

Determinação de Extrato Etéreo em Amostras Vegetais com uso de Solvente sob Alta Pressão: Avaliação do Equipamento Semiautomático ANKOM XT15

Diego Barcelos Galvani¹

Thays Paulina Martins²

Introdução

A concentração de lipídios na dieta de ruminantes, geralmente é bastante baixa, variando entre 1% e 4% da matéria seca (VAN SOEST, 1994). Essa fração, todavia, é importante do ponto de vista nutricional devido à sua elevada concentração energética, em média 2,25 maior que a dos carboidratos (SILVA; QUEIROZ, 2002). Os triglicerídeos (presentes sobretudo nos grãos), os galactolipídios e fosfolipídios (predominantes nas folhas) são os principais lipídios encontrados na dieta dos animais ruminantes, mas, a depender da fonte, pode haver, ainda, quantidades variáveis de ceras, carotenoides e óleos essenciais. Tais compostos têm sido quantificados em conjunto, por meio de métodos gravimétricos que utilizam solventes orgânicos (éter de petróleo, éter etílico, hexano etc.) para extração e que, por suas características, adicionam à fração lipídica outros compostos apolares solúveis, como pigmentos, esteróis e vitaminas lipossolúveis. Por essa razão, o resíduo do processo de extração é, comumente, denominado extrato etéreo ou gordura bruta.

Desenvolvido na Alemanha no final do século XIX, o método de Soxhlet (1879) é, ainda hoje, amplamente utilizado para determinação de extrato etéreo em amostras vegetais. Nesse método, a amostra é lavada durante 4 a 12 horas, a depender de sua natureza e processamento, e o resíduo extraído é recolhido para quantificação. Embora eficaz, o método de Soxhlet apresenta como principal desvantagem o baixo rendimento analítico, em função do tempo necessário para finalização do procedimento. Além disso, grande parte do solvente utilizado é perdida por volatilização e liberada no ambiente. Essas características têm, dessa forma, estimulado o desenvolvimento de métodos mais eficientes para extração de gorduras.

Em contraste ao método de Soxhlet, o método AOCS Am 5-04 (FIRESTONE, 2009), apresenta como principal vantagem seu elevado rendimento analítico, permitindo a análise simultânea de até sete amostras, em duplicata, por hora. Isso se deve ao fato de o método fazer uso de um equipamento semiautomático (ANKOM XT10 ou ANKOM XT15,

¹ Zootecn., D. Sc., Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral- Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, CEP- 62010-970, Sobral/CE.

² Bolsista da Iniciação Científica do PIBIC/CNPq na Embrapa Caprinos e Ovinos.

ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EUA) que é operado em condições de pressão elevadas (20 a 50 psi, dependendo do tipo solvente), o que possibilita um incremento da solubilidade da fração lipídica da amostra no solvente (TOSCHI et al., 2003). Ao final do processo de extração, o solvente é recuperado em sua quase totalidade (95 a 100%) sem contato algum com o operador, sendo, portanto, menos insalubre. Por outro lado, por exigir o acondicionamento das amostras em sacos de filtro específicos (ANKOM XT4) e que possuem custo elevado, o método é mais oneroso quando comparado ao método convencional de Soxhlet. Além disso, ensaios realizados no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Caprinos e Ovinos, nas condições de extração estabelecidas pelo método AOCS Am 5-04 (90 °C durante 60 minutos), demonstraram que os resultados obtidos algumas vezes não são compatíveis com aqueles obtidos por meio do método de Soxhlet, o que evidencia a necessidade de ajustes nas condições de extração.

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a acurácia do método AOCS Am 5-04 para determinação de extrato etéreo em amostras vegetais (teor máximo de extrato etéreo de 5%). Adicionalmente, a substituição dos sacos de filtro ANKOM XT4 por sacos confeccionados em poliéster foi avaliada, com vistas à redução do custo analítico.

