-CUM (mg/g peso seco)	FER (mg/g peso seco)	RPS (%)	p-CUM (mg/g peso seco)	FER (mg/g peso seco)	RPS (%)
Réplica 1	6,73	6,31	76	6,19	6,20	104
Réplica 2	6,75	6,40	72	6,33	6,13	104
Réplica 3	6,56	6,57	74	6,36	6,25	100
Média	6,68	6,43	74	6,29	6,19	103
Sd	0,10	0,13	1,9	0,09	0,06	2,2
DPR (%)	1,6	2,0	2,6	1,4	0,9	2,0

o-CUM = ácido o-cumárico; m-CUM = ácido m-cumárico; p-CUM = ácido p-cumárico; FER = ácido ferúlico; PS = padrão *surrogate*; RPS = recuperação do padrão *surrogate*; Sd = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo percentual

Tal comportamento também foi observado para a amostra e o branco fortificados, onde na maioria dos resultados, tanto o padrão *surrogate*, quanto os ácidos ferúlico e p-cumárico apresentaram maiores percentuais médios de recuperação quando o m-cumárico desempenhou a função de padrão *surrogate* (FIGURA 3.14). Além disso, quando o ácido o-cumárico foi usado como PS, obteve-se maiores valores de desvio padrão relativo das análises.

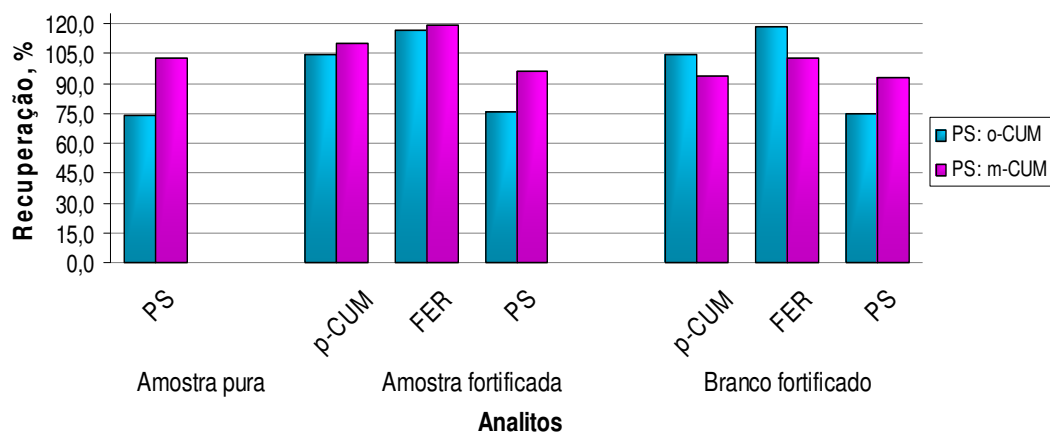


FIGURA 3.14: Gráfico com os percentuais de recuperação dos analitos obtidos para a amostra, amostra fortificada e branco fortificado utilizando padrões interno e *surrogate*.

Sendo assim, optou-se em utilizar o ácido o-cumárico como padrão interno e o ácido m-cumárico como padrão *surrogate*.

A FIGURA 3.15 esquematiza o processo final de extração da amostra aplicando a padronização interna para a quantificação dos ácidos ferúlico e p-cumárico nas amostras de forrageiras.

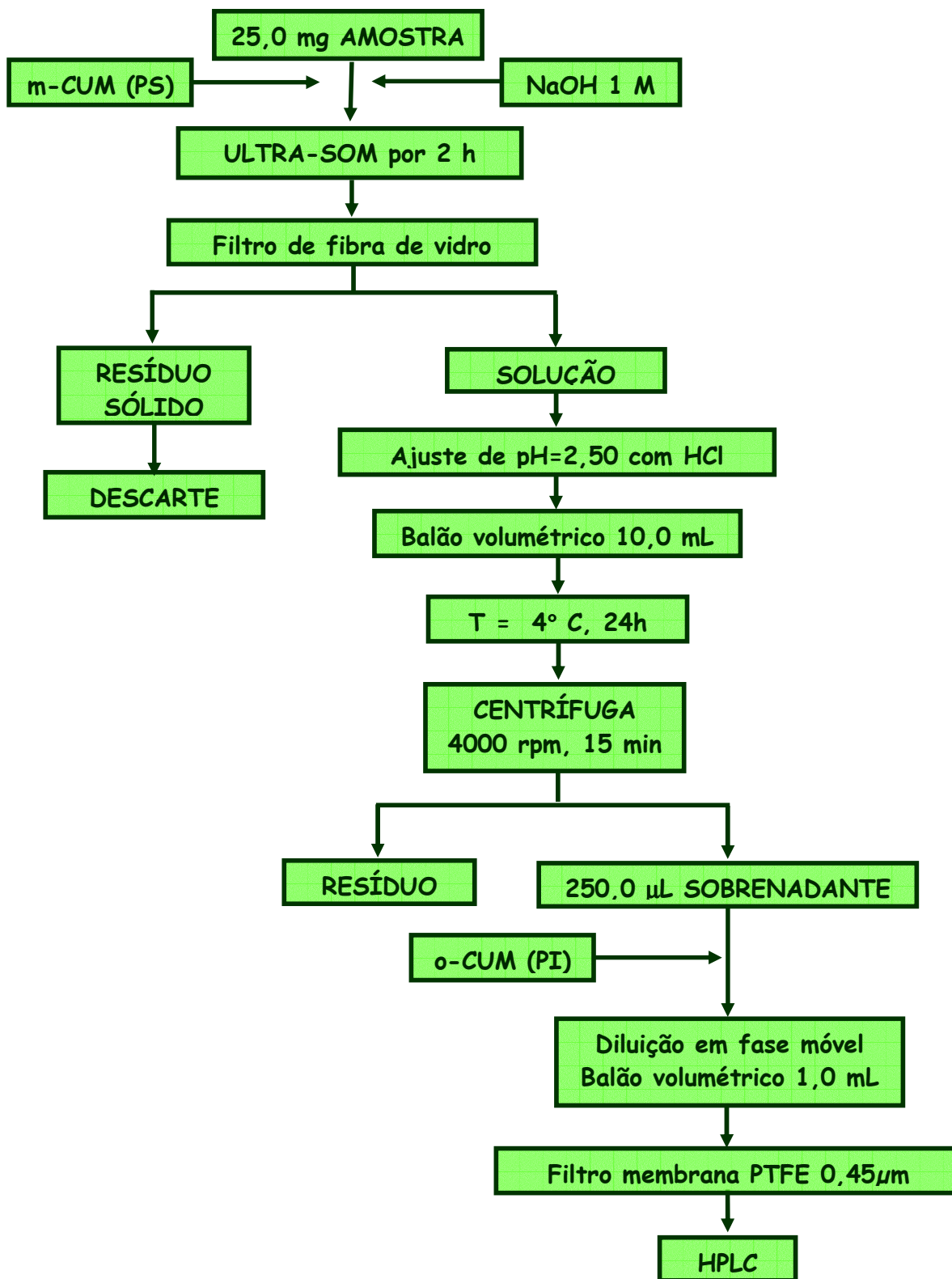


FIGURA 3.15: Esquema de representação para a extração das amostras de forrageiras em ultra-som para a quantificação dos ácidos fenólicos por padronização interna.

