

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE ORIGEM ANIMAL E VEGETAL

Ailey Aparecida Coelho Tanamati* ; Augusto Tanamati; Jéssica Franzão Ganzaroli; Jorge Leonardo Sanchez; Marcos Vieira da Silva

UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Campo Mourão, PR.

Resumo. Nos últimos anos diversos pesquisadores realizaram estudos comparando métodos de extração de lipídios totais, com o objetivo de encontrar o método mais eficiente. O objetivo deste trabalho foi estudar quatro diferentes métodos de extração de lipídios totais, em farelo de soja (FS) e coxa de frango caipira (CF), por meio de solventes com diferentes graus de toxicidade e polaridade (n-hexano, n-hexano-isopropanol, clorofórmio, metanol e etanol). O estudo demonstrou que o método Soxhlet, utilizando o etanol como solvente, foi o mais eficiente na extração dos lipídios totais presentes no farelo de soja (5,38%), mas não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a coxa de frango caipira (3,35%), entre os métodos estudados. Para o farelo de soja o método a frio mais eficiente foi de Bligh & Dyer.

Palavras-chave: Lipídios totais. Etanol. Farelo de Soja. Coxa de Frango Caipira.

Comparative study of total lipids extraction methods in vegetable and animal samples. In recent years several researchers have conducted studies comparing total lipids extraction methods, to find the most efficient method. The objective of this work was to study four different total lipids extraction methods in soybean crumbs and chicken thigh hillbilly with solvents of different degrees of toxicity and polarity (n-hexane, n-hexane-isopropanol, chloroform, methanol and ethanol). The study showed that the Soxhlet method, using ethanol as solvent was more efficient in the total lipids extraction present in soybean crumbs (5.38%), but not significantly different ($p \leq 0.05$) for organic chicken thigh (3.35%), among the methods. The Bligh & Dyer cold method was the most efficient for the soybean crumbs.

Keywords: Total lipids. Ethanol. Soybean crumbs. Organic chicken thigh.

1 Introdução

Os estudos de novos métodos de extração de lipídios totais, em produtos de origem animal e vegetal, buscam substituir o emprego de solventes de origem fóssil por fatores ambientais, sociais e econômicos. Dentre as preocupações destacam-se: a diminuição da dependência tecnológica em relação aos derivados do petróleo; preservação da natureza; redução dos riscos de acidentes provocados ao homem devido a exposição aos solventes tóxicos; redução dos riscos de incêndio pela alta inflamabilidade dos solventes utilizados (FREITAS *et al.*, 2009).

Nos últimos anos diversos pesquisadores realizaram estudos comparando métodos de extração de lipídios totais (FISHWICK; WRIGHT, 1977; HARA; RADIN, 1978; SAHASRABUDHE; SMALLBONE, 1983;

KONING *et al.*, 1985; GUNNLAUGSDOTTIR; ACKMAN, 1993; UNDELAND *et al.*, 1998 e IVERSON *et al.*, 2001) com o objetivo de encontrar o método mais eficiente para a obtenção da fração lipídica desejada.

Dentre os métodos de extração de lipídios totais em alimentos encontrados na literatura, destaca-se o emprego do extrator Soxhlet utilizando o hexano, que usa refluxo do solvente por várias horas com aquecimento.

O emprego do hexano neste processo apresenta vantagens como: dissolve o óleo com facilidade; possui composição homogênea e estreita faixa de temperatura de ebulição; é imiscível em água; e tem baixo calor latente de ebulição. Contudo, apresenta como desvantagens: alta inflamabilidade; ser mais denso que o ar; origem fóssil e custo atrelado ao do petróleo (MANDARINO; ROESSING 2001).

O emprego do etanol, no processo de extração de lipídios totais, apresenta algumas vantagens em relação

* E-mail: aactanamati@utfpr.edu.br

ao emprego do hexano, como menor toxicidade, ser obtido de fontes renováveis, além da grande produtividade no Brasil.

Outro método de extração de lipídios que utiliza mistura binária de solventes é o de Bligh & Dyer (1959), com uma modificação do método desenvolvido por Folch *et al.* (1957) que emprega clorofórmio-metanol no processo.

