



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DE BLIGH & DYER PARA EXTRAÇÃO
QUANTITATIVA DE LIPÍDIOS TOTAIS EM OSTRAS**

ANA CLÁUDIA FIGUEIREDO DE CASTRO

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

**FORTALEZA - CEARÁ – BRASIL
DEZEMBRO - 2004**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C35a Castro, Ana Cláudia Figueiredo de.
Aplicação do método de Bligh & Dyer para extração quantitativa de lipídios totais em ostra / Ana Cláudia Figueiredo de Castro. – 2004.
39 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2004.
Orientação: Prof. Dr. Everardo Lima Maia.

1. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Everardo Lima Maia
(Orientador/Presidente)

Prof. Masayoshi Ogawa
(Membro)

Eng^a Quim. Norma Barreto Perdigão Ogawa
(Membro)

VISTO:

Prof. José Wilson Calíope de Freitas
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof^a. Artamízia M^a Nogueira Montezuma
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

MENSAGEM

“A SABEDORIA NÃO NOS É DADA; É PRECISO DESCOBRI-LA POR NÓS MESMOS DEPOIS DE UMA VIAGEM QUE NINGUÉM NOS PODE POUPAR OU FAZER POR NÓS.”

MARCEL PROUST

Dedico este pensamento aos amigos que conquistei no transcorrer do Curso de Engenharia de Pesca (prefiro não citar nomes, pois poderia esquecer de alguém)

AGRADECIMENTOS

A Deus, à minha família, aos colegas e professores do Curso de Engenharia de Pesca, em especial ao meu orientador Prof. Everardo, à Prof^a. Silvana que me ajudou em minhas análises estatísticas, aos colegas que me ajudaram no momento de fazer minhas análises laboratoriais – Camilla, Cinthia e Alexandre, aos componentes da banca examinadora.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse ao fim do meu trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Método de Soxhlet para extração de lipídios em pescado	3
2.2. Métodos de Folch e Bligh & Dyer para extração de lipídios em pescado.	4
2.3. Teores de lipídios em pescado usando diferentes métodos de extrações.	8
2.4. Composição centesimal de ostras	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Obtenção das amostras	16
3.2. Preparo das amostras para análise	16
3.3. Determinações químicas	16
3.4. Análise estatística	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Comparação entre os métodos de Soxhlet e de Bligh & Dyer modificados	21
4.2. Relação entre os teores de lipídios extraídos pelos três métodos e a composição química.	25
4.3. Dados complementares sobre as ostras, <i>C. rhizophorae</i> pesquisadas.	28
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	30

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
QUADRO 1 – Procedimentos realizados durante a extração de lipídios pelos métodos de Bligh & Dyer (1959) e Bligh & Dyer (1959) modificados, em ostra do mangue, <i>Crassostrea rhizophorae</i> .	20
TABELA 1 - Quantificação percentual de lipídios em carne de ostra, <i>Crassostrea rizophorae</i> extraídos pelos métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer (BD) modificados.	22
TABELA 2 – Resultados estatísticos do teste de análise de variância unifatorial (ANOVA).	23
TABELA 3 – Resultados sobre os teores de umidade, proteína, cinza, lipídios e carboidrato das seis amostras de carne de ostra, <i>Crassostrea rizophorae</i>	26
TABELA 4 – Composição química centesimal média da ostra, <i>Crassostrea rizophorae</i> .	27
TABELA 5 – Informações sobre rendimento da parte comestível e líquido drenado de ostra, <i>C. rhizophorae</i> .	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Principais etapas envolvidas na extração de lipídios usando o método de FOLCH.	5
FIGURA 2 - Principais etapas envolvidas na extração de lipídios usando o método original de BLIGH & DYER (1959).	7
FIGURA 3 - Conjunto Soxhlet ou bateria de Sabellin usado para extração de gordura pelo método de SOXHLET.	17
FIGURA 4 – Dados comparativos entre os teores de lipídios em ostra extraídos pelos três métodos.	23

APLICAÇÃO DO MÉTODO DE BLIGH & DYER PARA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DE LIPÍDIOS TOTAIS EM OSTRAS