3.5.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO APLICANDO PADRONIZAÇÃO INTERNA

3.5.2.1 RESPOSTA LINEAR DO MÉTODO

A resposta linear do método foi verificada através dos gráficos de fator de resposta em função da razão da concentração dos analitos e concentração do padrão *surrogate*, na faixa de concentração dos analitos entre 3,00 e 30,00 mg/L. Neste caso, por se tratar de padronização interna, o fator de resposta é dado pela equação 3.1.

$$\text{Fator de resposta} = \frac{A_{\text{analito}}/A_{PS}}{C_{\text{analito}}/C_{PS}} \quad [\text{Equação 3.1}]$$

Sendo: A_{analito} a área do analito

A_{PS} a área do padrão *surrogate*

C_{analito} a concentração do analito

C_{PS} a concentração do padrão *surrogate*

A FIGURA 3.16 mostra os gráficos dos fatores de resposta obtidos para os ácidos chiquímico, cafeico, ferúlico e p-cumárico. É possível verificar que os valores se encontram entre as linhas horizontais referentes a 95 e 105% do valor médio, logo, as curvas de analíticas são lineares na faixa estudada.

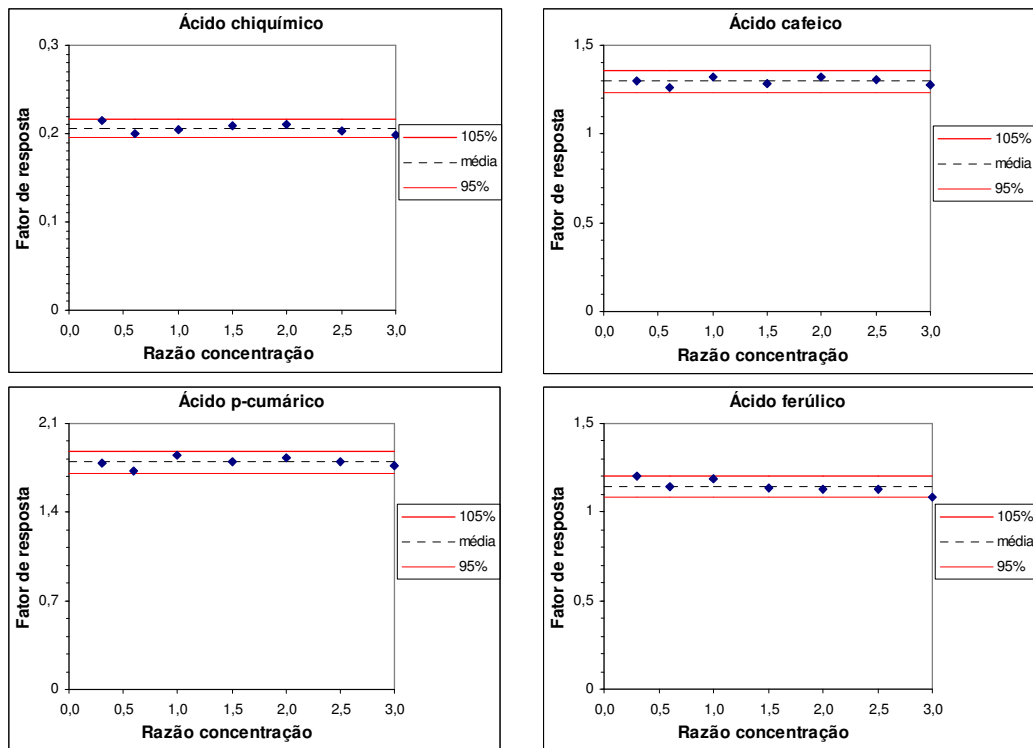


FIGURA 3.16: Gráficos de fator de resposta dos ácidos chiquímico, cafeico, ferúlico e p-cumárico por padronização interna.

3.5.2.2 CURVAS ANALÍTICAS

Adotou-se como critério coeficientes de correlação $r \geq 0,999$ para as curvas analíticas. Os coeficientes de correlação para os 4 compostos resolvidos variou entre 0,99970 (ácido ferúlico) e 0,99989 (ácido cafeico). A FIGURA 3.17 mostra as curvas analíticas para os compostos conforme a ordem de eluição.

$$\text{Sendo: Razão área} = \frac{\text{Área do analito}}{\text{Área do PS}} \quad [\text{Equação 3.2}]$$

$$\text{Razão concentração} = \frac{\text{Concentração do analito}}{\text{Concentração do PS}} \quad [\text{Equação 3.3}]$$

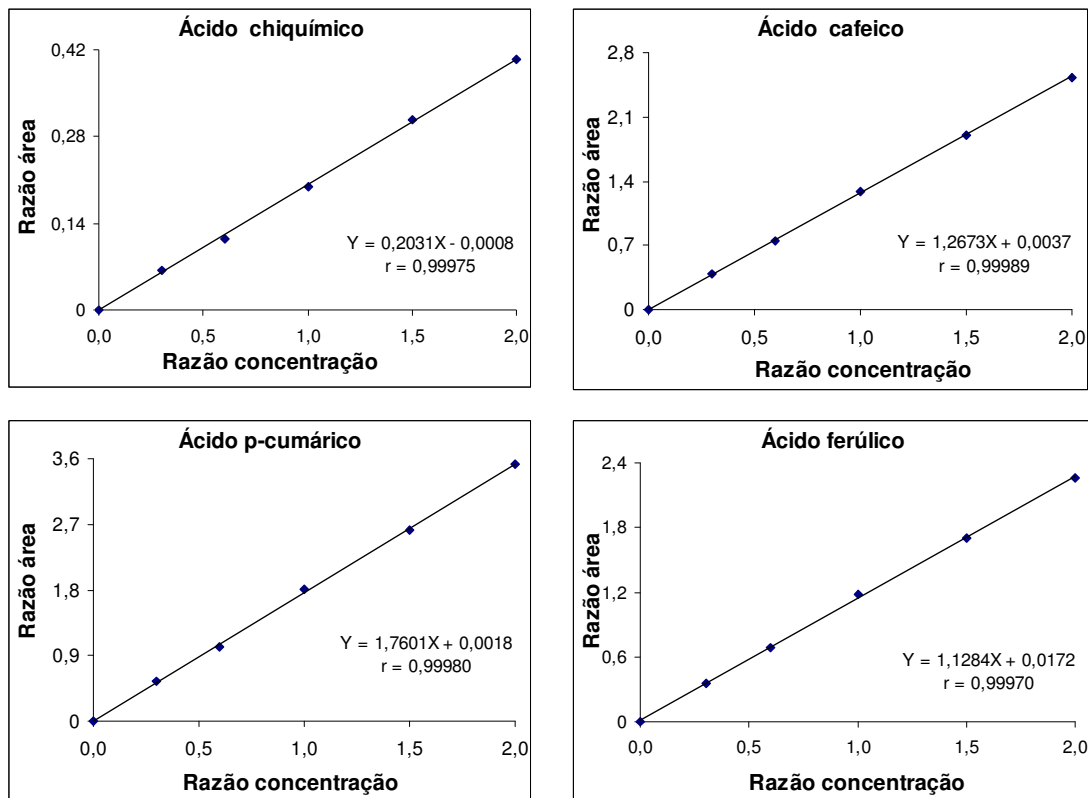


FIGURA 3.17: Curvas analíticas por padronização interna obtidas para a injeção em triplicata da mistura padrão dos ácidos chiquímico, cafeico, p-cumárico e ferúlico nas concentrações 0,00; 3,00; 6,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mg/L.

