

# Determinação de Ânions em Grãos de Destiladores Secos com Solúveis

Kassandra Oates, Brian De Borba e Jeffrey Rohrer  
Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EUA

## Palavras-Chave

Coluna Dionex IonPac AS11, Minerais, Coprodutos de Etanol, Composição de Nutrientes, Biocombustível, Ração Animal

## Introdução

Os grãos dos destiladores são um coproduto do processo de produção de biocombustíveis e são utilizados como ração animal há quase um século. Devido ao crescente interesse em combustíveis alternativos, aliado ao aumento do custo do farelo de milho e soja, a indústria de grãos de destilaria registrou um crescimento significativo. Quando presentes em rações para animais, os grãos de destiladores são uma excelente fonte de energia, proteína e minerais essenciais que fornecem três vezes a quantidade de nutrientes disponíveis a partir de grãos não processados.<sup>1</sup> Como a composição nutricional dos grãos de destiladores secos com solúveis (DDGS) pode variar de lote a lote, a indústria de destilaria está interessada em determinar a composição de DDGS para formular adequadamente uma dieta nutricionalmente equilibrada para a indústria de ração animal.<sup>2</sup>

Muitos fatores contribuem para a variabilidade de nutrientes do DDGS, incluindo híbrido e rendimento de milho, características de fermentação, equipamentos de processamento e produtos químicos, além de tempos e temperaturas de secagem. A variabilidade mineral do DDGS em um único estudo relatou coeficientes de variação tão altos quanto 25%.<sup>2</sup> Essa variabilidade de nutrientes pode ter efeitos negativos na indústria de grãos de destiladores, exigindo que o consumidor complemente a dieta dos animais para atender às suas necessidades nutricionais. Altas concentrações e baixa biodisponibilidade de alguns minerais podem levar a graves distúrbios nutricionais.

Dois minerais que contribuem para a variabilidade do DDGS são enxofre e fósforo. A ingestão total de enxofre é monitorada em um nível máximo tolerável de 0,4% para minimizar o risco de desenvolver polioencefalomalácia (PEM), um distúrbio grave que pode causar cegueira, coma, convulsão e até morte. O enxofre é um mineral não metálico essencial que ocorre naturalmente no DDGS a ~0,2%; no entanto, foi relatado em níveis tão altos quanto 1%.



O excesso de enxofre é visto na forma de enxofre ou sulfato inorgânico e é originário predominantemente do ácido sulfúrico usado no processo de produção, em particular da limpeza das colunas de destilação.<sup>3</sup>

O fósforo é outro mineral essencial para dietas de animais. As concentrações totais de fósforo no DDGS podem variar de 0,5 a 1%. No entanto, existem muitas formas de fósforo e nem todas podem ser digeridas por animais não ruminantes, como aves e suínos.<sup>4,5</sup> O fósforo disponível total é relatado em 0,04% no milho e 0,7% no DDGS.<sup>6</sup> O aumento do fósforo disponível no DDGS.<sup>6</sup> é devido à liberação hidrolítica enzimática e não enzimática dos grupos fosfato do fitato, como resultado do aumento da temperatura e das mudanças de pH durante a fermentação e o processamento. Portanto, os níveis de fosfato indicam a extensão da hidrólise do fitato e podem ser usados para determinar a biodisponibilidade do fósforo.<sup>5</sup>

## Objetivo

Desenvolver um método rápido (<10 min) para a determinação de cloreto, sulfato e fosfato em DDGS

