

TESTE DE HEPTANOS PARA USO NA QUANTIFICAÇÃO DE N-ALCANOS EM PLANTAS FORRAGEIRAS E FEZES DE RUMINANTES

HECK, Rosane Teresinha¹; GENRO, Teresa Cristina Moraes²; SOLARI, Fabiano Lopes²

¹ Curso de Engenharia de Alimentos- UNIPAMPA; ² Embrapa Pecuária Sul.
heck.rosane@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os n-alcenos fazem parte da cera cuticular das plantas, a qual geralmente é uma mistura complexa de lipídios alifáticos sintetizados pela planta (DOVE & MAYES, 2005). Eles são compostos orgânicos de cadeia aberta e formados por carbono e hidrogênio, onde a diferença entre dois membros sucessivos da série é constante (são homólogos), e onde há o prefixo n (normal) para os diversos alcanos, por maiores que sejam as moléculas, desde que os átomos de carbono se encontrem em cadeia contínua, sem ramificações. Nas plantas forrageiras, a concentração maior é de alcanos de cadeia ímpar, do C₂₁ ao C₃₇ e cada planta possui um perfil característico dessas ceras, como se fosse uma impressão digital para cada indivíduo (Dove e Mayes, 1991).

Na nutrição animal, os n-alcenos são usados para determinar produção fecal, digestibilidade, e indiretamente, o consumo dos animais em pastejo. Dove e Mayes (2006) relataram que é possível explorar as diferenças nos perfis dos n-alcenos entre as plantas para determinar composição da dieta através de comparações dos perfis das plantas com o padrão encontrado nas fezes. Assim, com uma única análise, é possível determinar vários parâmetros importantes para a nutrição de herbívoros em pastejo. Para as estimativas de consumo de ruminantes em pastejo se usam os n-alcenos C₃₁, C₃₂ e C₃₃, encontrados no pasto e nas fezes dos animais experimentais. Para estudar a composição da dieta, são usados o maior número de alcanço possível, geralmente os n-alcenos a partir do C₂₅ até o C₃₇.

A análise dos n-alcenos, como a maioria dos lipídios, envolve extração com solvente, purificação para separar do extrato bruto a classe de lipídios estudada, seguida da análise individual dos analitos por cromatografia gasosa. Na metodologia proposta por Dove e Mayes (2006), o n-heptano é utilizado como um solvente na extração de n-alcenos. Este solvente precisa atender aos padrões analíticos de qualidade cromatográfica, cujo custo é alto, fazendo com que suba o custo de análise destas ceras. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo testar diferentes n-heptanos como solvente de ceras a fim reduzir os custos laboratoriais, mas mantendo o padrão analítico de qualidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sul, localizada em Bagé, RS. Em abril de 2012, foram testados seis n-heptanos encontrados no mercado, denominadas pelas letras A, B, C, D, E, F e o heptano HPLC que vinha sendo usado no laboratório foi denominado pela letra "T". Na Tab. 1, pode se observar a classificação dos heptanos testados, bem como o teor de pureza e o valor pago pelo litro do reagente em março de 2012.

Para o teste com os heptanos, foram usadas duas amostras de fezes e duas amostras de azevém (*Lolium multiflorum* L.), provenientes de uma avaliação de

consumo de forragem de novilhos de corte em pastejo. As amostras foram secas em estufa de ar forçado, a 60°C, moídas e armazenadas em recipiente plástico.

Tabela 1-Tipo do produto e teor de pureza obtidos nos laudos dos reagentes analíticos testados e o preço de compra

Heptano	Produto	Teor (%)	Valor unitário (litro) (R\$)
A	Heptano P.A.	99,89	100,00
B	n-Heptano P.A.	99,62	126,00
C	n-Heptano P.A.	99,94	120,00
D	n-Heptano P.A.	99,95	150,00
E	n-Heptano P.A.	99,50	150,00
F	n-Heptano P.A.	99,40	200,00
T	Heptano HPLC	99,40	212,00

A quantificação dos n-alcanos, das amostras (fezes e forragem) seguiu a metodologia do protocolo descrito por Dove e Mayes (2006). Foram feitas extrações dos alcanos usando os seis heptanos testados e o padrão, nas duas amostras de fezes e de forragem. Foram usados 2 ml do solvente para amostras de forragem e 1,5 ml para fezes. Os mesmos também foram usados para a purificação dos alcanos (3,4 ml).