3.5.2.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO, REPETITIVIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Pelas razões já mencionadas, não foi possível quantificar os ácidos chiquímico e cafeico, sendo assim, a tabela a TABELA 3.9 apresenta os resultados de limites de detecção e de quantificação e repetitividade somente dos ácidos p-cumárico e ferúlico. Para fins de comparação, a TABELA 3.9 mostra os valores obtidos por padronização externa (citados no item 3.4.3), e observou-se que a padronização interna forneceu menores valores de LD, LQ e DPR. Tais resultados são atribuídos a utilização do padrão interno e do padrão *surrogate* que corrigem flutuações entre cada injeção e perdas durante o processo de extração e tratamento das amostras, resultando em menor desvio

padrão relativo das análises e, conseqüentemente, menores valores de LD e LQ.

TABELA 3.9: Limites de detecção e quantificação do método e repetitividade obtidos com padronização externa e padronização interna.

Analito	Padronização externa			Padronização interna		
	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	DPR (%)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	DPR (%)
Ácido p-cumárico	0,33	1,11	4,3	0,09	0,28	1,4
Ácido ferúlico	0,33	1,12	4,1	0,04	0,15	0,7

LD = limite de detecção do método; LQ = limite de quantificação do método; DPR = desvio padrão relativo percentual

Outro estudo realizado foi da precisão intermediária, que consistiu na análise da amostra *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em quatro dias diferentes. Na TABELA 3.10 estão dispostos os resultados obtidos de concentração dos ácidos ferúlico e p-cumárico, recuperação do padrão *surrogate*, juntamente com seus valores de desvios padrões relativos.

TABELA 3.10: Concentrações (mg/g peso seco) dos ácidos ferúlico e p-cumárico e recuperação do padrão *surrogate* obtidos na análise da amostra *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em diferentes dias.

Datas	p-CUM (mg/g peso seco)	FER (mg/g peso seco)	RPS (%)
7/10/2008	7,62	6,54	94,2
8/10/2008	7,49	6,54	95,0
9/10/2008	7,26	6,46	97,4
15/10/2008	7,00	5,79	96,5
MÉDIA	7,34	6,33	95,2
Sd	0,27	0,36	1,20
DPR	3,7	5,8	1,3

p-CUM = ácido p-cumárico; FER = ácido ferúlico; RPS = recuperação do padrão *surrogate*; Sd = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo percentual

Como discutido no tópico 3.2, as soluções padrão dos ácidos ferúlico e p-cumárico são estáveis por no máximo uma semana. E o mesmo comportamento foi observado para a amostra (TABELA 3.10). Esta foi extraída, estocada a 4° C e 1, 2, 3 e 9 dias após a extração, uma alíquota foi diluída em fase móvel e injetada no HPLC. Observou-se uma diminuição dos valores das

concentrações obtidas para os dois ácidos na análise do dia 15/10/2008 (9 dias após a extração), se comparados com as concentrações obtidas nas análises realizadas na semana da extração da amostra. Excluindo os valores de concentração desta análise, obtêm-se desvios padrões relativos iguais a 0,1% e 1% para os ácidos ferúlico e p-cumárico, respectivamente. Já o ácido m-cumárico mostrou-se estável no período das análises, apresentando um DPR de 1%.

3.5.2.4 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS

Assim como na padronização externa, no estudo da recuperação foram analisadas, em replicas, amostra, amostra fortificada, branco e branco fortificado com os ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e chiquímico em três níveis de concentração: 5,00; 7,50 e 10,00 mg/L, onde todas as amostras e o branco foram adicionados o ácido m-cumárico (PS) obtendo-se a concentração final de 10mg/L.

A TABELA 3.11 mostra os resultados de recuperação obtidos para os ácidos ferúlico, p-cumárico e m-cumárico. Vale ressaltar que a amostra e o branco também foram fortificados com os ácidos chiquímico e cafeico, porém, não foi possível obter resultados para estes compostos conforme discutido no item 3.4.3.

TABELA 3.11: Percentuais médios de recuperação e desvios padrões relativos alcançados para a amostra e branco fortificados com mistura padrão dos ácidos em 3 níveis de fortificação (5,0 , 7,5 e 10,0 mg/L) e adicionados de padrão *surrogate* na concentração final de 10,0 mg/L.

Analito	Amostra	Níveis de Fortificação (mg/L)	Percentual médio de recuperação (%)	DPR(%)
Ác. p-cumárico	Amostra fortificada	5,00	98	1,6
		7,50	98	1,5
		10,00	99	1,2
	Branco fortificado	10,00	91	2,4
Ac. ferúlico	Amostra fortificada	5,00	88	2,1
		7,50	89	2,0
		10,00	91	2,0
	Branco fortificado	10,00	83	1,5
PS	Amostra		93	2,6
	Amostra fortificada	5,00	92	3,6
		7,50	92	1,0
		10,00	91	1,1
Branco fortificado	10,00	97	2,8	

DPR = desvio padrão relativo porcentual; PS= padrão *surrogate*

A FIGURA 3.18 ilustra um gráfico com os percentuais médios de recuperação para a amostra extraída em ultra-som por 2 h, obtidos por padronização interna e por padronização externa. O gráfico mostra que a padronização interna apresentou melhores valores de recuperação, principalmente para o ácido p-cumárico. Esses valores variaram de 83 a 99% para padronização interna, sendo o valor médio de 92%, e para padronização externa, variaram de 82 a 91%, com valor médio de 86%. Onde, a quantificação por padronização interna apresentou também menores desvios padrões relativos das análises.

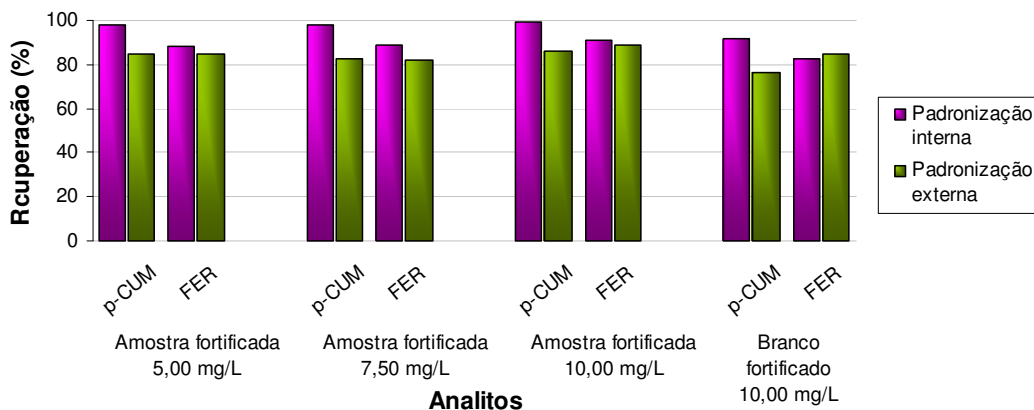


FIGURA 3.18: Gráfico com os percentuais de recuperação obtidos para a amostra, amostra fortificada e branco fortificado utilizando padronização interna e externa.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS p-CUMÁRICO E FERÚLICO NAS AMOSTRAS DE FORRAGEIRAS

Os estudos aplicando padronização interna apresentaram bons resultados, logo, optou-se por quantificar as amostras aplicando essa técnica. Desta forma, as concentrações das amostras foram calculadas comparando-se as razões das áreas (área analito/área padrão *surrogate*) e as razões das concentrações (concentração analito/concentração *surrogate*) entre os padrões e as amostras, empregando o ácido o-cumárico como padrão interno e o ácido m-cumárico como padrão *surrogate*.