## Equipamento

- Sistema Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-2100\* Cromatografia de Íons Integrada Sem Reagentes™ (RFICTM), incluindo:
  - Bomba Isocrática
  - Desgaseificador a Vácuo
  - Gerador Eluente
  - Gabinete do Aquecedor de Coluna
  - Injetor de 6 Portas de Alta Pressão
  - Célula de Condutividade e Detector
- Amostrador Automático Thermo Scientific Dionex AS-AP\*\*
- Cartucho do Gerador de Eluente de Hidróxido de Potássio Thermo Scientific Dionex, EGC III KOH (No de Peça 074532)
- Software de Sistema de Dados de Cromatografia Thermo Scientific Dionex Chromeleon™ versão 7.1
- Hélio ou nitrogênio; 4,5 grau (99,995%) ou melhor
- Kit de Frascos, 1,5 mL de polipropileno com Tampas e Septos (No de Peça 079812)
- Tubo de Centrífuga de Plástico para Leitor Fácil Fisherbrand™ Estéril, Polipropileno; Fecho superior plano, 15 mL (Fisher Scientific No de Peça 07-200-886)

\*Um sistema Dionex ICS-5000 ou qualquer outro sistema Dionex ICS capaz de geração de eluentes que também usa colunas de 2 mm também pode ser usado para esta aplicação.

\*\*Um amostrador automático Dionex AS ou AS-DV também pode ser usado com este aplicativo.

## Reagentes e Padrões

- Água deionizada (DI), classe de reagente Tipo I, resistência de 18 MΩ-cm ou superior
- Cloreto de Sódio Cristalino, Certificado ACS (Fisher Scientific No de Peça S271500)
- Sulfato de Potássio, Cristalino, Certificado ACS (Fisher Scientific No de Peça P304-500)
- Fosfato de Potássio Dibásico Anidro, Pó Cristalino, Certificado ACS (Fisher Scientific No de Peça P288-500)
- Padrão de Cloreto de Dionex Thermo Scientific, 1000 µg/mL em água (No de Peça 037159)
- Padrão de Sulfato Dionex Thermo Scientific, 1000 µg/mL em água (No de Peça 037160)
- Padrão de Fosfato, 1000 µg/mL em água (TOC baixo, <50 ppb) (No de Peça Ultra Scientific ICC-005)

## Amostras

DDGS (A amostra foi doada generosamente)

## Condições

Colunas:	Dionex IonPac™ AS11 Analítica, 2 × 250 mm (Nº de Peça 044077) Proteção Dionex IonPac AG11, 2 × 50 mm (Nº de Peça 044079)
Eluente:	-5–0 min KOH 3 mM, 0–5 min KOH 3–15 mM, passo de 5 min a 25 mM KOH, 5–7,5 min KOH 25 mM
Fonte de Eluente:	Dionex EGC III KOH com Coluna de Armadilha de Ânions Regenerada Continuamente Dionex CR-ATC Thermo Scientific
Quociente de vazão:	0,5 mL/min
Volume de Injeção:	5 µL
Temperatura	30 °C
Deteção:	Condutividade suprimida, Thermo Scientific Dionex ASRS™ 300 Supressor de Auto Regeneração Aniônica™, 2 mm (N/P 064555) no modo de reciclagem, 31 mA
Contrapressão do Sistema:	~2200 psi
Condutância em segundo plano:	<0,4 µS
Ruído Típico:	<1,4 nS
Tempo de Execução:	7,5 min

## Preparação de Soluções e Reagentes

### Soluções Padrão Estoque de 10.000 mg/L

Prepare soluções estoque separadas para 10.000 mg/L pesando as quantidades apropriadas dos analitos necessários em um frasco de polipropileno de 125 mL (Tabela 1). Tare a balança, adicione 100 mL de água DI, tampe a garrafa e agite até que as partículas sólidas estejam completamente dissolvidas. As soluções são estáveis por pelo menos um mês quando armazenadas a 4 °C.

### Soluções Padrão Estoque de 1000 mg/L

Compre padrões certificados da Thermo Fisher Scientific ou de outra fonte respeitável. Como alternativa, prepare soluções estoque separadas de 1000 mg/L pesando as quantidades apropriadas dos analitos necessários em um frasco de polipropileno de 125 mL (Tabela 1). Tare a balança, adicione 100 mL de água deionizada, tampe a garrafa e agite até que as partículas sólidas estejam completamente dissolvidas. As soluções são estáveis por pelo menos um mês quando armazenadas a 4 °C.

Tabela 1. Preparação da solução padrão estoque.