Ensaio 1 – Acurácia do método AOCS Am 5-04 para determinação de extrato etéreo em amostras vegetais, em comparação ao método de Soxhlet

Seleção e preparo das amostras

Selecionaram-se quatorze amostras com teor de gordura variando entre 1% e 5%, sendo: sete amostras de alimentos volumosos [*Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *C. dactylon* cv. Coastcross, *Brachiaria decumbens* Stapf., *Zea mays* (L.) silagem, *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia e *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. cv. Marandu (2 amostras)]; e sete amostras de alimentos concentrados [farelo de algodão, farelo de trigo, farelo de arroz, milho grão (2 amostras) e farelo de soja (2 amostras)]. As amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 60 °C por 72 horas e trituradas

em moinho de facas (MA-340, Marconi Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) provido de peneira com poros de 1 mm de diâmetro.

Protocolo de extração pelo método AOCS Am 5-04

Utilizou-se o equipamento semiautomático ANKOM XT15 (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EUA). Um grama de amostra foi pesado e acondicionado em saco de filtro modelo ANKOM XT4, cuja porosidade é de 3 µm. Os sacos de filtro foram numerados, lacrados e pesados. Por diferença entre o peso do saco de filtro cheio e o peso da amostra (PAm, g), calculou-se o peso do saco de filtro vazio (PXT4, g). Os sacos de filtro cheios foram, então, levados à estufa a 105 °C por 3 horas e novamente pesados (PCS, g). Esse procedimento permite o cálculo do teor de matéria seca da amostra.

Até sete amostras, em duplicata, foram inseridas simultaneamente na cápsula de extração do equipamento. Utilizou-se hexano como solvente. A temperatura e o tempo de extração foram ajustados para 90 °C e 60 minutos, respectivamente. Ao final do processo de extração, os sacos de filtro foram levados novamente à estufa a 105 °C por 30 minutos e pesados (PFE, g). O teor de extrato etéreo da amostra foi calculado como:

$$\text{Extrato etéreo (\% da MS)} = \frac{(PCS - PXT4) - (PFE - PXT4)}{PCS - PXT4} \times 100$$

Protocolo de extração pelo método de Soxhlet

Foram adotados os procedimentos descritos por Silva e Queiroz (2002), com pequenas alterações. Brevemente, duas gramas de amostra foram acondicionados em cartucho de celulose e submetidos à extração utilizando hexano, durante 4 horas. A gordura extraída foi recuperada em balão de fundo chato e quantificada após 24 horas de secagem em estufa a 105 °C.

Análise e interpretação dos dados

Para comparação dos valores de referência (Y, variável dependente) com aqueles obtidos por meio do método AOCS Am 5-04 (X, variável independente), os dados foram submetidos à análise de regressão, utilizando o procedimento REG do SAS

(Statistical Analysis System, SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Para identificação de diferenças entre os métodos de extração avaliados, os valores do intercepto e coeficiente de regressão, foram testados quanto à igualdade a zero e um, respectivamente. Uma análise preliminar foi realizada de forma separada para cada conjunto de amostras de alimentos volumosos e concentrados. Quando identificada a subestimativa do teor de extrato etéreo pelo método AOCS Am 5-04, procede-se o ajuste no procedimento, mediante elevação do tempo de extração.

Resultados

A concentração média de extrato etéreo obtida nas amostras de alimentos volumosos por meio do método AOCS Am 5-04 foi de 2%, bastante próxima daquela obtida com o método de referência, que foi de 2,03%. Para as amostras de concentrados, entretanto, o valor médio obtido foi 34% menor que o valor de referência (2,74% vs. 4,15%). Em parte, é possível que tais resultados estejam associados à constituição lipídica das amostras analisadas. Enquanto nas amostras de alimentos volumosos, a maior parte dos lipídios são representados por fosfolipídios e glicolipídios depositados nas folhas dos vegetais, nas amostras de alimentos concentrados os triglicerídeos são os principais lipídios encontrados. Além disso, os alimentos volumosos apresentam grande quantidade de pigmentos, que são extraídos pelos solventes e computados como extrato etéreo.