As TABELAS 3.12 (repetições R1) e 3.13 (repetições R2) mostram as concentrações dos ácidos ferúlico e p-cumárico, e seus respectivos desvios padrões relativos, obtidos para a análise em triplicata das amostras de quatro espécies de forrageiras. A concentração final expressa em mg/g peso seco foi calculada de acordo com a massa de amostra extraída (25 mg).

Vale ressaltar, que as repetições R1 e R2 referem-se a amostras de uma mesma espécie de forrageira, submetidas a mesma condição de adubação e irrigação, porém plantadas em dois blocos diferentes, podendo haver variações no solo onde foram cultivadas.

As tabelas mostram também a recuperação média do padrão *surrogate* entre as réplicas das amostras e os resultados de digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Conforme foi descrito no item 2.6, estipulou-se trabalhar com

valores entre 75 a 120% de recuperação. Sendo analisados dados das amostras cuja recuperação do PS estava compreendida no intervalo estipulado. Desta forma, os valores médios de recuperação do padrão *surrogate* (RPS) nas análises variaram entre 75 e 97 %, onde 79 % das amostras apresentaram valores acima de 80 % de RPS.

Para uma melhor discussão dos dados, também foram construídos gráficos com as concentrações médias dos ácidos p-cumárico e ferúlico determinadas para cada repetição das amostras de Braquiária, Florona e Mombaça (FIGURA 3.19). Esta figura não apresenta gráficos para a amostra Florakirk, pois foram analisadas somente quatro amostras dessa cultivar.

TABELA 3.12: Concentrações e intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$), expressos em mg/g peso seco, dos ácidos ferúlico e p-cumárico e recuperação do padrão *surrogate* encontrados na repetição 1 (R1) das amostras *Cynodon nlemfuenses* cv. Florona, *Cynodon dactylon* cv. Florakirk, *Panicum maximum* cv. Mombaça e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

Amostra	Fração	Dose de N	Irrigação	Concentração (mg/g peso seco)				RPS (%)	DPR (%)
				p-cumárico	DPR (%)	ferúlico	DPR (%)		
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	caule	150	com	9,04 ± 0,11	0,5	7,50 ± 0,30	1,6	83	5,1
			sem	7,62 ± 0,38	2,0	5,55 ± 0,18	1,3	88	1,5
		300	com	7,99 ± 0,20	1,0	5,41 ± 0,25	1,9	88	5,7
			sem	7,23 ± 0,41	2,3	4,60 ± 0,12	1,1	88	3,4
	folha	150	com	6,71 ± 0,28	1,7	7,69 ± 0,35	1,8	81	3,2
			sem	6,00 ± 0,39	2,6	6,49 ± 0,69	4,2	79	1,8
		300	com	5,98 ± 0,18	1,2	5,63 ± 0,12	0,8	80	1,4
			sem	5,45 ± 0,14	1,0	4,99 ± 0,09	0,7	86	3,2
<i>Cynodon dactylon</i> cv. Florakirk	caule	150	com	8,71 ± 0,01	0,0	4,58 ± 0,07	0,7	87	5,4
	folha	300	com	8,75 ± 0,25	1,1	4,51 ± 0,16	1,5	84	5,3
<i>Cynodon nlemfuenses</i> cv. Florona	caule	150	sem	6,00 ± 0,25	1,7	4,17 ± 0,04	0,4	90	1,1
		300	com	6,38 ± 0,20	1,4	3,89 ± 0,07	0,7	97	2,0
	folha	150	com	4,57 ± 0,15	1,3	3,96 ± 0,15	1,5	88	5,6
			sem	6,01 ± 0,07	0,5	5,56 ± 0,03	0,2	82	0,9
	300	com	5,82 ± 0,13	0,9	5,22 ± 0,12	0,9	84	4,0	
		sem	6,61 ± 0,29	1,8	3,77 ± 0,03	0,3	85	2,0	
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	caule	150	sem	6,70 ± 0,08	0,5	5,13 ± 0,10	0,8	86	2,1
			com	7,74 ± 0,33	1,7	4,19 ± 0,10	1,0	93	3,2
		300	sem	7,85 ± 0,32	1,6	4,52 ± 0,12	1,0	85	0,5
			com	5,11 ± 0,05	0,4	4,33 ± 0,08	0,7	79	2,6
	folha	150	sem	4,19 ± 0,13	1,3	4,94 ± 0,14	1,2	84	4,9
			com	4,36 ± 0,14	1,3	3,35 ± 0,17	2,0	77	1,7
		300	com	4,36 ± 0,14	1,3	3,35 ± 0,17	2,0	77	1,7
			sem	3,63 ± 0,13	1,4	3,59 ± 0,20	2,3	84	3,1

RPS = recuperação do padrão *surrogate*; DPR = desvio padrão relativo percentual

TABELA 3.13: Concentrações e intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$), expressos em mg/g peso seco, dos ácidos ferúlico e p-cumárico e recuperação do padrão *surrogate* encontrados na repetição 2 (R2) das amostras *Cynodon nlemfuenses* cv. Florona , *Cynodon dactylon* cv. Florakirk, *Panicum maximum* cv. Mombaça e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