Ana Cláudia Figueiredo de Castro

1. INTRODUÇÃO

O método mais tradicional usado para se extrair lipídios (gordura ou óleo) de alimentos é o de Soxhlet. O mesmo consiste na extração de gordura com solvente de baixa polaridade como éter etílico ou acetona. É um método simples, porém demorado, levando até 16 horas, feito sob alta temperatura em placa ou manta de aquecimento para volatilizar o solvente (NAGAKURA, 1972). Para facilitar o contato do solvente com os componentes lipídicos e reduzir o tempo de extração, é recomendado realizar uma desidratação total ou parcial da amostra (AURAND et al., 1987; PEARSON, 1973). As etapas de aquecimento deste método, se conduzidas sem controle, podem provocar mudanças irreversíveis dos componentes lipídicos, como por exemplo, oxidação dos ácidos graxos, polimerização e reação com proteínas, com possíveis reflexos na sua recuperação quantitativa e no teor de lipídios totais (LT).

Alternativamente, existem diversos outros métodos para extrair lipídios, porém os mais citados foram descritos por FOLCH et al. (1957) e por Bligh & Dyer (1959), conhecidos como métodos de FOLCH e de BLIGH & DYER, respectivamente. Ambos são considerados como métodos de extração a frio dos lipídios totais porque não há necessidade de aquecimento durante a extração, nem secagem prévia da amostra. Além disso, a amostra pode estar à temperatura ambiente, resfriada ou semi-descongelada.

Para extração de lipídios em pescado, o método de BLIGH & DYER tem sido usado com sucesso em amostras de peixes (BLIGH & DYER, 1959; CAULA, 2000; KARAKOLTSIDIS et al., 1995; MAIA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1992; MAIA et al., 1983, 1994, 1995, 1999; OLIVEIRA, 1999), de crustáceos (CAULA, 2003; HEU et al., 2003; MATHEW et al., 1999; MIZAEI, 2000; MOURA et al., 2002) e de moluscos (SINANOGLOU & MINIADIS-

MEIMAROGLOU, 1998; LIM et al., 1999; MATHEW et al., 1999; UNO et al., 2001; ORBAN et al., 2002).

Especificamente para ostras, o método de BLIGH & DYER (1959) foi também realizado com sucesso, pois nenhum problema foi relatado por LINEHAN et al. (1999), PAZOS et al. (1996) e SOUDANT et al. (1999). Ao contrário, dificuldades ocorreram na etapa de filtração que foi muito demorada durante a extração de lipídios em ostra (CAULA – comunicação pessoal), contribuindo para a interrupção das análises subseqüentes e divulgação do resultado de apenas uma amostra analisada (CAULA, 2000). Alternativamente, o método recomendado pela AOAC foi utilizado na extração de lipídios em ostras (MORAIS et al., 1978; PEDROSA & COZZOLINO, 2001), enquanto ABAD et al. (1995) extraíram os LT na amostra seca, usando o método descrito por Beninger & Lucas. Nenhum comentário sobre o motivo da escolha deste método e nem sua descrição constam no trabalho publicado.

Considerando o comentário de CAULA, objetiva-se no presente trabalho realizar modificações no método de BLIGH & DYER (1959) visando melhorar a etapa de filtração, com os resultados sendo comparados com aqueles obtidos pelo método de Soxhlet (NAGAKURA, 1972).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Método de Soxhlet para extração de lipídios em pescado.

Este método é considerado como padrão pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), sendo por isso quase sempre usado como referência para comparação de resultados obtidos com outros métodos (BROOKS et al., 1998; JAHAN et al., 2004; KATIKOU & ROBB, 2001; MANIRAKIZA et al., 2001; RONALD & BARNETT, 2003; VOGT et al., 2002).

Para carne bovina *in natura* (método 960.39) e ração animal (método 920.39) as recomendações da AOAC (1990) envolvem o uso de éter de petróleo ou éter etílico anidro para extração da gordura bruta em amostra seca. Para desidratação, a amostra deve ser misturada com areia e posterior secagem em estufa a 100 – 102°C durante 6 horas ou a 125°C por 90 minutos. A extração propriamente dita deve ser realizada durante um período de tempo variando de 4 a 16 h, dependendo da taxa de condensação.

