

Artigo Técnico

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS EM CREME DE RICOTA

Comparison of different analytical methods for quantification of lipids in ricotta cream

Ana Paula GUSSO^{1*}

Paula MATTANNA²

Luiz Gustavo de PELLEGRINI³

Daniela Buzatti CASSANEGO⁴

Neila Silvia Pereira dos Santos RICHARDS⁵

Alice de Souza RIBEIRO⁶

SUMÁRIO

A complexidade de cada amostra não permite diagnosticar apenas um método de análise como sendo o melhor, portanto, devem-se considerar as vantagens e desvantagens que cada método oferece e relacioná-lo com a amostra em questão. Com o objetivo de identificar o melhor método de quantificação de lipídios para creme de ricota realizou-se um estudo comparativo entre três métodos físico-químicos de análise de lipídios. As metodologias utilizadas foram a de Soxhlet (extração a quente, usando éter de petróleo como solvente), Bligh; Dyer (extração a frio, com clorofórmio, metanol e água) e Butirômetro de Gerber (hidrólise ácida, através do uso de ácido sulfúrico e álcool isoamílico). Avaliou-se no presente trabalho o método, dentre os mencionados, que proporcionasse maior eficiência e reprodutibilidade. O método do Butirômetro de Gerber apresentou o menor rendimento dentre os métodos analisados, apesar de não diferir estatisticamente da metodologia de Soxhlet, a não reprodutibilidade da técnica do butirômetro deprecia este tipo de método. O método de Soxhlet apresentou melhor reprodutibilidade dos resultados, assim como valores mais próximos daqueles pré-determinados para esta amostra. Em relação ao método de extração de Bligh; Dyer obteve-se o maior rendimento do teor lipídico da amostra, portanto, os métodos de extração a quente (Soxhlet) e a frio (Bligh; Dyer) são os que melhor expressam o conteúdo lipídico do creme de ricota analisado.

Palavras-chave: Extração; Soxhlet; Bligh; Dyer; butirômetro de Gerber.

- 1 Tecnóloga de Alimentos. Mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: anapugusso@gmail.com.
 - 2 Farmacêutica. Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: mattannapaula@hotmail.com.
 - 3 Médico Veterinário. Doutorando no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: lgpellegrini@ibest.com.br.
 - 4 Engenheira Agrônoma. Mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: danybuzatti@yahoo.com.br.
 - 5 Professora Doutora do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: neilarichards@uol.com.br.
 - 6 Cientista de Alimentos – Laticínios. Instituto Federal Farroupilha – Departamento de pesquisa, extensão e produção – Campus Santo Augusto, Farroupilha, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: alice@sa.ifarroupilha.edu.br.
- * Autor para correspondência: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Avenida Roraima, nº 1000 – CEP: 97105-900 - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: anapugusso@gmail.com.

Recebido / Received: 17/06/2012

Aprovado / Approved: 26/09/2012

ABSTRACT

The complexity of each sample makes impossible to describe only one method of analysis as the best, therefore, we should consider the advantages and disadvantages of each method and relate it with the sample. The aim of this study was identify the best method for lipids quantification in ricotta cream with a comparative study of three physico-chemical methods of analysis for lipids. The methods used were Soxhlet (hot extraction, using ether as solvent), Bligh; Dyer (cold extraction with chloroform, methanol and water) and Gerber (acid hydrolysis, using sulfuric acid and isoamyl alcohol). We evaluated the method in this study, among those mentioned, which would provide greater efficiency and reproducibility. The method of Gerber had the lowest performance among the methods tested, although not statistically differ from the Soxhlet method, the reproducibility of Gerber detract this type of method. The Soxhlet method showed better reproducibility of results, and values closer to those pre-determined for this sample. Bligh; Dyer method showed the highest yield of the lipid content of the sample, so the hot extraction methods (Soxhlet) and cold (Bligh; Dyer) are those that best show the lipid content of ricotta cream analyzed.

Keywords: Extraction; soxhlet; Bligh; Dyer; butirômetro de Gerber.