Amostra	Fração	Dose de N	Irrigação	Concentração (mg/g peso seco)				RPS (%)	DPR (%)
				p-cumárico	DPR (%)	ferúlico	DPR (%)		
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	caule	150	com	7,79 ± 0,39	2,0	6,40 ± 0,34	2,1	92	2,3
			sem	7,56 ± 0,14	0,8	5,22 ± 0,19	1,4	84	5,8
	300	com	8,56 ± 0,03	0,1	5,29 ± 0,16	1,2	85	5,8	
		sem	7,72 ± 0,00	0,0	6,20 ± 0,10	0,6	82	5,0	
	folha	150	sem	6,65 ± 0,20	1,2	6,47 ± 0,22	1,4	75	1,4
		300	com	6,01 ± 0,15	1,0	5,57 ± 0,12	0,8	83	2,0
<i>Cynodon dactylon</i> cv. Florakirk	caule	150	com	7,89 ± 0,21	1,1	4,28 ± 0,07	0,7	81	4,2
	folha	300	com	8,60 ± 0,41	1,9	4,11 ± 0,21	2,1	88	0,7
<i>Cynodon nlemfuenses</i> cv. Florona	caule	150	sem	5,91 ± 0,10	0,7	5,91 ± 0,10	0,7	84	3,7
		300	com	6,62 ± 0,18	1,1	4,21 ± 0,12	1,1	92	2,0
	folha	150	com	4,45 ± 0,10	0,9	4,45 ± 0,28	2,6	89	5,6
		300	com	5,30 ± 0,26	2,0	4,48 ± 0,23	2,0	82	1,8
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	caule	150	com	7,68 ± 0,13	0,7	4,87 ± 0,20	1,6	83	4,9
			sem	6,95 ± 0,45	2,6	4,45 ± 0,08	0,7	89	6,1
	300	com	7,44 ± 0,44	2,4	3,92 ± 0,09	0,9	91	1,0	
		sem	7,57 ± 0,08	0,4	4,44 ± 0,05	0,5	79	7,4	
	folha	150	com	4,39 ± 0,32	3,0	4,42 ± 0,38	3,4	79	1,5
			sem	3,85 ± 0,17	1,7	4,24 ± 0,11	1,1	80	2,2
300	com	4,89 ± 0,20	1,6	3,67 ± 0,04	0,4	78	2,9		
	sem	3,63 ± 0,25	2,8	3,53 ± 0,24	2,7	77	1,9		

RPS = recuperação do padrão *surrogate*; DPR = desvio padrão relativo percentual

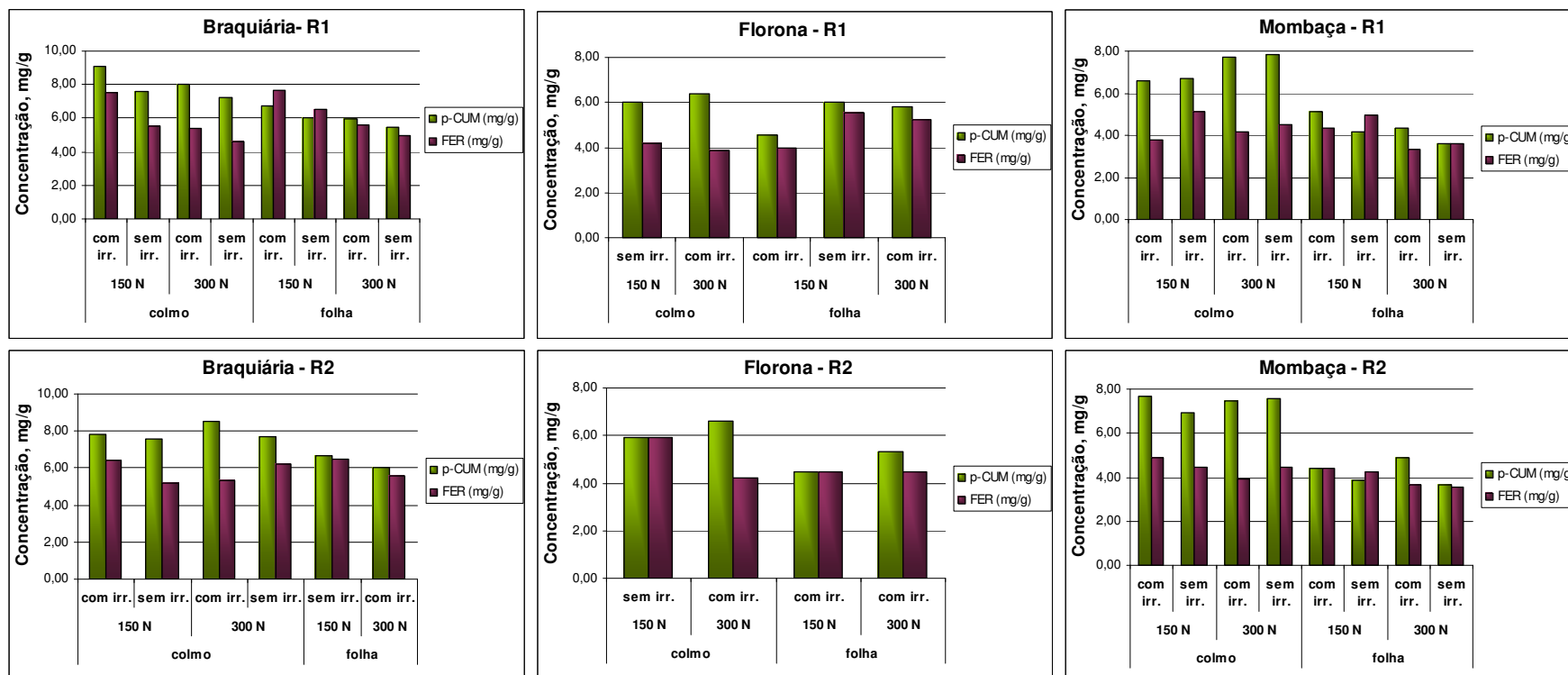


FIGURA 3.19: Concentrações dos ácidos p-cumárico e ferúlico encontradas nas amostras *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, *Cynodon nlemfuenses* cv. Florona e *Panicum maximum* cv. Mombaça.

3.6.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras analisadas apresentaram concentrações de ácido p-cumárico e ferúlico acima do limite de quantificação estabelecido para o método. As concentrações expressas em mg/g peso seco variaram de 3,63 a 9,04 para ácido p-cumárico e de 3,35 a 7,69 para o ácido ferúlico.

Observa-se nas TABELAS 3.12 e 3.13 que 79% das análises apresentaram $DPR \leq 2\%$, fato relevante devido as várias etapas de tratamento da amostra e da variabilidade no tamanho de partícula.

3.6.1.1 *Brachiaria brizantha* cv. Marandu

Nas amostras desta espécie (n=14), as concentrações (TABELA 3.12 e 3.13 e FIGURA 3.19) variaram de 5,45 a 9,04 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 4,60 a 7,69 mg/g peso seco para o ácido ferúlico.

Com relação à dose de Nitrogênio, as faixas de concentrações na fração folha para 150N dos ácidos ferúlico e p-cumárico foram, respectivamente, 6,47 a 7,69 mg/g peso seco e 6,00 a 6,71 mg/g peso seco. E para a dose de 300N, foram de 5,45 a 6,01 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 4,99 a 5,63 mg/g peso seco para o ácido ferúlico (TABELA 3.12 e 3.13).

Na fração caule, as amostras tratadas com 150N apresentaram concentrações (mg/g peso seco) que variaram de 7,56 a 9,04 para ácido p-cumárico e de 5,22 a 7,50 para o ácido ferúlico. Já as amostras tratadas com 300N, os valores (mg/g peso seco) variaram de 7,23 a 8,56 para ácido p-cumárico e de 4,60 a 6,20 para o ácido ferúlico (TABELA 3.12 e 3.13).

Nas amostras da fração folha submetidas à irrigação, as concentrações (mg/g peso seco) variaram de 5,98 a 6,371 para ácido p-cumárico e de 5,57 a 7,69 para o ácido ferúlico. Já nas amostras sem irrigação, os valores (mg/g peso seco) obtidos variaram de 5,45 a 6,65 para ácido p-cumárico e de 4,99 a 6,49 para o ácido ferúlico (TABELA 3.12 e 3.13).