Para alimentos do mar, a AOAC (1990) descreve o método de hidrólise ácida seguida da extração da gordura com éter de petróleo (p.ebuição <60°C) no frasco Mojonnier (método 948.15) ou o método rápido de Babcock modificado (método 964.12). A extração com acetona (método 948.16) também é descrita pela AOAC (1990) para farinha de peixe. Por ser trabalhoso e demorado, devido a necessidade de realizar uma hidrólise ácida e várias outras manipulações da amostra antes de iniciar a extração que deve durar 16 h, estes métodos têm sido poucos citados em pesquisas na área de pescado.

Alternativamente aos métodos da AOAC, existe o procedimento descrito por NAGAKURA (1972) que é um pouco menos trabalhoso, pois a amostra pode ser secada na estufa, sem necessidade de ser misturada com areia. A gordura é extraída com éter etílico durante 16 horas. Este procedimento foi usado nesta monografia, como descrito em material e métodos.

2.2. Métodos de Folch e Bligh & Dyer para extração de lipídios em pescado.

Em 1957 foi publicado um método simples para isolamento e purificação de lipídios totais em tecidos animais, tais como, cérebro, fígado e músculo de materiais biológicos. Na literatura técnica ele ficou conhecido como método de Folch e colaboradores, ou simplesmente, método de Folch (FOLCH et al., 1957). Essencialmente, o método consiste da homogeneização do tecido com uma mistura 2:1 (v / v) de clorofórmio (CHCl_3) – metanol (MeOH) e posterior lavagem do extrato com 0,2 volumes de água ou de uma solução salina visando remover os componentes não lipídicos do extrato. A principal desvantagem deste método relaciona-se com os grandes volumes de metanol (um volume) e clorofórmio (dois volumes) usados na extração para cada grama (mL) da amostra. Para efeito comparativo com o próximo método, supondo usar 100g de amostra, volumes de 2.000 mL de CHCl_3 e 1.000 mL de MeOH serão requeridos, totalizando assim, 3.000 mL.

As principais etapas deste método são mostradas na figura abaixo. Consultar o trabalho original publicado para obter maiores detalhes.

1) Pesar uma determinada massa de amostra

Admite-se que cada grama de amostra é equivalente a 1mL de água. Por exemplo, se for pesado 50g de amostra, o volume de água será de 50mL (outros pesos podem ser usados).

2) Adicionar a mistura de CHCl_3 e MeOH na proporção de 2:1.

A proporção entre o volume (ou peso) da amostra e o volume da mistura deve ser de 1:20 (volume/volume). No exemplo acima, 50mL de água deverá ser misturado com 20 vezes o volume da mistura de solventes, ou seja, $50\text{mL H}_2\text{O} \times 20 = 1000\text{mL}$. Para outros pesos, use a relação: Volume de solvente (mL) = 20 x peso da amostra.

3) Extração dos lipídios da amostra

Misturar o tecido e solvente durante 3 min em equipamento apropriado (liquidificador com copo de aço inoxidável, homogeneizador do tipo Ultra-Turrax ou equivalente, etc.). Não deve ser usado recipiente de plástico porque ele pode ser dissolvido pelo clorofórmio e contaminar os lipídios das amostras.

4) Filtração do extrato bruto lipídico

Filtrar a mistura amostra e solvente em funil Büchner com papel de filtração rápida isento de gordura, em frasco de vidro. Por exemplo, pode ser usado um kitasato conectado a uma trompa d'água (vácuo) para acelerar a filtração. Anotar o volume final do filtrado, que deve ser levado em conta na etapa seguinte.

5) Lavagem do extrato bruto lipídico

O extrato filtrado é misturado vigorosamente com 0,2 vezes o volume de água ou de uma solução salina. Deixar em repouso para separação de duas fases. Remover a camada superior (água + metanol + impurezas) através de sucção. Transferir para uma proveta graduada e anotar o volume final.