Analito	Composto	Quantidade Adicionada para Preparar uma Solução de 10.000 mg/L (g)	Quantidade Adicionada para Preparar uma Solução de 1000 mg/L (g)	Quantidade de Água DI Adicionada (g)
Cloreto	Cloreto de Sódio	1,65	0,165	100
Sulfato	Sulfato de Potássio	1,81	0,181	100
Fosfato	Fosfato de Potássio Dibásico Anidro	1,83	0,183	100

### Solução Padrão de Calibração Estoque Mista

Prepare uma solução padrão de calibração de estoque mista contendo 5, 40 e 40 mg/L de cloreto, sulfato e fosfato, respectivamente. Coloque uma garrafa de polipropileno de 125 ml em uma balança e tare-a. Usando as soluções padrão de 1000 mg/L, adicione 0,5, 4,0 e 4,0 mL de cloreto, sulfato e fosfato, respectivamente. Adicione água DI até o peso atingir 100g, tampe e agite para misturar.

### Soluções Padrão de Calibração de Trabalho

Use a solução estoque mista para executar seis diluições e fornecer um total de sete padrões de calibração. Para este estudo, os padrões de calibração foram preparados em 5, 2,5, 1,2, 0,6, 0,3, 0,16, 0,08 mg/L para cloreto e 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,2 e 0,6 mg/L para sulfato e fosfato. A solução padrão de calibração estoque mista foi usada como a solução de trabalho de calibração mais alta.

### Preparação de Amostra

Para garantir que uma amostra representativa de DDGS seja analisada, misture bem o material sólido e retire partes de três áreas diferentes de DDGS. Pese 1 g de DDGS em uma garrafa de polipropileno de 125 mL e adicione água deionizada até a balança exibir 100 g. Tampe a garrafa, agite para misturar e sonique por 5 min. Transfira uma porção de 12 mL do líquido para um tubo de centrifuga descartável de polipropileno de 15 mL com tampa e centrifugue a 5000 rpm por 10 min. Realize uma diluição final de 1:10 transferindo 1 g do sobrenadante para um frasco de 20 mL de polipropileno e aumentando em volume (10 g) com água deionizada.

### Soluções de Amostra Aumentadas

Adicione a quantidade adequada da solução padrão estoque de 10.000 mg/L de cada ânion diretamente a 1g de uma porção representativa da amostra DDGS seca e continue seguindo o procedimento de Preparação de Amostra.

## Resultados e Discussão

### Separação e Detecção

A separação de cloreto, sulfato e fosfato foi obtida em uma coluna Dionex IonPac AS11 (2 × 250 mm) em <10 min, usando um gradiente de eluente de hidróxido e detectado por detecção de condutividade suprimida. A coluna Dionex IonPac AS11 foi projetada para separar uma ampla gama de pequenos ácidos orgânicos, que frequentemente estão presentes nesses tipos de amostras, dos ânions inorgânicos comuns. A Figura 1 mostra o mais alto padrão de calibração contendo 5, 40 e 40 mg/L de cloreto, sulfato e fosfato, respectivamente. Este cromatograma mostra excelente forma de pico e assimetria com fatores de rejeição <1,5 para todos os três ânions. A Figura 2 mostra uma amostra típica de DDGS preparada usando as condições descritas neste estudo. Os tempos de retenção de cloreto, sulfato e fosfato foram de 1,7, 4,5 e 6,8 min, respectivamente. Os picos não identificados, que se acredita serem pequenos ácidos orgânicos e resíduos do processo de fermentação, estão presentes em 1,1, 3,8, 4,8 e 7,5 minutos.