Para a fração caule, nas amostras submetidas à irrigação, as concentrações (mg/g peso seco) variaram de 7,79 a 9,04 para ácido p-cumárico e de 5,29 a 7,50 para o ácido ferúlico. Enquanto que as amostras sem irrigação apresentaram valores (mg/g peso seco) que variaram de 7,23 a

7,72 para ácido p-cumárico e de 4,60 a 6,20 para o ácido ferúlico (TABELA 3.12 e 3.13).

3.6.1.2 *Cynodon nlemfuense* cv Florona

As amostras de *C. nlemfuense* cv Florona (n=9) apresentaram concentrações que variaram de 4,45 a 6,62 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 3,89 a 5,91 mg/g peso seco para o ácido ferúlico (TABELA 3.12 e 3.13).

Para a fração caule foram analisadas 3 amostras com irrigação e 300N e 2 amostras sem irrigação e 150N. Onde as concentrações (mg/g peso seco) das amostras com irrigação e 300N variaram de 5,30 a 6,62 para ácido p-cumárico e de 3,89 a 4,21 para o ácido ferúlico. Já nas amostras sem irrigação e 150N, os valores de concentração obtidos foram de 5,91 e 6,00 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 5,91 e 4,17 mg/g peso seco para o ácido ferúlico.

Na fração folha, quatro amostras com irrigação foram analisadas cujas concentrações (mg/g peso seco) variaram de 4,45 a 5,82 para ácido p-cumárico e de 3,95 a 5,22 para o ácido ferúlico. Somente uma amostra sem irrigação foi quantificada, apresentando valores de concentrações para os ácidos p-cumárico e ferúlico de 6,01 e 5,56 mg/g peso seco, respectivamente.

Com relação à adubação para esta mesma fração, as faixas de concentrações para a dose de 150N (n = 4) foram de 4,45 a 6,01 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 3,96 a 5,56 mg/g peso seco para o ácido ferúlico. Somente duas amostras adubadas com 300N foram quantificadas, cujos valores de concentração obtidos foram de 5,30 e 5,82 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 4,48 e 5,22 mg/g peso seco para o ácido ferúlico.

3.6.1.3 *Panicum maximum* cv. Mombaça

Dentre as amostras analisadas para essa espécie (n=16), as concentrações variaram de 3,63 a 7,85 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 3,35 a 5,13 mg/g peso seco para o ácido ferúlico (TABELA 3.12 e 3.13).

Nas amostras da fração folha submetidas à irrigação (n = 4), as concentrações (mg/g peso seco) variaram de 4,36 e 5,11 para ácido p-cumárico e de 3,35 a 4,42 para o ácido ferúlico. E as amostras sem irrigação (n = 4) apresentaram valores (mg/g peso seco) que variaram de 3,63 e 4,19 para ácido p-cumárico e de 3,53 a 4,94 para o ácido ferúlico.

Nesta mesma fração, o ácido p-cumárico apresentou faixas de concentrações de 3,85 a 5,11 mg/g peso seco para a adubação com 150N (n = 4) e de 3,63 a 4,89 mg/g peso seco para a adubação com 300N (n = 4). E as faixas de concentrações para o ácido ferúlico foram de 4,24 a 4,94 mg/g peso seco para a adubação com 150N e de 3,35 a 3,67 mg/g peso seco para a adubação com 300N.

Na fração caule, os valores de concentrações do ácido p-cumárico variaram entre 6,61 e 7,74 mg/g peso seco para as amostras com irrigação, e entre 6,70 e 7,85 mg/g peso seco para as amostras sem irrigação. Enquanto que para o ácido ferúlico, os valores de concentrações variaram entre 3,77 e 4,87 mg/g peso seco para as amostras com irrigação, e entre 4,44 e 5,13 mg/g peso seco para as amostras sem irrigação.

Com relação à dose de Nitrogênio, as faixas de concentrações para a dose de 150N (n = 4) foram de 6,61 a 7,68 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 3,77 a 5,13 mg/g peso seco para o ácido ferúlico. Enquanto que para as amostras adubadas com 300N (n = 4), os valores de concentração obtidos foram de 7,44 a 7,85 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 3,92 a 4,52 mg/g peso seco para o ácido ferúlico.

3.6.1.4 *Cynodon dactylon* cv. Florakirk

Somente quatro amostras desta espécie foram quantificadas, duas para fração folha e duas para a fração caule, sendo que todas foram submetidas à irrigação.

As amostras da fração folha foram adubadas com 300N, onde as concentrações obtidas para o ácido p-cumárico foram 8,75 e 8,60 mg/g peso seco e para o ácido ferúlico foram 4,51 e 4,11 mg/g peso seco.

No caso da fração caule, as amostras foram adubadas com 150N, cujas concentrações do ácido p-cumárico foram 8,71 e 7,89 mg/g peso seco e do ácido ferúlico foram 4,58 e 4,28 mg/g peso seco.

3.6.2 CONSIDERAÇÕES

De acordo com as TABELAS 3.12 e 3.13 e os gráficos da FIGURA 3.19, nota-se, que de uma maneira geral, as amostras possuem maiores concentrações de ácido p-cumárico em relação ao ácido ferúlico. Tal comportamento foi observado em 84% das amostras analisadas, onde a repetição R1 apresentou maior frequência que a repetição R2.

Com exceção da *C. dactylon* cv. Florakirk, as concentrações mais altas dos ácidos p-cumárico e ferúlico, tanto no caule como na folha, ocorreram entre as amostras de *B. brizantha*. As concentrações mais baixas de ácido p-cumárico ocorreram entre as amostras de *C. nlemfuense* cv Florona para fração caule e *P. maximum* cv. Mombaça para a fração folha. O ácido ferúlico apresentou a mesma tendência de concentração nas duas frações analisadas. Para este ácido uma ordem decrescente dos níveis de concentração entre as espécies é dada por: *B. brizantha*, *C. nlemfuense* cv Florona, *P. maximum* cv. Mombaça (FIGURA 3.19).

3.6.3 COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS

Conforme citado no item 1.4 somente dois trabalhos, referentes a quantificação de ácidos fenólicos em amostras de forrageiras tropicais cultivadas no Brasil foram publicados na literatura [11,13]. Ambos empregaram a cromatografia líquida de alta eficiência com eluição isocrática. Em relação a outros países, alguns autores também aplicaram a mesma técnica para a quantificação destes ácidos em amostras de forrageiras de diferentes espécies e origens.

A TABELA 3.14 compara os resultados obtidos neste trabalho com valores citados por outros autores referentes a forrageiras cultivadas em solos no Brasil e em outros países. Vale ressaltar que os estudos apresentam

diferenças nos métodos de extração e análise aplicados às amostras, bem como das espécies e frações das plantas estudadas.

TABELA 3.14: Comparação dos níveis de concentração dos ácidos p-cumárico e ferúlico obtidos em diferentes espécies de forrageiras.