6) Quantificação do teor de lipídios totais (LT)

Transferir uma alíquota do extrato purificado para uma cápsula tarada, colocar numa estufa a $100^\circ\text{C}/30\text{min}$, deixar esfriar e pesar. Levar em conta o volume final obtido em (5) e o peso da amostra (1) para expressar a %LT.

FIGURA 1 – Principais etapas envolvidas na extração de lipídios usando o método de FOLCH.

O método de BLIGH & DYER foi publicado em 1959, tendo como título “um método rápido para extração e purificação de lipídios totais” que foi desenvolvido com o intuito de acompanhar as alterações lipídicas em peixes congelados. O procedimento completo pode ser realizado em cerca de 10 minutos. Para tanto, usa-se também uma mistura dos solventes clorofórmio e metanol, na proporção de 1:2, portanto, diferente da proporção 2:1 recomendada pelo método de FOLCH. Além disso, a quantidade de água tissular presente nas amostras de peixes deve ser rigorosamente levada em conta no estabelecimento das proporções dos solventes visando a extração efetiva dos lipídios totais.

Diferentemente do método de FOLCH (1957), os volumes solventes no método de BD são bastante menores, em função da proporção entre MeOH/CHCl₃/Água ser de 2:1:0,8 na primeira etapa de extração e mais um volume de CHCl₃ na segunda etapa de extração (proporção de 2:2:0,8). Na aplicação típica do método para músculo de bacalhau, considerado ter 80% de umidade, então 100g de amostra fornecerá 80mL de água, e proporcionalmente, sendo necessário usar 200mL de MeOH, 100mL de CHCl₃ (1^a extração) e 100 mL de CHCl₃ (2^a extração). Contando com os 100 mL de água adicionada na 2^a extração para atender aos requisitos da proporcionalidade de 2:2:1,8 entre os solventes e água, para otimização da extração dos lipídios. Com os volumes de CHCl₃ usados para recuperar os resíduos de LT na amostra (100 mL) e lavagens das vidrarias (~ 50 mL), o total ficará em torno de 600 a 700 mL, inferior aos 3 litros no método anterior. Segundo os autores, o procedimento pode ser adaptado para outros materiais, bastando para isto observar as proporções entre os solventes e água tissular. Por exemplo, no caso da amostra ser farinha de peixe ou ração onde o conteúdo de umidade é inferior a 80%, o peso da amostra, água destilada ou mesmo os volumes de solventes podem ser ajustados para atender às proporcionalidades.

O método original simplificado é mostrado na figura abaixo. Outras informações relevantes podem ser obtidas através da consulta do trabalho publicado (BLIGH & DYER, 1959).