Coluna:	Dionex IonPac AG11, AS11, 2 mm	Fluxo:	mg/L
Eluente:	-5-0 min 3 mM KOH, 0-5 min 3-15 mM KOH, passo em 5 min a 25 mM de KOH, 5-7,5 min 25 mM KOH	1. Cloreto	5
Fonte de Eluente:	Dionex EGC III KOH com Dionex CR-ATC	2. Sulfato	40
Quociente de vazão:	0,5 mL/min	3. Fosfato	40
Inj. Volume	5 µL		
Temp:	30 °C		
Deteção:	Dionex ASRS 300 (2 mm), modo de reciclagem, 31 mA		
Amostra:	Padrão de calibração		

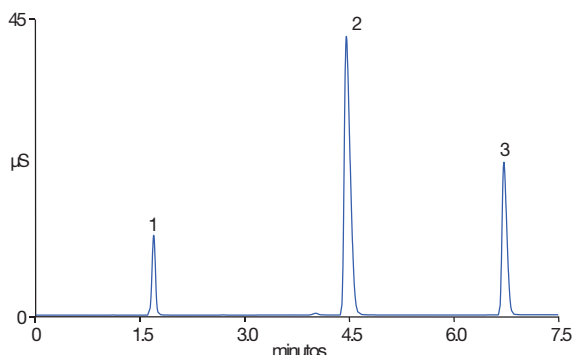


Figura 1. Separação de cloreto, sulfato e fosfato na coluna Dionex IonPac AS11.

Coluna:	Dionex IonPac AG11, AS11, 2 mm
Eluente:	-5-0 min 3 mM KOH, 0-5 min 3-15 mM KOH, passo em 5 min a 25 mM de KOH, 5-7,5 min 25 mM KOH
Fonte de Eluente:	Dionex EGC III KOH com Dionex CR-ATC
Quociente de vazão:	0,5 mL/min
Inj. Volume	5 µL
Temp:	30 °C
Deteção:	Dionex ASRS 300 (2 mm), modo de reciclagem, 31 mA
Amostra:	Amostra DDGS

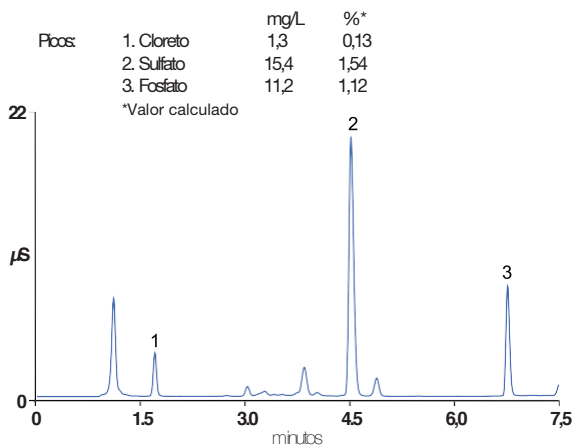


Figura 2. Determinação de ânions em uma amostra DDGS.

### Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para determinar a linearidade do método, os padrões de calibração foram injetados em triplicado em sete níveis de concentração dentro dos intervalos de calibração listados na Tabela 2. Os níveis de calibração foram determinados com base em quantidades típicas relatadas na literatura.<sup>2,6</sup> Todos os três analitos demonstraram coeficientes de determinação > 0,999.

Os limites de detecção (LODs) e limites de quantificação (LOQs) foram estimados para o método usando uma amostra DDGS preparada. O LOD e LOQ são definidos como três vezes a relação sinal/ruído (S/N) e 10 vezes a S/N, respectivamente. Ao medir o ruído pico a pico entre 5 e 6 minutos em sete injeções consecutivas da amostra DDGS, o ruído da linha de base do sistema para LOD e LOQ foi determinado em 1,4 nS. Este método demonstrou LODs e LOQs de amostra em baixo µg/L para todos os três ânions (1,7-5,7 µg/L e 5,7-18,8 µg/L, respectivamente). A Tabela 2 resume os dados de calibração, LOD e LOQ.

Tabela 2. Linearidade, LODs e LOQs.