A identificação e quantificação dos n-alcanos foi determinada por cromatografia gasosa, usando um SHIMADZU GC-2010 equipado com detector de ionização de chama (FID), um carrossel automático AOC-20S e um auto injetor AOC-20i. Os n-alcanos extraídos foram injetados (1µl) para dentro de uma coluna Rtx®-5 RESTEK (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, absorvente composto por 5% difenil e 95% dimitil polisiloxane). O gás de arraste foi o N₂ a um fluxo constante de 30 ml min⁻¹. Gradientes de temperatura foram controlados para o injetor (270°C) e a coluna (170°C por 1 min; 30°C/min até 215°C espera de 1 min e 6°C min⁻¹ para 300°C; 21min). A temperatura do FID foi mantida a 340°C.

O procedimento de GC foi calibrado com uma solução de padrão externo contendo uma mistura sintética dos n-alcanos C₇ a C₄₀ (>99% de pureza, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) com concentrações similares aquelas encontradas nos extratos. As áreas dos picos cromatográficos correspondentes a cada n-alcano foram determinadas por meio do programa Shimadzu GC Solution, no qual a identificação dos n-alcanos de comprimento de cadeia entre C₂₀ a C₃₆ se baseou na comparação com o padrão externo, pelo tempo de retenção médio de cada n-alcano na coluna. Os picos identificados, foram convertidos em quantidades de n-alcanos tendo por referência o padrão interno tetratriacontano (C₃₄) e calculados em mg/kg de matéria seca (MS). Para este cálculo, foi realizado análise de teor de matéria seca nas amostras de fezes e forragem (AOAC, 1996).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, arranjado em um fatorial 7X2, onde foram testados sete heptanos (A, B, C, D, E, F, T) em dois tipos de amostras (fezes e forragem), com duas repetições. Todas as

variáveis estudadas foram submetidas à análise da variância e contrastes ortogonais entre o heptano padrão (T) e os demais para comparação entre médias e também teste de Tukey para comparar as médias. O programa estatístico utilizado nas análises foi o JMP, versão 9.0.0 (SAS Institute Inc., 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferenças entre o heptano considerado como padrão (T) neste ensaio e os outros (A, B, C, D, E, F), quando testados por contraste ortogonal. Por isto são apresentados aqui as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Os resultados obtidos podem ser vistos nas Tab. 2 e 3. Não houve diferença significativa na quantidade (mg/kg MS) de n-alcenos C₂₃, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₃, C₃₅ e C₃₆, em nenhum dos heptanos avaliados (Tab. 2).

Tabela 2 – Concentração média de alcanos (mg/kg de MS) extraídos pelos heptanos testados

N-alcenos	Heptano						
	A	B	C	D	E	F	T
C ₂₃	6,73	7,04	6,91	6,44	6,30	6,17	6,45
C ₂₅	26,50	27,00	27,91	26,63	26,13	25,66	26,88
C ₂₆	3,44	3,62	3,75	3,21	2,87	2,92	2,85
C ₂₇	68,47	69,89	70,47	69,60	69,06	68,28	70,35
C ₂₉	300,41	304,69	301,44	304,85	303,36	302,51	307,04
C ₃₀	27,62	28,00	29,11	28,25	27,98	27,74	28,26
C ₃₁	513,65	517,52	513,38	520,87	516,94	516,21	520,89
C ₃₂	60,66 ^b	60,99 ^b	68,19 ^a	62,48 ^b	61,70 ^b	61,49 ^b	62,71 ^b
C ₃₃	161,96	161,07	161,44	163,60	163,03	162,58	163,37
C ₃₅	16,39	15,81	16,44	16,32	16,58	16,44	16,48
C ₃₆	1,46	1,56	1,48	1,57	1,62	1,61	1,64

* Letras distintas na mesma linha representam diferença significativa entre os heptanos testados pelo teste de Tukey (P<0,005)

O dotriacontano (C₃₂) apresentou maior extração com o heptano C (P<0,001). Houve interação entre heptano testado e tipo de amostra (fezes e forragem) nos hidrocarbonetos C₂₄ (P<0,003) e C₂₈ (P<0,001; Tab.3).