Uma das vantagens do método desenvolvido por Bligh & Dyer (1959) é a formação de um sistema bifásico a partir das proporções de solventes adicionados durante o processo de extração. A formação desse sistema bifásico está baseada na teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes (clorofórmio/metanol/água). A toxicidade dos solventes empregados e a extração de contaminante não-lipídicos da fase orgânica são desvantagens dos métodos Bligh & Dyer e Folch *et al.* (BRUM *et al.*, 2009).

Métodos alternativos têm sido desenvolvidos através dos anos (RADIN, 1981; HARA; RADIN, 1978; BURTON *et al.*, 1985), a maioria dos quais são baseados em misturas de alcano-álcool-água, tais como: hexano-isopropanol-água. As misturas alcano-álcool-água têm sido propostas como um sistema de solventes menos tóxicos, de menor custo, maior transparência à radiação ultra violeta e menor extração de substâncias não lipídicas (HARA; RADIN, 1978; RADIN, 1981) quando comparada com clorofórmio-metanol-água.

O objetivo deste trabalho foi estudar quatro diferentes métodos de extração dos lipídios totais em coxa de frango caipira (CF) e farelo de soja (FS) por meio de solventes com diferentes graus de toxicidade e polaridade.

2 Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

As amostras de farelo de soja analisadas foram doadas por uma Cooperativa Agroindustrial localizada na região noroeste do Paraná, enquanto que as amostras de frango caipira foram doadas por produtores rurais da cidade de Tupi Paulista -SP.

As amostras de FS foram trituradas utilizando um Moinho de Facas tipo "Wiley" MA 048 com granulometria 30 mesh e armazenadas em embalagem de polietileno, permanecendo à temperatura ambiente, até a realização das extrações dos lipídios totais.

As amostras de CF foram trituradas num homogeneizador TE 645 e, em seguida, devidamente acondicionadas em embalagem de polietileno e armazenadas em freezer a -18°C, para posteriores análises. As extrações dos lipídios totais, do FS e CF, foram realizadas separadamente e em quatro repetições.

2.2 Determinação dos lipídios totais

2.2.1 Método de Soxhlet (AOCS, 1997)

Pesou-se aproximadamente 5g das amostras, em cartucho de papel de filtro, o qual foi colocado dentro do tubo de extração, devidamente pesado. Após, foram adicionados aproximadamente 100 mL de n-hexano e, em seguida foi devidamente acoplado ao Extrator de Óleos e Graxas MA 044/5/50. A temperatura do sistema foi ajustada até atingir a ebulição do n-hexano. O processo de extração foi realizado por um período de 6 horas e, então, o sistema foi desligado, e o solvente recuperado. O tubo de extração foi colocado em estufa a 105°C por 4 horas e esfriado, e o teor de lipídios foi determinado gravimetricamente.

O procedimento descrito acima foi repetido empregando como solvente o etanol em substituição ao n-hexano.

2.2.2 Método Bligh & Dyer (BLIGH; DYER, 1959)

Pesou-se, separadamente, 15 g das amostras num béquer as quais foram adicionados 30 mL de metanol, que permaneceu por agitação mecânica por 2 minutos. Em seguida, acrescentou-se 15 mL de clorofórmio, agitou-se por 5 minutos. Após, colocou-se mais 15 mL de clorofórmio e agitou-se por mais 2 minutos. Finalmente, adicionou-se 15 mL de água destilada e agitou-se por mais 5 minutos.

A amostra foi filtrada em um funil de Buchner, o resíduo foi lavado com mais 10 mL de clorofórmio e agitado por mais 5 minutos. O resíduo lavado foi filtrado, e lavou-se novamente o béquer com mais 10 mL de clorofórmio. Em seguida, foi recolhido o filtrado num funil de separação de 250 mL. Recolheu-se a fase inferior que contém o clorofórmio com os lipídios, num balão de fundo chato devidamente pesado, a fase superior que contém metanol, água e outros compostos polares foi descartada. Logo, o solvente foi evaporado em um evaporador rotatório a vácuo, com aquecimento de 35°C até secar completamente. O resíduo de solvente com lipídio foi terminado de evaporar em estufa a 105°C durante 4 horas. Após, esfriados os balões com lipídios foram pesados, e calculado os rendimentos.

2.2.3 Método de Hara & Radin (HARA; RADIN, 1978)

Foram pesados, separadamente, cerca de 10 g das amostras devidamente trituradas e homogeneizadas. Adicionou-se 90 mL de n-hexano-isopropanol (3:2 (v/v)) e a mistura foi agitada mecanicamente por 30 s. Filtrou-se a mistura em um funil de Buchner, re-suspendendo a amostra decantada no fundo do béquer.