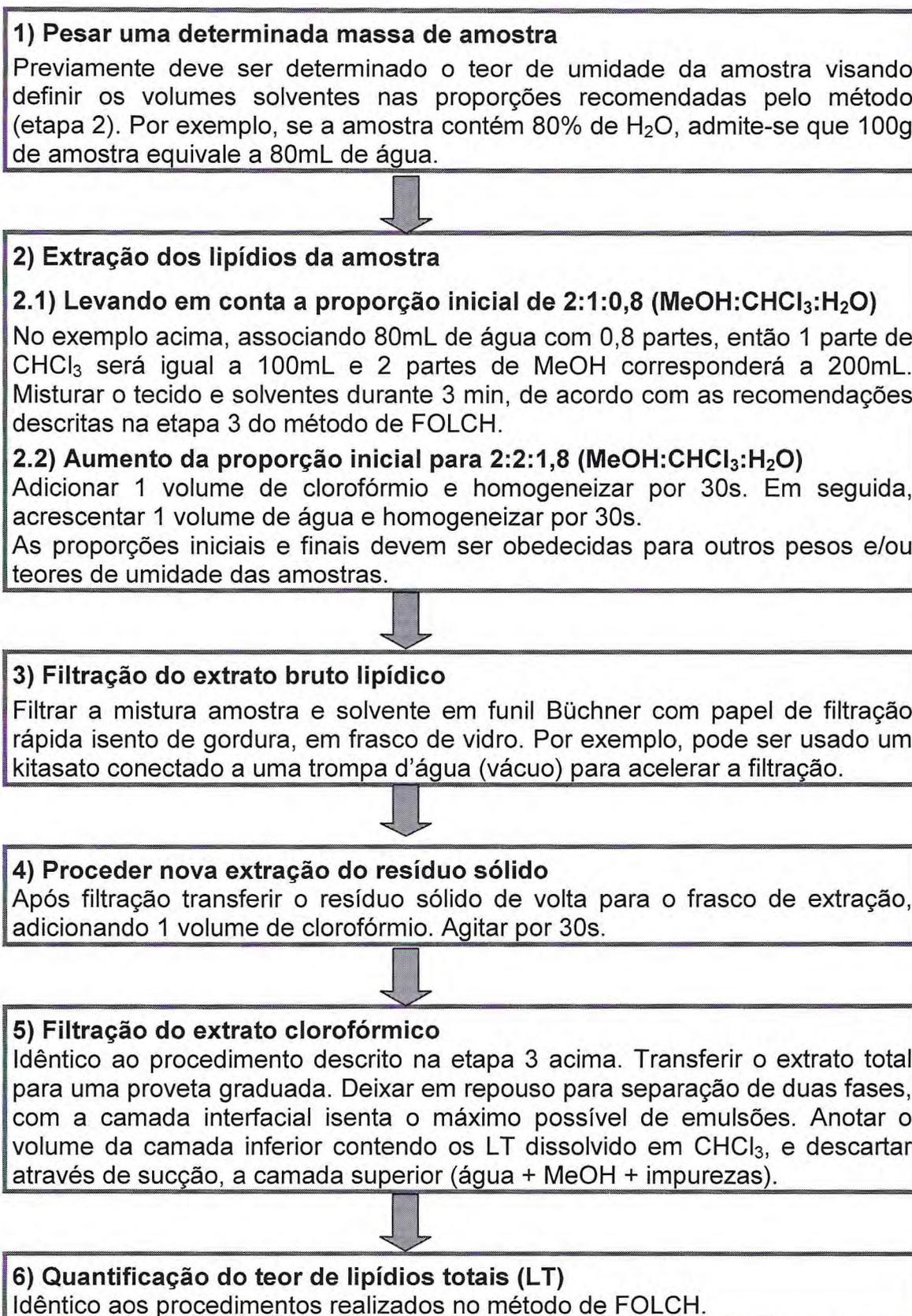


FIGURA 2 – Principais etapas envolvidas na extração de lipídios totais usando o método original de BLIGH & DYER (1959).

2.3. Teores de lipídios em pescado usando diferentes métodos de extrações.

Em ordem cronológica, a seguir, são mostrados os resultados publicados sobre os teores de lipídios em diversas amostras, com ênfase especial para o pescado, que usaram os métodos de extração de Folch, BD e suas modificações.

Dentro da literatura disponível, o método mais antigo é o de FOLCH et al. (1957), que foi desenvolvido para tecidos animais. No experimento foi usada massa branca e cinzenta de cérebro, fígado e músculo de animal (não especificado). Não foi realizado nenhum outro método para comparação de resultados. Os autores comentam que o método é simples e se destina à preparação de extratos lipídios puros, já que o processo de lavagem remove essencialmente todos os contaminantes não lipídicos, com apenas 0,3 a 0,6% de perda total, dependendo da amostra investigada. Os dados quantitativos foram direcionados apenas para os rendimentos e recuperação de lipídios nas camadas superior (metanol e água) e inferior (clorofórmio) e sobre o efeito da lavagem com diferentes tipos de sais, sem, entretanto, mencionar resultados sobre os conteúdos de lipídios totais (LT) nas amostras. Assim, aparentemente, os autores objetivaram apenas em desenvolver o método para extração e purificação LT, sem preocupação com informações sobre o conteúdo de LT das amostras.

