

Otimização da metodologia para determinação de carboidratos estruturais em forrageiras por HPLC com detecção no UV

Rafael M. Dornellas^{1*} (PG), Vanézia L. da Silva¹ (PG), Michele F. Resende¹ (IC), Jailton da C. Carneiro²(PQ), Renato C. Matos¹ (PQ), Maria A. C. Matos¹(PQ)

*rafaeldornellas@oi.com.br, maria.auxiliadora@ufjf.edu.br

¹NUPIS – Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e Separação Analíticas, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG

²EMBRAPA Gado de Leite – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Gado de Leite, Juiz de Fora - MG.

Palavras Chave: forrageira, HPLC, carboidratos estruturais.

Introdução

Os carboidratos são importantes na nutrição de ruminantes, sendo sua principal fonte de energia. Nos ruminantes, 70 a 90% dos carboidratos consumidos são oriundos da parede celular vegetal. A parede celular é composta por: celulose que é um polímero de glicose; hemicelulose, composta por arabinose e xilose e a pectina que é composta por arabinose e galactose. Neste trabalho propomos um método por cromatografia líquida de alta eficiência para separação e quantificação dos carboidratos estruturais, glicose (GLI), arabinose (ARA) e xilose (XIL) em amostras de forrageiras tropicais. Sendo a detecção realizada na região do UV após derivatização pré-coluna com ácido p-aminobenzóico (PABA).

Resultados e Discussão

As medidas foram realizadas em um HPLC Agilent 1100 series, detector UV-VIS MWD, injetor manual (20 µL) e coluna de RP C-18 Zorbax ODS. Os parâmetros estudados na otimização do método foram: composição, fluxo e pH da fase móvel, comprimento de onda para detecção. Foram testados diferentes solventes orgânicos (tetraidrofurano, acetonitrila, metanol) e soluções aquosas de ácido fosfórico em diferentes valores de pH. A melhor condição foi obtida com eluição isocrática usando fase móvel acetonitrila/solução de H₃PO₄ pH 2,15 (1:99), fluxo de 1,50 mL.min⁻¹ e detecção em 305 nm. Para determinação dos carboidratos estruturais as amostras foram previamente extraídas com etanol 80% empregando ultra-som e em seguida tratadas com H₂SO₄ em banho ultratermostático a 30° C¹; depois realizou-se uma hidrólise com H₂SO₄ 1,20 mol.L⁻¹ em chapa de aquecimento a 100° C. Os parâmetros desta última etapa foram estudados e comparados com o método usual em autoclave (TABELA 1). Os parâmetros estudados para a derivatização dos carboidratos estruturais com PABA foram: concentração do PABA, tempo e temperatura de reação². A melhor condição de derivatização obtida

foi de 10 minutos em um banho ultratermostático a 80° C, com a solução de PABA 0,12 mol.L⁻¹.

TABELA 1. Concentrações médias (desvio padrão relativo percentual) obtidos para GLI, ARA e XIL em amostras de *Cynodon* (mg.g⁻¹ mat. seca) extraídas por autoclave e chapa de aquecimento.

Análito	Concentração em mg.g ⁻¹ mat. seca			
	Autoclave 120° C		Chapa de aquecimento 100° C	
	Extração 1	Extração 2	Extração 1	Extração 2
Glicose	291,32 (1,4)	290,22 (1,6)	301,16 (0,4)	300,29 (1,3)
Arabinose	31,67 (0,7)	31,41 (2,3)	35,24 (2,1)	35,20 (0,8)
Xilose	102,16 (1,0)	99,22 (4,9)	153,21 (0,3)	153,09 (0,9)

Os parâmetros avaliados na otimização do método foram à linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e recuperação. A curva analítica foi linear na faixa de 0,16 a 0,80 mmol.L⁻¹ para GLI e XIL e 0,05 a 0,30 mmol.L⁻¹ para ARA com os seguintes coeficientes de correlação: 0,99916 (GLI), 0,99964 (ARA) e 0,99955 (XIL). Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,37 e 0,99 µmol.L⁻¹ para GLI, 0,11 e 0,30 µmol.L⁻¹ para ARA, 0,32 e 0,86 µmol.L⁻¹ para XIL. A recuperação das amostras fortificadas variou de 92 a 95 % para GLI, de 82 a 84 % para ARA e de 72 a 74 % para XIL.

Conclusões

A metodologia proposta apresentou-se linear, com boa repetibilidade (DPR < 4,7%) e baixos limites de detecção e quantificação. A recuperação obtida para as amostras fortificadas foi satisfatória (72 a 95 %) devido à grande manipulação e número de etapas que envolvem a extração. Em relação à autoclave (DPR < 4,9%), a chapa de aquecimento (DPR < 2,1%) foi mais eficiente e reproduzível apresentando um menor custo e tempo para extração dos carboidratos em forrageiras.

Agradecimentos

PROPESQ/UFJF, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

¹ Brito, C. J. F. A.; Rodella, A. R.; Deschamps F. C.; *R. Bras. Zootec.*, **2003**, v.32, n.6, p.183534-184439.

² Meyer, A.; Raba, C.; Fischer, K.; *Anal. Chemistry*; **2001**, v.73, p.2377-2382.