	Referência	Amostras estudadas	Faixa de concentração	
			p-CUM	FER
B R A S I L	[11]	Bagaço de cana, capim-elefante e mandioca	0,33 a 20,33 µg/mg/MS	0,27 a 5,36 µg/mg/MS
	[13]	<i>Brachiaria brizantha</i> e <i>Brachiaria humidicola</i>	6,26 a 13,21 µg/mg/MS	2,52 a 4,43 µg/mg/MS
	Presente trabalho (2008)	<i>Cynodon nlemfuenses</i> cv. Florona, <i>Cynodon dactylon</i> cv. Florakirk, <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça e <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	3,63 a 9,04 mg/g peso seco	3,35 a 7,69 mg/g peso seco
O U T R O S	[46]	<i>Medicago sativa</i> , <i>Bromus inermis</i> e <i>Panicum uirgatum</i>	0,04 a 7,03 mg/g MO	0,06 a 5,62 mg/g MO
	[15]	<i>Bromus inermis</i> Leyss, <i>Dactylis glomerata</i> L. e <i>Phalaris arundinacea</i> L.	2,17 a 3,91 g/Kg FDN	2,69 a 6,10 g/Kg FDN
	[55]	<i>Festuca rubra</i> L., <i>Holcus mollis</i> L., <i>Holcus lanatus</i> L., <i>Agrostis setacea</i> Curtis, <i>Lolium perenne</i> L. e <i>Bromus inermis</i> Leyss	1,3 a 6,5 mg/g FDN	1,9 a 4,9 mg/g FDN

p-CUM = ácido p-cumárico; FER = ácido ferúlico; MO = matéria orgânica; MS = matéria seca; FDN = fibra de detergente neutro

O presente trabalho, juntamente com os trabalhos publicados por Deschamps & Ramos [11] e de Brito *et al.* [13], quantificaram os mesmos ácidos em amostras de forrageiras tropicais. Desta maneira, comparando os três estudos, observa-se que as faixas de concentrações dos ácidos obtidos em nossos estudos estão em conformidade com os valores relatados por estes autores. As variações entre as faixas de concentrações destes trabalhos podem ser relacionadas às diferentes espécies estudadas por cada autor, além das diferenças de condições de cultivos.

Assim como Brito *et al.*[13], o presente trabalho quantificou os ácidos ferúlico e p-cumárico no gênero *Brachiaria*, cujas concentrações (TABELA 3.12 e 3.13 e FIGURA 3.19) variaram de 5,45 a 9,04 mg/g peso seco para ácido p-cumárico e de 4,60 a 7,69 mg/g peso seco para o ácido ferúlico. Nota-se que as faixas de concentrações dos ácidos relatadas por Brito *et al.*[13] (TABELA 3.14) foram mais amplas que as encontradas por nós para o mesmo gênero.

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

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvida e aplicada uma metodologia de extração, separação e quantificação por HPLC de cinco ácidos fenólicos: ferúlico, p-cumárico, m-cumárico, o-cumárico e cafeico, além do ácido chiquímico, que é um ácido orgânico intermediário do processo de formação dos ácidos fenólicos.

A condição de separação no cromatógrafo foi obtida com eluição isocrática usando como fase móvel acetonitrila/metanol/solução aquosa H_3PO_4 pH 2,05 (13:12,5:74,5), fluxo de 1mL/min, tempo de corrida de 15 minutos e detecção por programação de comprimento de onda.

No processo de extração da amostra, foi proposto um novo método de extração aplicando o ultra-som, onde a amostra foi extraída a temperatura ambiente por 2 h. Este método mostrou-se mais rápido e reprodutível se comparado com a extração a temperatura programada utilizando o banho ultratermostático, que é o principal método reportado para tratamento de amostras de forrageiras.

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

A padronização interna, aplicando o ácido m-cumárico como padrão *surrogate* e o ácido o-cumárico como padrão interno, apresentou menores valores de limites de detecção e quantificação, além de maiores valores de recuperação da amostra fortificada. Sendo assim, as 43 amostras de 4 espécies de forrageiras, folha e caule, foram quantificadas aplicando a padronização interna, onde todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de ácido p-cumárico e ferúlico acima do limite de quantificação estabelecido para o método.

Desta forma, de acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a metodologia analítica implementada mostrou-se eficiente e reprodutível para análise dos ácidos ferúlico e p-cumárico em amostras de forrageira.

5 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

O método desenvolvido no presente trabalho mostrou-se eficaz na extração e quantificação dos ácidos ferúlico e p-cumárico, podendo ser aplicado em outras amostras de forrageiras, bem como em outras espécies de vegetais.

Aplicando essa metodologia a outras amostras de forrageiras, pretende-se correlacionar as concentrações dos ácidos ferúlico e p-cumárico encontradas nestas amostras com componentes químico-bromatológicos, digestibilidade e carboidratos estruturais.

6 REFERÊNCIAS

1. Boudet, A. M.; *Plant Physiol. Biochem.*, **2000**, 38 (1/2), 81.
2. Jung, H.G., Deetz, D.A. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D.; Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America, **1993**, 315.
3. Fukushima; R. S.; Hatfield, R. D.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3713.
4. Soest, V. P. J.; *Nutritional ecology of the ruminant*, 2^a ed., Cornell University Press: Ithaca, NY, 1994.
5. Hatfield, R.; Fukushima, R. S.; *Crop Science* **2005**, 45, 832.
6. Santana, A.; Cristina, M.; Jucilene, C.; *Revista Eletrônica de Veterinária* **2006**, 7(11), 1695.
7. Lapiere, 1993, em: Saliba, E. O. S.; Tese de Doutorado, Escola Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 1998.
8. Hartley, R.D.P.; *J. Sci. Food Agric.* **1972**, 23, 1347.
9. Jung, H.G. ; *Agron. J.* **1989**, 81, 33.
10. Komprda, T.; FrantGek, J. ; Stohandlová, M., Foltýn J.; *Animal Feed Science Technology* **1997**, 67, 141.
11. Deschamps, F. C .; Ramos, L. P., I.; *R. Bras. Zootec.* **2002**, 31(4), 1634.
12. Jung, H. G.; *Phytochemistry* **2003**, 63, 543.
13. Brito, C, J. F. A., Rodella, A. R., Deschamps F. C.; *R. Bras. Zootec.* **2003**, 32(6), 183534.
14. Fontaine, A. S.; Bout, S.; Barrière, Y.; Vermeris, W; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 8080.
15. Casler, M. D.; Jung, H. G.; *Animal Feed Science and Technology* **2006**, 125, 151.
16. Robbins, J.R.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2866.
17. Zuo, Y.; Wang, C.; Zhan, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3789.