No desenvolvimento do seu método, BLIGH & DYER (1959) compararam a extração de LT no bacalhau com os resultados obtidos pelos métodos de Dambergs, AOAC e Folch. Foi constatado que numa amostra, o método de Bligh & Dyer (média de 0,666%) foi mais alto do que o método da AOAC (média de 0,625%). Para outra amostra, com teor de LT mais elevado (média de 0,76%) do que a amostra 1, não houve diferença significativa com o método de Folch (média de 0,775%), enquanto o método de Dambergs (média de 0,68%) foi inferior a ambos os métodos. Para outras nove amostras de peixes frescos, congelados e farinha de peixe, os resultados do método de BLIGH & DYER (1959) foram todos superiores aos do método de Dambergs.

Um método envolvendo a combinação dos métodos de Folch e B&D foi usado por TREVINO & LEE (1990) para extração de lipídios em filés de mackerel (*Scomber scombrus*). Os autores resolveram investigar o efeito do

solvente usado, a relação entre o peso da amostra e solvente e a proporção dos solventes. O método básico consistiu da adição de 50 mL da mistura CHCl_3 , MeOH e H_2O sobre 5 g de amostra, seguido de homogeneização, filtração, transferência do filtrado para um funil de separação graduado, adição de 0,5% NaCl, separação das fases e quantificação. A máxima extração de lipídios na cavala (5 a 25% LT; 58 a 75% de umidade) ocorreu com uma extração simples usando misturas de solventes variando nas proporções de 65:30 a 75:20 de CHCl_3 e MeOH, sem necessidade de ajuste do volume de água para a amostra úmida. Foi também constatado que o rendimento de LT aumentou com o aumento da relação solvente apolar:polar até obtenção da bi-camada. Uma alta proporção entre o solvente e amostra também foi recomendada para completa recuperação de LT na extração única.

Por considerar que de uma maneira ou de outra os métodos já publicados apresentam problemas, quer por falta de reprodutibilidade e precisão, quer por ser muito trabalhoso, demorado e consumir grandes quantidades de solventes, LEE et al. (1993) decidiram desenvolver um método simples e rápido de extração com alta precisão e reprodutibilidade baseado no uso de MeOH e CHCl_3 em amostras de peixes magro (bacalhau, *Gadus morhua*) e gordo (mackerel, *S. scombrus*). Foi dito que um dos objetivos foi melhorar o método de BD, visando extração dos LT numa única extração. As seguintes variáveis foram investigadas para determinar as condições ótimas para máxima extração de LT: (1) relação entre o peso da amostra e os volumes de solventes, que variou de 2 a 14; (2) a proporção entre CHCl_3 e MeOH (1 a 16 + 100% CHCl_3). As principais etapas deste método foram as seguintes:

- Homogeneizar a pasta com os solventes por 1,5 min;
- Filtrar em papel de filtração rápida dentro de uma proveta graduada;
- Para separar o filtrado em duas fases foi adicionado solução aquosa 0,5% NaCl; A solução foi deixada em repouso por 30 min a 6 horas para completa separação das fases e evitar a formação de emulsão estável na interfase;
- Retirar alíquota do extrato, secar em estufa e pesar.

Segundo os autores, o teor de LT foi constante independente do tempo de repouso e a emulsão formada contém níveis variáveis de substâncias protéicas, mas que não provoca impacto significativo na quantificação dos LT.

Descrição completa do método e outras informações práticas relevantes são fornecidas pelos autores em seu artigo.