1 INTRODUÇÃO

O grupo dos lipídios pode apresentar diferentes composições químicas em sua estrutura. Eles geralmente são classificados em dois grupos: os lipídios neutros ou não polares (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, esteróis, etc) e os lipídios mais polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios, esfingolipídios, etc) (MANIRAKIZA et al., 2001). O leite bovino contém os mais complexos lipídios conhecidos. Os triacilgliceróis (triglicerídeos) representam, sem dúvida, a maior proporção dos lipídios, compreendendo de 96 a 98% de seu total. No leite, os triacilgliceróis estão presentes como glóbulos de gordura. Essa gordura pode ser utilizada na sua forma concentrada, nata e/ou creme de leite, obtida pela separação em centrifuga (FENNEMA et al., 2010).

A escolha do melhor método de análise é um passo muito importante, pois devido à complexidade da sua constituição orgânica, os alimentos muitas vezes são considerados matrizes difíceis de serem manipuladas, onde os vários componentes dessa matriz podem estar interferindo entre si (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O conteúdo lipídico é tradicionalmente determinado por métodos gravimétricos através da extração com solventes. Existem vários métodos para extração de lipídios, dentre eles, Soxhlet, hidrólise ácida e Bligh; Dyer são os métodos de extração dominantes para a avaliação do teor de lipídios em alimentos e ingredientes alimentícios (HYVÖNEN, 1996; XIAO et al., 2012).

Os tratamentos químicos e físicos utilizados para extração de lipídios devem removê-los de seus locais de ligação como membranas celulares, lipo-proteínas e glicolipídeos. Além disso, os solventes utilizados para extração da gordura devem ter uma elevada solubilidade para todos os compostos lipídicos e ser suficientemente polar (SMEDES; ASKLAND,

1999). De acordo com Gurr (1992), os lipídios hidrofóbicos, como o triacilgliceróis e colesterol, estão geralmente presentes como grandes glóbulos e são facilmente extraídos pela maioria dos solventes, incluindo hidrocarbonetos, como o éter de petróleo e *n*-hexano. Lipídios anfílicos, como os fosfolipídios e glicolipídios, estão fortemente associados com proteínas e água, contribuindo para a formação da estrutura dos alimentos.

Dentre as metodologias de extração a quente, destaca-se a feita em equipamento tipo soxhlet. Este método é referência oficial do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA, 1981) e da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). O primeiro aparelho foi desenvolvido por Franz Von Soxhlet em 1879, e ressaltou a importância do grau de trituração da amostra quanto à duração e eficácia do processo. Consiste no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa em um solvente puro (éter de petróleo, éter dietílico ou *n*-hexano), devido à sifonagem e subsequente condensação do solvente aquecido dentro do balão que está na base do aparelho (BRUM, 2004).

Os principais inconvenientes que o método de Soxhlet apresenta são o longo tempo requerido para a extração e o grande volume de solvente utilizado, o qual não é somente de alto custo, mas também pode ser nocivo à saúde e ao meio ambiente (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

Em relação à extração a frio, um método frequentemente utilizado pelos pesquisadores e internacionalmente conhecido é o Bligh; Dyer de 1959. Esta técnica apresenta vantagens tais como a extração de todas as classes de lipídios sem aquecimento e equipamentos sofisticados, o extrato obtido pode ser utilizado em análises posteriores como determinação de índice de peróxidos, dienos conjugados, ácidos graxos

livres dentre outras. Contudo este método caracteriza-se por utilizar solventes de alto grau de toxicidade tais como clorofórmio e metanol (UNDELAND et al., 1998).

Outros tipos de determinação de lipídios em alimentos podem ser realizados através de hidrólises ácidas ou alcalinas. Um exemplo deste tipo de análise é a metodologia do Butirômetro de Gerber (BRASIL, 2006), utilizada para determinação de lipídios em leite e seus derivados. O método de Gerber está baseado na propriedade que tem o ácido sulfúrico de digerir as proteínas do leite, sem atacar a matéria gorda. A separação da gordura ocorre por centrifugação (diferença de densidade) e o volume de gordura é obtido diretamente, pois o componente mais leve (a gordura) se acumula na parte superior do butirômetro, isto é, na haste graduada do mesmo (BRASIL, 2006).

O conteúdo total e a composição de lipídios em alimentos podem variar muito. Como os lipídios desempenham papel importante na qualidade de alimentos, pois contribuem com atributos de textura, sabor, nutrição e densidade calórica, sua manipulação tem sido uma ênfase especial na pesquisa e no desenvolvimento de alimentos, nas últimas décadas (FENNEMA et al., 2010).