Os valores médios de C₂₄ e C₂₈, em mg/kg de MS, foram maiores nas amostras de fezes do que na forragem (P<0,005). Amostras de fezes sempre apresentam valores mais altos de n-alcenos porque nas fezes há concentração deste devido à digestibilidade da forragem que o animal está consumindo e a velocidade com que este alimento passa no rúmen (Brosh et al., 2003).

A quantificação de C₂₄ nas amostras de fezes não diferiram entre si, mas houve diferenças na extração deste hidrocarboneto nas amostras de forragem, onde o heptano T apresentou maiores valores (P<0,005). O heptano T apresentou menores valores de C₂₈ nas fezes que os demais heptanos testados. Já para as amostras de forragem, os heptanos C, F e T apresentaram maiores valores de C₂₈.

É necessário fazer uma análise cromatográfica dos heptanos testados para afirmar que as diferenças encontradas na quantificação dos n-alcenos C₂₄, C₂₈ e C₃₂ se devem realmente a uma maior capacidade de extração destes solventes ou se eles apresentam alguma contaminação que pode estar sendo computada como n-alceno. Talvez possam estar presentes isômeros destes alcanos nos heptanos testados.

Tabela 3 – Concentração média de alcanos (mg/kg de MS) extraídos pelos heptanos testados, conforme o tipo de amostra

	mg/Kg.MS	Tipo de Heptano						
		A	B	C	D	E	F	T
C ₂₄	Fezes	1,88 ^{ab}	1,89 ^{ab}	1,77 ^{abcd}	1,78 ^{abc}	2,30 ^a	1,51 ^{abcde}	1,51 ^{abcde}
	Forragem	0,80 ^{de}	0,84 ^{cde}	0,79 ^{de}	0,71 ^e	0,95 ^{bcde}	0,66 ^e	2,11 ^a
C ₂₈	Fezes	16,27 ^a	16,41 ^a	16,08 ^a	15,24 ^{ab}	15,86 ^a	16,47 ^a	13,22 ^b
	Forragem	3,66 ^d	4,09 ^d	5,22 ^{cd}	3,82 ^d	4,41 ^d	4,66 ^{cd}	7,17 ^c

* Letras distintas na linha representam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,005)

Existem poucos dados na literatura que relatem perfil de n-alcanos em azevém. Dove e Mayes (1991), em sua revisão sobre o uso de n-alcanos na nutrição de ruminantes, relataram valores médios de concentração de alcanos para esta espécie forrageira semelhantes para alguns dos analitos avaliados neste estudo. Os valores aqui encontrados foram: 17,32; 36,12; 4,72; 155,8; 13,93; 257,10; 8,46; 74,66 e 7,94 mg/kg de MS para os n-alcanos C₂₅, C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃ e C₃₅, respectivamente. Somente o C₂₉ ficou abaixo dos valores apresentados pelos autores acima citados. As causas para esta diferença podem ser idade da planta, maior percentual de colmo na amostra porque este componente tem menor concentração de n-alcanos do que as folhas.

4 CONCLUSÃO

Todos os heptanos testados podem ser usados para extração de n-alcanos para determinar consumo de ruminantes em pastejo, sendo a escolha do reagente, dependente do preço do mesmo.

Para avaliar composição da dieta em ruminantes, devem ser realizadas análises cromatográficas dos heptanos para comprovar a inexistência de substâncias que possam comprometer a quantificação de n-alcanos das amostras.

5 REFERÊNCIAS

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, 16, 3rd revision, Gaithersburg, MD. 1996.

BROSH, A., HENKIN, Z., ROTHMAN, S. J., et al. Effects of faecal n-alkane recovery in estimates of diet composition. **J. of Agric. Sci.**, v.140, p.93–100, 2003.

DOVE, H., MAYES, R.W. Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. **Nature Protocol**, Vol. 1, n. 4, p. 1680-1697, 2006.

DOVE, H., MAYES, R.W. Using n-alkanes and other plant wax components to estimate intake, digestibility and diet composition of grazing/browsing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.59, p. 123-139, 2005.

DOVE, H.; MAYES, R.W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. **Aust. J. Agric. Res.**, v.42, p.913-952, 1991.