O método de BLIGH & DYER foi comparado com outros dois métodos usando extração com hexano:acetona (Hx:Acet) e diclorometano (DCM) em filé de "whiting fish", sendo inclusive, avaliado o efeito do peso da amostra sobre o teor de LT (HONEYCUTT et al., 1995). Não foi fornecido detalhes sobre o procedimento de extração com Hx:Acet e DCM. Os resultados evidenciaram que o tamanho da amostra teve um efeito significativo sobre os teores de LT, independente do método usado. As determinações realizadas em amostras de 0,5 a 1,0g foram as mais variáveis. No método de Bligh & Dyer (BD), a amostra pesando 0,5g (2,07%) diferiu estatisticamente das outras amostras com pesos de 1g (1,47%), 5g (1,12%), 10g (1,06%) e 100g (1,29%). Todavia, entre estas, não houve diferenças significativas. Na amostra pesando 0,5g, o método de BD não diferiu da extração com Hx:Acet (1,29%), mas ambos foram diferentes da extração com DCM (5,77%). Nos outros pesos de amostras, os três métodos variaram de maneira inconstante, ora tendo ou não diferenças entre os métodos. Para estes autores, a extração com Hx:Acet foi impraticável para amostras de 100g, isto também acontecendo para tamanhos de amostra de 50 e 100g na extração com DCM. Sem levar em conta os resultados da amostra de peso 0,5g, as médias obtidas pelos três métodos foram, respectivamente, de 1,26% (1,06 a 1,47%), 0,87% (0,63 a 1,00%) e 0,71 (0,28 a 1,14). O método de BD geralmente apresentou resultados mais altos para todas as amostras de tamanho maior do que 1,0g.

Pesquisando o conteúdo de LT em carcaças de ratos, BROOKS et al. (1998) compararam quatro métodos de extração, envolvendo (1) saponificação da amostra, seguida de extração com Hexano (Hx), (2) método de Bligh & Dyer, (3) método de Soxhlet (Sox), usando DCM:MeOH com o solvente e (4) método de Goldfish (Gdf), usando Hx como solvente. Nesses dois últimos métodos, amostras desidratadas por secagem com ar e por "freeze dried" foram também comparadas. O método de BD foi escolhido como referência pelos autores, tendo em vista que não existe nenhum método padrão para determinação do teor de LT na carcaça em animais de laboratórios. O método de saponificação apresentou o maior teor de LT (8,81%), sendo estatisticamente diferente do método de BD (7,84%). Todavia, ambos os

métodos não diferiram significativamente dos outros, que tiveram 8,47% no método de Sox e 8,72% no método de Gdf nas amostras secas ao ar e 8,66% no método de Sox e 8,56% no método de Gdf nas amostras “freeze dried”. Sendo assim, o processo de secagem também não interferiu na extração de lipídios totais em carcaças de ratos.

Com o objetivo de substituir o clorofórmio, considerado tóxico para os seres humanos, por solventes de baixa toxicidade, UNDELAND et al. (1998) compararam o método de Bligh & Dyer modificado por Ekstrand e colaboradores em 1996, com três sistemas de extrações compostos por ALCANOS/ÁLCOOL/ÁGUA para extração de lipídios no arenque (*Clupea harengus*). Como descrito pelos autores, os métodos foram de: (1) Hara & Radin modificado por Picknova em 1995, que usa Hexano:iso-propanol (Hx:i-Pro; 3:2) mais água tissular; (2) Burton e colaboradores publicado em 1985, usando n-Heptano (n-Hp), etanol (EtOH) e água tissular e posterior tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS); e (3) Nilsson e colaboradores publicado em 1994, que usa Hx:i-Pro (2:1) e água tissular. Em adição à obtenção de resultados sobre o teor de lipídios, os autores verificaram também a influência da modificação sobre os conteúdos de fosfolipídios (o componente que mais variou quantitativamente entre os 4 métodos), ácidos graxos livres, tocoferóis, hidroperóxidos lipídicos e dienos conjugados. Entre os métodos foi constatado que o método de Bligh & Dyer foi o mais eficiente na extração de LT, dando resultados 15 a 30% mais altos do que os outros três métodos.

O método de Soxhlet, considerado como padrão por KATIKOU & ROBB (2001) foi comparado com um método de extração rápida (8 min por amostra), denominado de método CEM, um sistema automático computadorizado para determinação simultânea de LT e água, utilizando secagem via microonda para umidade, seguida de extração dos LT com o solvente DCM. O método CEM apresentou resultados bastante acurados para amostras individuais, gastando aproximadamente 8 min por amostra. Amostras de salmões com teores variando de 2,0 a 25,4% foram investigadas. Comparação destes métodos mostrou uma correlação linear significante, mas o método CEM foi consistentemente mais baixo do que o padrão por um fator de 0,37%, principalmente para amostras com teores inferiores a 10%. Finalmente foi concluído que o método CEM foi efetivamente mais rápido para uso sob

condições comerciais, enquanto que, para propósitos de pesquisas, um fator de correção adicional deverá corrigir o método CEM para níveis abaixo de 10%.