Analito	Faixa de Calibração (mg/L)	Linearidade <sup>1</sup> (r <sup>2</sup> )	LOD <sup>2</sup> (µg/L)	LOQ <sup>3</sup> (µg/L)
Cloreto	0,08-5,0	0,9999	1,7	5,7
Sulfato	0,6-40,0	0,9999	3,3	10,9
Fosfato	0,6-40,0	0,9999	5,7	18,8

<sup>1</sup>Sete níveis de calibração, cada nível injetado em triplicado

<sup>2</sup>LOD calculado como 3 × S/N

<sup>3</sup>LOQ calculado como 10 × S/N

### Análise de Amostra

Antes da análise, os ânions foram extraídos de uma amostra de 1 g de DDGS por extração assistida por ultrassom em 100 mL de água DI, seguida por centrifugação e uma diluição de 10 vezes. A quantidade média de cloreto, sulfato e fosfato em três preparações separadas foi de 1,3, 15,4 e 11,2 mg/L (0,13, 1,5 e 1,1%) com RSDs na área de pico de 0,55, 0,96 e 0,89%, respectivamente, acima de 21 injeções (três amostras injetadas sete vezes cada). Os valores medidos para cloreto e fosfato concordam com os valores relatados pelas indústrias de destilaria e alimentação; no entanto, os níveis de sulfato foram ligeiramente superiores aos típicos.<sup>2,7</sup>

### Exatidão e Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da realização de várias injeções de padrões e soluções de amostras. A precisão da área de pico foi medida avaliando RSDs para cinco injeções replicadas das concentrações mais baixa e mais alta na faixa de calibração. Na extremidade mais baixa da faixa de calibração, RSDs da área de pico foram <1 e, na extremidade mais alta, os RSDs da área de pico foram <0,2. As amostras também foram preparadas com 75%, 100% e 125% do peso inicial dos grãos (0,75 g, 1,0 g e 1,25 g, respectivamente). Nessa faixa, as quantidades de cloreto, sulfato e fosfato nas amostras foram determinadas em 0,13%, 1,49-1,52% e 1,08-1,11%, respectivamente, com precisão da área de pico de <0,5% para amostras preparadas a 75% e 100% de peso inicial de grãos e <0,7% para amostras preparadas com 125% de peso inicial de grãos. Esses dados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Analitos medidos em diferentes pesos de grãos iniciais.

(n = 7)	Cloreto		Sulfato		Fosfato	
	Quantidade Média Calculada de Cloreto na Amostra (%)	Área de Pico RSD	Quantidade Média Calculada de Sulfato na Amostra (%)	Área de Pico RSD	Quantidade Média Calculada de Fosfato na Amostra (%)	Área de Pico RSD
0,75	0,13	0,41	1,52	0,44	1,11	0,43
1,00	0,13	0,40	1,49	0,50	1,08	0,48
1,25	0,13	0,59	1,49	0,63	1,09	0,69

Tabela 4 Recuperação de cloreto, sulfato e fosfato em amostras com DDGS enriquecido.

Cloreto		Sulfato		Fosfato	
Concentração Final Aumentada (mg/L)	Valor Recuperado (%)	Concentração Final Aumentada (mg/L)	Valor Recuperado (%)	Concentração Final Aumentada (mg/L)	Valor Recuperado (%)
0,27	107	3,13	102	2,30	104
0,55	100	5,87	99,2	4,59	97,5
1,16	100	12,4	101	9,15	99,0
1,49	97,5	15,5	98,4	11,5	96,2
1,71	97,9	18,5	98,8	13,7	96,5

A precisão do método foi avaliada calculando a recuperação dos analitos da adição de concentrações conhecidas dos ânions alvo diretamente no grão seco a ~1,2, 1,0, 0,8, 0,4 e 0,2 vezes a quantidade esperada. As recuperações variaram de 97 a 107%, 98 a 102% e 96 a 104% para cloreto, sulfato e fosfato, respectivamente (Tabela 4). Esses valores sugerem boa precisão do método.