Outro aspecto relevante refere-se à granulometria das amostras. Embora o método AOCS Am 5-04 não especifique a forma de processamento das amostras, a amostra padrão que acompanha o equipamento ANKOM XT15 apresenta granulometria bastante reduzida, o que seria obtido em amostras vegetais somente com uso de moinho de bolas. Tal forma de processamento, no entanto, não é rotineiramente utilizada nos laboratórios de análise de alimentos que, de forma geral, processam as amostras para análise em moinhos de facas providos de peneiras com poros de 1 mm. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem, portanto, que a utilização do método AOCS Am 5-04 não gera resultados compatíveis àqueles obtidos mediante uso do método de Soxhlet, quando as amostras de alimentos concentrados são analisadas com tamanho médio de partículas de 1 mm.

Com base nesses dados, um ensaio paralelo foi conduzido para estabelecer-se o tempo de extração ideal para amostras de alimentos concentrados (60, 90 ou 120 minutos). O incremento do tempo de extração resultou em aumento linear da concentração de extrato etéreo [EE, % = 0,03885 (\pm 0,00283) \times tempo; $r^2 = 0,94$; desvio padrão = 0,91; $P < 0,001$] das amostras de alimentos concentrados. Valores médios semelhantes àqueles obtidos com o método de Soxhlet foram obtidos com tempo de extração de 120 minutos (4,13%).

Assim, os valores obtidos após 60 minutos de extração para as amostras de volumosos e 120 minutos de extração para os concentrados, usando o método AOCS Am 5-04 (X, variável independente) foram regredidos sobre os valores de referência obtidos com método de extração de Soxhlet (Y, variável dependente). A equação obtida foi: $Y, \% = -0,043 (\pm 0,149) + [1,022 (\pm 0,046) \times X, \%]$; $n = 14$; $r^2 = 0,98$; desvio padrão = 0,198; $P < 0,001$. O intercepto e o coeficiente de regressão da equação não diferiram de zero e um ($P > 0,05$), respectivamente, demonstrando que os resultados obtidos pelos dois métodos avaliados são compatíveis (Figura 1).

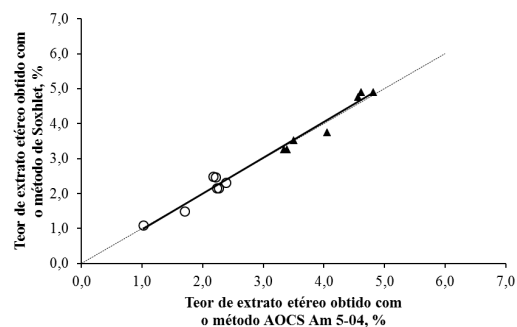


Figura 1 – Comparação entre os teores de extrato etéreo obtidos por meio do método de Soxhlet e do método AOCS Am 5-04, em amostras de alimentos volumosos (○) e concentrados (▲). A equação de regressão geral obtida foi: $Y, \% = -0,043 (\pm 0,149) + [1,022 (\pm 0,046) \times X, \%]$; $r^2 = 0,98$; desvio padrão = 0,198; $P < 0,001$.

Ensaio 2 – Substituição do saco de filtro ANKOM XT4 por saco de poliéster com porosidade de 25 micrometros

Seleção e preparo das amostras

Selecionaram-se seis amostras com teor de gordura variando entre 1 e 5%, sendo três amostras de alimentos volumosos [*Cynodon dactylon* cv. Tifton

85, *Brachiaria decumbens* Stapf., e *Zea mays* (L.) silagem] e três amostras de alimentos concentrados [farelo de algodão, milho grão e farelo de soja]. As amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 60 °C por 72 horas e trituradas em moinhos de facas (MA-340, Marconi Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) provido de peneira com poros de 1 mm de diâmetro. Adicionalmente, uma amostra padrão, com teor de extrato etéreo de 10,6%, que acompanha o equipamento ANKOM XT15, foi incluída no ensaio.

Protocolo de extração pelo método AOCS Am 5-04

Utilizou-se o equipamento semiautomático ANKOM XT15 (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EUA). De cada amostra, 1,0 g de material foi pesado e acondicionado, em duplicata, em saco de filtro modelo ANKOM XT4, cuja porosidade é de 3 µm, e em saco de poliéster, com medidas de 35 × 50 mm e 25 µm de porosidade. Os sacos foram numerados, lacrados e pesados. Foi utilizado hexano como solvente, adotando-se 60 minutos de extração para as amostras de volumosos e para a amostra padrão, e 120 minutos de extração para as amostras de concentrado. Os procedimentos de cálculo do teor de extrato etéreo foram os mesmos descritos anteriormente para o Ensaio 1.