18. Gorinstein, S.; Zachwieja, Z.; Katrich, E.; Pawelzik, E.; Haruenkit, R.; Trakhtenberg, S.; Martin-Belloso, O.; *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **2004**, *37*, 337.
19. Plessi, M.; Bertelli, D.; Miglietta, F.; *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 49.
20. Deba, F.; Xuan, T. D.; Yasuda, M.; Tawata, S.; *Weed Biology and Management* **2007**, *7*, 77.
21. Choi, S. W.; Lee, S. K.; Kim, E. O.; Oh, J. H.; Yoon, K. S.; Parris, N.; Hicks, K. B.; Moreau, R. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3920.
22. Zadernowski, R. ; Naczek, M.; Nesterowicz, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2118.
23. Sun, R.; Sun, X.; Zhang, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5122.
24. Lam, T.B.T.; Kadoya, K.; Iiyama, K.; *Phytochemistry* **2001**, *57*, 987.
25. Besle, J.M., Cornu, A., Jouany, J.P. ; *J. Sci. Food. Agric.* **1994**, *64*, 171.
26. Grabber, J.H.; Ralph, J.; Hatfield, R.D. ; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2530.
27. Deresz, F.; Mozzer O. L.; Anais do Simpósio sobre capim-elefante, Juiz de Fora, Brasil, 1990.
28. Deresz, F.; Matos, L. L. de; Anais da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Fortaleza, Brasil, 1996.
29. Vilela, D.; Alvim, M. J Anais do Workshop sobre o potencial forrageiro do gênero *Cynodon*, Juiz de Fora, Brasil, 1996.
30. Ghisi, O.M.A.; Paulino, V. T.; Anais da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília, Brasil, 1997.
31. Vilela, D.; Alvim, M. J.; Rezende, G. M.; Anais da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília, Brasil, 1997.
32. Alvim, M. J.; Vilela, D.; Lopes, R. S. ; *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* **1997**, *26(5)*, 967.
33. Mislevy, P.; Pate, F. M. Anais do Workshop sobre o potencial forrageiro do

gênero *Cynodon*, Juiz de Fora, Brasil, 1996.

34. Macedo, M. C. M. Anais do Simpósio sobre pastagens nos ecossistemas brasileiros: Pesquisas para o desenvolvimento sustentável, Brasília, Brasil, 1995

35. Pupo, N. I. H. *Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação e utilização*; Instituto Campineiro de Ensino Agrícola: Campinas, 1979.

36. Peng, Y.; Jiannong YE, J.; Kong, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8141.

37. Ehala, S.; Vaher, M.; Kaljurand, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6484.

38. Carrasco-Pancorbo, A; Gómez-Caravaca, A. M. ; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7984.

39. Lima, D. L. D.; Duarte, A. C.; Esteves; V. I.; *Talanta* **2007**, *72*, 1404.

40. Odaci, D.; Timur, S.; Pazarlioglu , N.; Montereali, M. R.; Vastarella, W.; Pilloto, R.; Telefoncu, A.; *Talanta* **2007**, *71* , 312.

41. Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6106.

42. Sarath, G; Baird, L. M.; Vogel, K. P.; Mitchell; R. B; *Bioresource Technology* **2007**, *98*, 2985.

43. Spacil, Z.; Novakova, L.; Solich, P; *Talanta* **2008**, *76* , 189.

44. Ayaz, F. A.; Hayirlioglu-Ayaz, S.; Gruz, J.; NovakK, O; Strnad, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 81166.

45. Huang, Z.; Wang, B., Eaves, D.H.; James M. Shikany, J. M.; Pace, R. D.; *Food Chemistry* **2007**, *103*, 1395.

46. Jung, H.G.; Shalita-Jones, S.C.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 397.

47. Rouseff, R. L.; Seetharaman, J. K.;I Naim, M.; Nagyll, S.; Zehavig, U.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1139.

48. Kermasha, S.; Goetghebeur, M.; Dumod, J.; Couture, R.; *Food Research International* **1995**, *28(3)*, 245.

49. Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J. J.; Garrido, A.; Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3535.
50. Castellari, M.; Sartini, E.; Fabiani, A.; Arfelli, G.; Amati, A.; *J. Chromatogr., A*, **2002**, *973*, 221.
51. Li, X.; Yu, J.; Luo, J.; Li, H.; Han, F.; Chen, X.; Hu, Z.; *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52(10)*, 1251.
52. Dey, G; Chakraborty, M; Mitra, A; *Journal of Plant Physiology* **2005**, *162* (4), 375.
53. Chitindingu, K.; Ndhlala, A. R.; Chapano, C.; Benhura, M.A.; Muchuweti, M.; *Journal of Food Biochemistry* **2006**, *31*, 206.
54. Tuberoso, C. I. G.; Kowalczyk, A.; Sarritzu, E.; Cabras, P.; *Food Chemistry* **2007**, *103*, 1494.
55. Rodrigues, M.A.M. ; Guedes, C.M.; Cone, J.W. ;van Gelder, A.H.; Ferreira, L.M.M; Sequeira, C.A.; *Animal Feed Science and Technology* **2007**, *136*, 297.
56. Bolarinwa, A.; Linseisen, J.; *J. Chromatogr., B* **2005**, *823*,143.
57. Friedman, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1523.
58. Ashley, K.; *Trends Anal. Chem.***1998**, *17(6)*, 366.
59. Babic, S.; Petrovic, M.; Kastelan-Macan, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *823(1)*, 3.
60. Luque-Garcia, J.L.; Luque de Castro, M.D.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22(1)*, 41.
61. Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M.D.; *Trends in Anal. Chem.* **2004**, *23(9)*, 644.
62. Capelo, J.L.; Maduro, C.; Vilhena, C.; *Ultrasound Sonochemistry* **2005**, *12(3)*, 225.
63. Ashley, K.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 1189.
64. Marin, A.; Lopez-Gonzales, C.; Barbas, C.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *442*, 305.

65. Ashley, K.; Andrews, R.N.; Cavazos, L.; Demange, M.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2001**, *16*, 1147.
66. Al-Merey, R.; Al-Masri, M.S.; Bozou, R.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *452(1)*, 143.
67. Elik, A.; *Talanta* **2005**, *66*, 882.
68. Liva, M.; Muñoz-Olivas, R.; Camara, C.; *Talanta* **2000**, *51*, 381.
69. Nascentes, C.C.; Korn, M.; Arruda, M.A.Z.; *Microchem. J.* **2001**, *69*, 37.
70. Arruda, S.C.C.; Rodriguez, A.P.M.; Arruda, M.A.Z.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 470.
71. El Azouzi, A.; Cervera, M.L.; de la Guardiã, M.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, *13*, 533.
72. Zakharova, E.A.; Deryabina, V.I.; Slepchenko, G.B.; *J. Anal. Chem.* **2005**, *60*, 503.
73. Cypriano, J. C.; Matos, M. A. C; Matos, R. C.; *Microchemical Journal* **2008**, *90*, 26.
74. Bangroo, P.N.; Jagga, C.R.; Arora, H.C.; Rao, G.N.; *Atom Spectrosc.* **1995**, *16*, 118.
75. Fontana, A.; Braekman-danheux, C.; Jung; *Fuel Process. Technol.* **1996**, *502*, 107.
76. Agilent Technologies; *Understanding Your Chemstation*, Ed. 08/01, Germany, 2001.
77. Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 6ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2005.
78. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
79. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L.; *Practical HPLC method development*, 2ª ed., John Wiley & Sons, Inc: New York, 1997.
80. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.

81. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, 1ª reimpressão, Editora UNICAMP: Campinas, 2006.
82. ASTM – American Society for Testing Materials (2001). Annual Book of ASTM Standards. Section E 682 – 93, vol 14.01.
83. Fiamegos, Y. C.; Nanos, C. G.; Vervoort, J.; Stalikas, C. D.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1041*, 11.