O creme de ricota é um derivado lácteo que surge no mercado como uma opção saudável e ao mesmo tempo saborosa para os consumidores apreciadores de derivados lácteos. Este produto é composto basicamente de queijo ricota e creme de leite. Apresentando assim alto teor de proteínas do soro e aminoácidos essenciais, considerável valor energético, fonte de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K).

Contudo, quando se pretende quantificar o conteúdo lipídico de derivados lácteos é necessário averiguar a melhor técnica de análise, para que se possam obter resultados confiáveis. Neste contexto realizou-se um estudo comparativo entre alguns métodos analíticos de extração e quantificação de lipídios totais em creme de ricota. As metodologias empregadas foram a de extração a quente por equipamento tipo Soxhlet, a frio pelo método de Bligh; Dyer e extração por hidrólise ácida através do butirômetro de Gerber, objetivando selecionar a técnica que melhor expressasse o conteúdo lipídico total do produto creme de ricota, apresentando maior eficiência e reprodutibilidade dos resultados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram desenvolvidas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria – RS. Elaborou-se uma formulação padrão de creme de ricota a fim de que o conteúdo lipídico fosse pré-determinado, através de cálculo teórico. Os ingredientes e as quantidades utilizadas para a elaboração do creme de ricota estão descritas na tabela 1.

Todos os ingredientes com exceção do espessante foram homogeneizados em liquidificador semi-industrial por 3 minutos. Após a mistura o creme obtido foi transferido para um béquer imerso em banho-maria para ser pasteurizado. Neste instante o espessante foi adicionado e o produto ficou sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 85°C por 2 minutos. Em seguida foi resfriado em banho com água fria e gelo.

Após 24 horas da fabricação dos produtos, estes foram avaliados quanto ao teor de gordura por três metodologias distintas, Soxhlet (AOAC, 1995), Bligh; Dyer (1959) e butirômetro de Gerber (BRASIL, 2006). O solvente utilizado para a extração a quente foi o éter de petróleo PA, para a extração a frio utilizou-se clorofórmio PA com 0,02% de BHT (Butil-hidroxi-tolueno), metanol PA, sulfato de sódio anidro a 1,5% e para o método do butirômetro utilizou-se ácido sulfúrico de densidade 1,605 e álcool isoamílico de densidade 0,81 a 20°C. Foram realizadas quatro repetições do processo e das análises, todas em triplicata, a fim de eliminar o erro aparente. Para análise estatística utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$) através do software estatístico SPSS, versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da informação nutricional dos rótulos dos ingredientes e as quantidades adicionadas ao produto, realizou-se o cálculo teórico da quantidade de lipídios presente no creme de ricota elaborado. Com o teor de gordura da ricota utilizada de 1,73% e do creme de leite de 44%, o valor calculado foi de $\pm 15,08\%$.

Tabela 1 – Ingredientes utilizados para a elaboração do creme de ricota.

Ingredientes	Ricota (Santa Clara®)	Creme de Leite (UNI®)	Cloreto de sódio (Salazir®)	Sorbato de Potássio (Dyne®)	Espessante (goma guar, Hexus®)	Água destilada
Quantidade adicionada	400g	300g	13g	2g	3g	282 mL

As médias dos teores de lipídios encontrados em cada análise são demonstradas na tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Lipídios totais quantificados por três diferentes metodologias em creme de ricota.

Metodologia	Lipídios Totais (g/100g)
Soxhlet / 8 h	15,81 ^{ab} ± 0,12*
Bligh & Dyer	16,94 ^a ± 0,13*
Butirômetro de Gerber	13,40 ^b ± 0,39*

^{ab} letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

* Desvio padrão da média

O método que apresentou maior reprodutibilidade dos resultados foi o de Soxhlet seguido por Bligh; Dyer, sendo a metodologia do butirômetro de Gerber a que ofereceu maior variabilidade em todas as repetições. Embora as metodologias de extração a quente e por hidrólise ácida não terem apresentado diferença estatística entre si, a primeira ofereceu valores mais próximos do conteúdo pré-determinado através do cálculo teórico, sendo estes valores reproduzidos em todas as repetições com eficiência. De acordo com o trabalho de Manirakiza et al. (2001), a metodologia de Soxhlet é conveniente para extração de lipídios a partir de amostras sólidas, já que o processo líquido-líquido pode acarretar em algumas dificuldades inerentes a extração. Por isso, a extração da fração lipídica do creme de ricota analisado, foi realizada a partir da amostra na base seca.