Análise e interpretação dos dados

Os dados foram analisados em delineamento de parcelas subdivididas utilizando o procedimento GLM do SAS (Statistical Analysis System, SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). O modelo da análise de variância incluiu os efeitos da amostra, do tipo de saco, da repetição dentro da amostra (erro a), da interação entre amostra e tipo de saco e o erro aleatório residual. Diferenças entre os tipos de saco foram avaliadas mediante uso do teste F, e declaradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

A concentração média de extrato etéreo nas amostras avaliadas foi 43% superior ($P = 0,001$) quando utilizado saco de poliéster, em substituição ao saco de filtro ANKOM XT4 (Tabela 1). Tal fato é justificado pelo visível escape de partículas através dos poros dos sacos de poliéster, com depósito das mesmas no fundo da cápsula de extração. A interação significativa ($P = 0,01$) encontrada entre amostra e tipo de saco demonstrou que a magnitude de tal

escape é dependente de características específicas de cada amostra, possivelmente devido a diferenças na densidade das partículas. Dessa forma, ajustes no protocolo, como a redução do tempo de extração, para permitir o uso dos sacos de poliéster, não são viáveis.

Tabela 1. Concentrações (% da matéria seca) média, mínima e máxima de extrato etéreo em amostras vegetais, obtidas por meio do método AOCS Am 5-04 utilizando dois tipos de bolsas para condicionamento das amostras.

	Tipo de saco		EPM	Valor P
	ANKOM XT4	Poliéster 25 µm		
Média	3,84	5,49	0,11	0,001
Mínima	1,55	2,54	-	-
Máxima	11,00	15,79	-	-

EPM = erro padrão residual da média.

Recomendações

A concentração de extrato etéreo pode ser determinada pelo método AOCS Am5-04, com uso do equipamento ANKOM XT15 e saco de filtro ANKOM XT4, adotando-se 60 e 120 minutos de extração para amostras de alimentos volumosos e concentrados, respectivamente, as quais são processadas em moinho de facas provido de peneira com poros de 1 mm de diâmetro.

A elevada eficiência analítica do método AOCS Am 5-04, em comparação aos métodos convencionais utilizados para extração de compostos lipídicos em amostras vegetais é, todavia, contrabalanceada pelo seu maior custo operacional. O custo:benefício da adoção do método, dessa forma, é amplamente dependente da quantidade de amostras a serem analisadas e da urgência na obtenção dos resultados analíticos. Nesse sentido, ressalta-se que o uso do método permite o cálculo do teor de matéria seca das amostras, descartando a necessidade de realização de um procedimento adicional para obter estes resultados.

Referências

FIRESTONE, D. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 6th. ed. 3rd print. Urbana, Ill. : AOCS, c2009.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235 p.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Dingler's Polytechnisches Journal**, v. 232, n. 461-465, 1879.

TOSCHI, T. G.; BENDINI, A.; RICCI, A.; LERCKER, G. Pressurized solvent extraction of total lipids in poultry meat. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 551-555, 2003.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell, 1994. 476 p.

Marcha Analítica Recomendada

Procedimento de preparação das amostras (teor de extrato etéreo = 5%)

1. Numerar os sacos de ANKOM XT4 usando caneta com tinta resistente a solventes
2. Pesar 1 – 1,5 g de amostra em balança de precisão usando papel vegetal. Registrar o peso da amostra (*PAm*, g).
3. Inserir a amostra em saco de filtro ANKOM XT4, mantendo todas as partículas longe da área de selagem.
4. Selar o saco de filtro a 4 mm de sua extremidade aberta, usando seladora apropriada para este fim. Manter o braço da seladora pressionado por 2-3 segundos após a luz vermelha apagar-se. A vedação pode ser observada como uma faixa sólida derretida.
5. Pesar o saco de filtro cheio em balança de precisão e registrar o seu peso. A diferença entre o peso do saco de filtro cheio e o peso da amostra (*PAm*, g) representa o peso do saco de filtro vazio (*PXT4*, g).