Em seguida, foi adicionado mais 90 mL do solvente e agitou-se por mais 30 s e filtrou-se novamente. Logo após, o filtrado foi transferido para um funil de separação de 250 mL ao qual adicionou-se 60 mL de solução de sulfato de sódio (0,067 mg/mL). Procedeu-se a agitação rigorosa até a separação completa das fases. Descartou-se a fase inferior, e a superior foi recolhida em um balão de fundo chato, devidamente pesado. O solvente foi evaporado em um evaporador rotatório a vácuo, com aquecimento de 60°C até secar completamente. O resíduo de solvente com lipídios foi terminado de evaporar em estufa a 80°C durante 2 horas. Após, esfriados os balões com lipídeos foram pesados, e calculado os rendimentos.

2.3 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do programa computacional Microsoft® Office Excel 2007. O Teste de Tukey foi utilizado para a comparação de médias e verificar a existência de diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os lotes estudados e os métodos de extração utilizados.

3 Resultados e Discussões

O conteúdo dos lipídios totais, nas amostras de coxa de frango caipira, obtido por meio de diferentes métodos de extração e solventes encontra-se na Tabela 1. Os resultados obtidos pelas extrações a frio, não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os lotes e métodos de extração utilizados.

Os valores dos lipídios totais encontrados na coxa de frango caipira sem pele foi, em média, menor que menor que o descrito em Taco (2006), de 4,9%. De acordo com Moreira *et al.* (1998) composição da carne está diretamente relacionada a fatores como a raça e alimentação do animal. Outro fator que está relacionado ao rendimento do processo de extração é a metodologia empregada.

Tabela 1. Percentagem dos lipídios totais na coxa de frango caipira.

Lotes	Métodos			
	Bligh & Dyer	Hara & Radin	Soxhlet (n-hexano)	Soxhlet (etanol)
1	4,46 ± 0,620	3,96 ± 0,171	3,37 ± 0,301	3,35 ± 0,320
2	3,01 ± 0,004	2,28 ± 0,191	3,26 ± 0,340	3,66 ± 1,149
3	2,76 ± 0,305	3,10 ± 0,240	3,14 ± 0,379	3,05 ± 1,165
Média	3,41 ± 0,690	3,11 ± 0,351	3,26 ± 0,591	3,35 ± 1,667

Resultados expressos como média ± desvio padrão das determinações em triplicata.

Nos métodos de extração estudados, tanto a frio Bligh & Dyer e Hara & Radin quanto a quente Soxhlet, foram empregados solventes com diferentes graus de polaridade. De acordo com Undeland *et al.* (1998), o sistema clorofórmio-metanol-água, utilizados no método Bligh & Dyer, apresenta maior grau de polaridade, quando comparado a sistema alcão-álcool-água, como o apresentado no método proposto por Hara & Radin.

A existência de lipídios neutros e polares leva à discussão da eficiência do emprego de um único solvente na extração dos lipídios totais. A extração dos lipídios neutros ocorre com o emprego de solventes apolares, já para os lipídios polares, que estão ligados por forças eletrostáticas e ligação de hidrogênio, ocorre pelo emprego de solventes polares. Neste contexto o método de Bligh & Dyer leva a extração dos lipídios polares e neutros da matriz.

Há uma redução na polaridade da mistura dos solventes empregada no método proposto por Hara & Radin, quando comparada a de Bligh & Dyer. No entanto, não houve diferença significativa no percentual de lipídios totais na coxa de frango caipira obtidos por ambos os métodos.

O método de Bligh & Dyer, que utiliza metanol e clorofórmio, é muito estudado para obtenção dos lipídios totais de amostras de origem animal (Oliveira *et al.*, 2010). Entretanto, o emprego de solventes de alta toxicidade, como o metanol e clorofórmio é a principal desvantagem do método.

O uso de solventes de maior polaridade contribui para a extração dos lipídios polares presentes na carne (TANAMATI, 2005). É importante salientar que o solvente n-hexano é apolar e não têm a mesma eficiência para extrair os lipídios ligados (polares) como outros solventes de maior polaridade como o etanol. A diferença na polaridade dos solventes talvez seja o fator mais importante nos diferentes rendimentos de lipídios extraídos pelos métodos aplicados.