### Conclusão

Este método fornece uma abordagem simples e precisa para determinar os ânions solúveis em água (por exemplo, cloreto, sulfato e fosfato) que contribuem para a composição nutricional do DDGS. A separação desses ânions é realizada em uma coluna Dionex IonPac AS11 em <10 min. O método demonstra excelente forma de pico, linearidade ( $r^2 > 0,999$ ), exatidão (recuperações com pico de 96 a 107%), precisão (RSDs na área de pico <1) e limites de detecção na faixa baixa de  $\mu\text{g/L}$  (LODs de 1,7 a 5,7  $\mu\text{g/L}$  e LOQs 5,7-18,8  $\mu\text{g/L}$ ). A preparação simples da amostra e o gerador de eluente eletrolítico aprimoram a facilidade de uso, a reprodutibilidade e o nível de automação do método.

### Referências

- Weiss, B.; Eastridge, M.; Shoemaker, D.; St-Pierre, N. Ohio State University Extension Fact Sheet: Distillers Grains [Online] 2007, <http://ohioline.osu.edu/as-fact/pdf/distillers.pdf> (acessado em 30 de outubro de 2012).
- Liu, K. Chemical Composition of DDGS. In Distillers Grains: Production, Properties, and Utilization; Liu, K., Rosentrater, K.A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2012; pp 143–178.
- Zhang, Y. Sulfur Concentration in Distiller's Dried Grains with Solubles (DDGS) and Its Impact on Palatability and Pig Performance; NPB #08-093; Research Report for Animal Science–Nutritional Efficiency Consortium; National Pork Board: Des Moines, IA, 30 de janeiro, 2010.
- Angel, R.; Tamim, N. M.; Applegate, T. J.; Dhandu, A. S.; Ellestad, L. E. Phytic Acid Chemistry: Influence on Phytin-Phosphorus Availability and Phytase Efficacy. *J. Appl. Poult. Res.* 2012, 11, 471–480.
- Noureddini, H.; Malik, M.; Byun J.; Ankeny, A.J. Distribution of Phosphorus Compounds in Corn Processing. *Bioresour. Technol.* 2009, 100 (2), 731–736.
- Combustível limpo de etanol do Kansas da Kansas Farms; Ficha técnica para a alimentação de destiladores de grãos. [Online] [www.ksgrains.com/ethanol/DDGSFacts.pdf](http://www.ksgrains.com/ethanol/DDGSFacts.pdf) (acessado em 8 de novembro de 2012).
- Conselho de Tecnologia de Grãos de Destiladores; Análise de composição: Distillers Dried Grains with Solubles (DDGS). [Online] [www.distillersgrains.org/files/grains/Composition%20Analysis.pdf](http://www.distillersgrains.org/files/grains/Composition%20Analysis.pdf) (acessado em 31 de outubro de 2012).

[www.thermofisher.com/dionex](http://www.thermofisher.com/dionex)

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas são propriedade da Thermo Fisher Scientific Inc. e suas subsidiárias. Esta informação é apresentada como um exemplo dos recursos dos produtos Thermo Fisher Scientific Inc.. Não foi elaborada para encorajar o uso desses produtos de quaisquer maneiras que possam infringir os direitos de propriedade intelectual de terceiros. Especificações, prazos e preços estão sujeitos a alterações. Nem todos os produtos estão disponíveis em todos os países. Consulte o seu representante de vendas local para obter mais detalhes.

**Austrália** +61 3 9757 4486  
**Áustria** +43 1 333 50 34 0  
**Bélgica** +32 53 73 42 41  
**Brasil** +55 11 3731 5140  
**China** +852 2428 3282

**Dinamarca** +45 70 23 62 60  
**França** +33 1 60 92 48 00  
**Alemanha** +49 6126 991 0  
**Índia** +91 22 2764 2735  
**Itália** +39 02 51 62 1267

**Japão** +81 6 6885 1213  
**Coreia** +82 2 3420 8600  
**Países Baixos** +31 76 579 55 55  
**Singapura** +65 6289 1190  
**Suécia** +46 8 473 3380

**Suíça** +41 62 205 9966  
**Taiwan** +886 2 8751 6655  
**Reino Unido/Irlanda** +44 1442 233555  
**EUA e Canadá** +847 295 7500

**Thermo**  
 SCIENTIFIC

Part of Thermo Fisher Scientific