6. Colocar as amostras seladas em estufa se secagem a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas para remover a umidade.

7. Remover as amostras da estufa e mantê-las em dessecador com sílica gel por cerca de 10 minutos.

8. Repesar cada saco de filtro imediatamente após a remoção do dessecador e registrar o peso (*PSS*, g).

Procedimento de extração usando o equipamento ANKOM XT15

1. Preencher o reservatório do equipamento com o solvente desejado até atingir o nível máximo indicado. Não utilizar éter etílico, ao menos que o equipamento tenha sido previamente preparado para uso desse solvente.
2. Ligar o equipamento e abrir o registro de água. No visor será mostrada a mensagem "Remove/Insert Samples (Enter)".
3. Pressionar a válvula de segurança para baixo para liberar o pino de segurança e girar a manivela de liberação da cápsula de extração para baixo, até que esta seja bloqueada.
4. Deslize a cápsula de extração para fora do equipamento, o suficiente para remover o receptáculo branco de teflon do seu interior.
5. Posicionar as amostras (até 14 sacos de filtro) no suporte (mola) e inseri-las no receptáculo de teflon.
6. Reposicionar o receptáculo de teflon na cápsula de extração, observando a posição dos pinos de fixação.
7. Deslizar a cápsula de extração para dentro do equipamento, certificando-se de que os anéis de vedação estejam posicionados corretamente.
8. Girar a manivela de liberação da cápsula de extração para cima, até que esta seja travada. Um ruído indicará que o pino de segurança foi acionado.

9. Pressionar "Enter" no teclado.
10. No visor será mostrada a mensagem "Select time 60 [AV] ... [Enter]". Usando as setas do teclado, selecionar o tempo de extração (60 minutos para amostras de alimentos volumosos e 120 minutos para concentrados).
11. Pressionar "Enter" no teclado.
12. No visor será mostrada a mensagem "Heat temp 90 [AV]... [Enter]". Usando as setas do teclado, selecionar a temperatura de extração o tempo de extração. A temperatura máxima de extração é 90 °C.
13. Pressionar "Enter" no teclado.
14. No visor será mostrada a mensagem "Close Vessel Water On [Enter]". Certificar-se que o suprimento de água está ligado.
15. Pressionar "Start" no teclado. O equipamento iniciará o procedimento de extração, mostrando seu status no visor.
16. Ao concluir o procedimento, no visor será mostrada a mensagem "Remove/Insert Samples [Enter]".
17. Remover as amostras do equipamento repetindo os procedimentos descritos nos itens 3 e 4.
18. Limpar a gordura depositada no fundo da cápsula de extração usando toalha de papel. Não usar água.
19. Colocar as amostras em estufa se secagem a 105 ° C ± 2 ° C durante 30 minutos.
20. Remover as amostras da estufa e mantê-las em dessecador com sílica gel por cerca de 10 minutos.
21. Repesar cada saco de filtro imediatamente após a remoção do dessecador e registrar o peso ao final da extração (*PFE*, g).

Cálculo do teor de extrato etéreo da amostra

O teor de extrato etéreo da amostra é calculado como:

$$\text{Extrato etéreo (\% da MS)} = \frac{(PCS - PXT4) - (PFE - PXT4)}{PCS - PXT4} \times 100$$

Comunicado Técnico, 142
On line



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groairas, Km 04 - Caixa

Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE

Fone: (0xx88) 3112-7400

Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: <https://www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos>

SAC: <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

1ª edição

On-line (Fev./2015)

Cadastro Geral de Publicações da Embrapa - CGPE

Nº 12023

Comitê de publicações

Presidente: Francisco Selmo Fernandes Alves
Secretária-Executiva: Juliana Evangelista da Silva Rocha. **Membros:** Alexandre César Silva Marinho, Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Carlos José Mendes Vasconcelos, Maira Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Tânia Maria Chaves Campelo, Diones Oliveira Santos, Viviane de Souza (Suplente).

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho. **Revisão de texto:** Carlos José Mendes Vasconcelos. **Normalização bibliográfica:** Tânia Maria Chaves Campêlo. **Editoração eletrônica:** Comitê de Publicações.