O método do butirômetro de Gerber neste estudo foi considerado de menor rendimento e reprodutibilidade. Fatores como excessiva manipulação e preparo da amostra assim como do reagente, ácido sulfúrico, utilizados nesta análise podem ter sido a causa do baixo rendimento assim como sua repetibilidade nos resultados.

O presente trabalho demonstra ainda que, o método de Bligh; Dyer apresentou bom desempenho em todas as repetições, representando eficiência e reprodutibilidade, indo ao encontro com os resultados de Ramalhosa et al. (2012), no estudo realizado sobre o teor de lipídios em peixes congelados. Contudo, neste mesmo estudo a metodologia de Soxhlet foi considerada pobre em termos de eficácia, bem como repetibilidade. No estudo realizado por Pérez-Palacios et al. (2008), o método descrito por Bligh; Dyer aplicado em carnes e produtos cárneos subestima o conteúdo total de lipídios, sendo necessário por vezes uma correção e ajuste do solvente para cada amostra. O que não ocorreu nesta pesquisa, já que este método foi o que apresentou maior teor de lipídios na extração.

Muitos autores já se dedicaram e ainda se dedicam ao estudo de comparação de métodos de extração de lipídios, no entanto, a diversidade e as características

de cada amostra não permitem diagnosticar e/ou rotular apenas um método de análise como sendo o melhor. Sendo assim, devem-se considerar as vantagens e desvantagens que cada método oferece e relacioná-lo com a amostra em questão, da mesma forma, observar a compatibilidade dos solventes utilizados com o teor lipídico da amostra.

4 CONCLUSÃO

Apesar do método de Butirômetro de Gerber ter apresentado o menor rendimento dentre os métodos analisados, vale ressaltar, que este não diferiu estatisticamente da metodologia de Soxhlet. Porém a não reprodutibilidade da técnica do butirômetro deprecia este tipo de método. Soxhlet apresentou melhor reprodutibilidade dos resultados, assim como valores mais próximos daqueles pré-determinados para esta amostra. Em relação ao método de extração de Bligh; Dyer obteve-se aqui o maior rendimento do teor lipídico da amostra. A confiabilidade dos resultados em qualquer método escolhido para a extração de lipídios em alimentos deve-se muito a qualidade dos solventes utilizados assim como a eficiência da manipulação na amostra e nos reagentes durante a técnica. Portanto, para o creme de ricota, conclui-se que os métodos de extração a quente (Soxhlet) e a frio (Bligh; Dyer) são os que melhor expressam o conteúdo lipídico deste alimento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington, D.C.: 1995. 1094p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, Ottawa, v. 27, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. 2004. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future.

Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 369, n. 1-2, p. 1-10, 1998.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

GURR, M. I. Extraction and measurement of total fat in foods In: GURR, M. I. **Role of fats in food and nutrition**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1992. cap. 4, p. 55-73.

HYVÖNEN, L. Approach to fat analysis of foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 23-26, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4 ed., 1 ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL (LANARA). **Métodos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – métodos físicos e químicos**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.

PÉREZ-PALACIOS, T. et al. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. **Food Chemistry**, Oxford, v. 110, n. 4, p. 1025-1029, 2008.

RAMALHOSA, M. J. et al. Lipid content of frozen fish: Comparison of different extraction methods and variability during freezing storage. **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, n. 1, p. 328-336, 2012.

SMEDES, F.; ASKLAND, T. K. Resisting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 193-201, 1999.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, Erlangen, v. 232, n. 5, p. 461-465, 1879.

UNDELAND, I.; HÄRRÖD, M.; LINGNERT, H. Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea havengus*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 355-365, 1998.

XIAO, L.; MJOS, S. A.; HAUGSGJERD, B. O. Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. **Journal of Food Composition and Analysis**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 198-207, 2012.



A dose certa
de tecnologia
para sua indústria.



M-22 PLUS
Envasadora, seladora,
datadora e colocadora
de sobre-tampas
automática com
sistema de assepsia
da embalagem para
copos e potes.
2800 unidades/hora



M22
Envasadora, seladora, datadora
e colocadora de sobre tampas
automática para copos e potes.
2200 unidades/hora



DSM2
Envasadora e seladora
semi-automática para
copos e potes.



S
• Seladora manual de
mesa para copos e potes.