Quanto maior a polaridade dos solventes utilizados no processo de extração, maior deve ser o rendimento de compostos polares (BRUM, 2009).

A substituição do n-hexano pelo etanol no extrator Soxhlet não provocou diferença no teor dos lipídios totais na coxa de frango caipira. Estudo semelhante foi realizado por Drummond *et al.* (2009) entretanto, o uso do etanol foi mais eficiente do que o n-hexano no teor dos lipídios totais da mamona.

De acordo com Tomazin (2008) o uso do etanol na extração de óleo, em substituição ao n-hexano, apresenta vantagens como ser oriundo de fontes renováveis, biodegradável, baixa toxicidade e maior rendimento no processo.

O método de extração, utilizando o Soxhlet apresenta como vantagem, em relação aos demais métodos

estudados, o fato da amostra ficar imersa no solvente durante todo tempo da extração, proporcionando a solubilização dos lipídios totais. Outro fator que está diretamente relacionado com a eficiência do método é a realização da extração a quente (BRUM, *et al.*, 2009). Por outro lado, o aquecimento pode levar a oxidação lipídica (ALMEIDA *et al.*, 2006).

A Tabela 2 apresenta a percentagem dos lipídios totais no farelo de soja em função dos métodos estudados nos diferentes lotes. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos teores dos lipídios totais no farelo de soja entre os métodos estudados, onde a menor média foi 1,40% para o método Hara & Radin e o maior foi 5,38% na extração por Soxhlet com etanol.

Tabela 2. Percentagem dos lipídios totais no farelo de soja

Lotes	Métodos			
	Bligh & Dyer	Hara & Radin	Soxhlet (n-hexano)	Soxhlet (etanol)
1	1,83 ^b ± 0,317	1,61 ^c ± 0,082	2,68 ^b ± 0,309	5,01 ^a ± 0,969
2	2,18 ^b ± 0,532	1,19 ^c ± 0,100	2,74 ^b ± 0,908	6,36 ^a ± 0,794
3	2,23 ^b ± 0,424	1,40 ^c ± 0,091	2,862 ^b ± 0,608	4,77 ^a ± 0,881
Média	2,08 ^b ± 0,750	1,40 ^c ± 0,262	2,76 ^b ± 1,135	5,38 ^a ± 1,531

Resultados expressos como média ± desvio padrão das determinações em triplicata. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre as medias ao nível de 5% de significância.

O percentual de lipídios totais encontrado por Zambom *et al.* (2001) no farelo de soja foi 3,45%, utilizando a metodologia de Soxhlet com n-hexano, valor acima do encontrado neste estudo, média de 2,76%. Além do método de obtenção o conteúdo lipídico em produtos de origem vegetal depende de fatores climáticos e da variedade (MOURA, 2007).

Devido à polaridade do etanol, durante o processo de extração dos lipídios totais, pode arrastar outros compostos solúveis em solventes polares, como proteínas e minerais. Tanto a carne de frango e o farelo de soja, são ricos em proteína bruta e minerais, compostos solúveis em solventes polares (GERBER, 2006).

É recomendado um estudo de caracterização dos lipídios obtidos no processo de extração com etanol, pois Domingos (2010) encontrou compostos insolúveis em éter, nos lipídios extraídos do farelo de soja por meio o uso de Soxhlet com etanol. No entanto, características como baixa toxicidade, ser oriundo de fontes renováveis e biodegradável são fatores que favorecem o emprego do etanol como solvente na obtenção dos lipídios totais.

4 Conclusão

O estudo demonstrou que das quatro metodologias estudadas o Soxhlet, utilizando o etanol como solvente, foi o mais eficiente na extração dos lipídios totais presentes no farelo de soja, mas não apresentou diferença em relação aos demais métodos para a coxa de frango caipira. A substituição do n-hexano por etanol no processo de extração dos lipídios totais é indicada.

5 Referências

- ALMEIDA, D. T.; ARAÚJO, M. P. N.; FORTUNATO, D. M. N.; SOUZA, J. C.; MORAES, T. M. Revisão de literatura: aspectos gerais do processo de fritura de imersão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.188, p. 42-47, 2006.
- AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY (AOCS). **Official methods and recommended practices**. 5. ed. Champaign, 2v., 1997.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959

- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. de; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v.32, n.4, p.849-854, 2009.
- BURTON, G.W.; WEBB, A.; INGOLD, K.C. A mild rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. **Lipids**, v.20, n.1, p.29-39, 1985.
- DOMINGOS, G. de L. **Extração de lipídios totais em farelo de soja utilizando solventes de origem fóssil e etanol. Trabalho de Conclusão de Curso.** Curso de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2010.
- DRUMMOND, A. R. F.; GAZINEU, M. H. P.; ALMEIDA, L.; SOUTO MAIOR, A. **Metanol e Etanol como Solventes na Extração de Óleo de Mamona.** Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/Metanol.pdf>. Acesso em: Agosto de 2009.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANEY STANLEY, G.H. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p.497-509, 1957.
- HARA, A.C.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v.90, n.1, p. 420-426, 1978.
- GUNNLAUGSDOTTIR, H., AND R.G. ACKMAN, Three Extraction Methods for Determination of Lipids in Fish Meal: Evaluation of a Hexane/Isopropane Method as an Alternative to Chloroform- Based Methods, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.61, p.235-240, 1993.
- FREITAS, S. P.; MONTEIRO, P. L.; LAGO, R. C. A. **Extração do óleo da borra de café solúvel com etanol comercial.** Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/ppt-download/extrao-do-leo-da-borra-de-caf-solvel-com-etanol-comercial3452.pdf>. Acesso em: Julho de 2009.
- FISHWICK, M. J.; WRIGHT, A. J. Comparison of methods for the extraction of plant lipids. **Phytochemistry**, v.16, n.10, p.1507-1510, 1977.
- GERBER, L. F. P.; JÚNIOR, A. M. P.; RIBEIRO, A. M. L. Efeito da composição do farelo de soja sobre o desempenho e o metabolismo de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1359-1365, 2006.
- IVERSON, S.J.; LANG, S.L.C.; COOPER, M.H. Comparison of the Bligh & Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v.36, n.11, p.1283-1287, 2001.
- KONING, A.J. de.; EVANS, A.A.; CHRISTINE, H.; PURCELL, C.J.V.; WESSELS, J.P.H. A critical investigation of a number of different methods of lipid determination in fish meal, with particular emphasis on correction required in these determinations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.36, n.3, p.177-185, 1985.
- MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – EMBRAPA, 2001.
- MOREIRA, R. S. dos R. ZAPATA, J. F. F.; FUENTES, M. DE F. F. SAMPAIO, E. M.; MAIA, G. A. Efeito da restrição de vitaminas e minerais na alimentação de frangos de corte sobre o rendimento e a composição da carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p. 77-81, 1998.
- MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SOUZA, M. C.; DIAS, C. T. S.; Composição de cultivares de soja submetida a diferentes tratamentos térmicos. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.2, p. 151-160, 2007.
- OLIVEIRA, M. E. G. DE; LIMA, C. A. C. de; GERMANO, R. C.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, C. E. V. de; DUNDA, E. P.; CARNEIRO, D. G. B. **Teor de lipídios de carne de ovinos alimentados com resíduo de melão: comparação entre os métodos de Folch e Soxhlet.** Disponível em http://www.emparn.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/emparn/arquivos/publicacoes/Claudio/Resumo_TEOR_DE_LIPDIOS_DE_CARNE_DE_OVINOS_MORADA_NOVA_ALIMENTADAS_COM_RES_DUO_DE_MELAO.pdf. Acesso em: 02/07/2010.
- RADIN, N. S. Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. In: LOWENSTEIN, J. M. (Ed.). **Methods in enzymology**, New York: Academic Press. v.72, part D, p.5-7, 1981.
- SAHASRABUDHE, M.R.; SMALLBONE, B.W. Comparative evaluation of solvent extraction methods for the determination of neutral and polar lipids in beef. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.60, n.4, p.801-805, 1983.
- TANAMATI, A. **Estudo comparativo de nove métodos de extração de lipídios totais em bife (*longissimus dorsi*) usando métodos com solventes clorados e métodos com solventes de baixa toxicidade.** 2005. 64 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.
- UNDELAND, I.; HÄRRÖD, M.; LINGNERT, H. Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). **Food Chemistry**, v.61, n.3, p.355-365, 1998.
- ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T. dos; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C. da.; SILVA, K. T. da; JOSIANE OLIVEIRA FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.