O método de Soxhlet, usando acetona e hexano (1:4) no sistema extrator de Büchi (modo padrão ou clássico, Soxq) foi considerado como padrão de referência para os métodos alternativos de Bligh & Dyer original (BDo), Bligh & Dyer modificado (BDm), Roese-Gottlieb (RG) e Soxhlet no modo de extração a quente do sistema Büchi (Soxq) que, foram usados para extração de lipídios em amostras alimentícias comuns, tais como, margarina, ovos, chocolate, leite, frango e farinha de peixe por MANIRAKIZA et al. (2001). O método de Soxhlet foi conveniente somente para amostras sólidas, e com exceção do método RG, os outros métodos foram adequados para extração de lipídios de todas as amostras. Para a amostra de farinha de peixe, os seguintes resultados foram encontrados: 7,2% no BDo, 7,4% pelo BDm, 6,3 pelo RG, 7,9 pelo Soxp e 8,2 pelo Soxq. O valor declarado no rótulo foi de 7,5%. Não houve análise estatística comparativa entre os métodos.

Comparação de 4 métodos para extração de gordura em arenque fresco (*C. harengus*) foi investigado por VOGT et al. (2002). Os métodos utilizados compreenderam: (1) Método de Soxhlet, usando éter de petróleo como método de referência, (2) Torry Fat meter, um aparelho que usa a inter-relação entre os conteúdos de água e gordura para quantificar indiretamente o teor de lipídios, (3) método de secagem em Microonda, também baseada na relação água/gordura, (3) método NIR de refletância que, estima a quantidade de luz refletida pela amostra, medida num espectrofotômetro na região do infravermelho próxima, e (4) método de Soxhlet (fexIKA) modificado para uso comercial que usa alta pressão durante a extração. O teor de LT extraído pelo método de Soxhlet teve uma média de $8,6 \pm 0,51$ (CV = 5,93%, n =10), enquanto o erro padrão dos outros métodos foram de 1,37%, 0,79%; 0,8% e 1,36%, respectivamente. Comparação do método de Soxhlet com os demais, a correlação foi considerada alta, com respectivamente, 0,84; 0,95; 0,95 e 0,84. Como conclusão foi encontrado que o método NIR refletância reproduz com mais confiança os resultados do método de Soxhlet. Os outros métodos apresentaram resultados médios inferiores ao de Soxhlet. O método da Torry

Fat meter foi mais prático comercialmente do que o NIR e microonda. Os métodos de Soxhlet e da Torry foram considerados muito demorados.

Os métodos de Bligh & Dyer, Soxhlet (éter de petróleo) e o sistema de Büchi (hidrólise ácida preliminar à extração com éter de petróleo) também foram comparados durante a extração de lipídios em peito de frango, por JAHAN et al. (2004). Os teores foram de $1,15 \pm 0,07\%$, $0,35 \pm 0,04\%$ e $1,12 \pm 0,05\%$, respectivamente, para os métodos de BD, Sox e Büchi. As análises estatísticas mostraram inexistência de diferenças entre os métodos de Büchi e de DB. A influência destes métodos sobre os teores de alguns componentes lipídicos também foram investigados, sendo encontrados resultados bastante diferentes em função do método empregado. O método de BD teve maior rendimento para os triacilgliceróis e mais baixos para ácidos graxos livres. Já os métodos de Büchi e Soxhlet extraíram mais glicerofosfolipídios.

2.4. Composição centesimal de ostras

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998) registra os seguintes dados sobre a composição química da ostra crua, *C. gigas*: 79,71% de umidade, 14,19% de proteína, 1,79% de lipídios totais (método de Soxhlet), 1,36% de cinzas, 2,95% de carboidratos totais e um valor energético de 85 kcal/100g.

Pesquisas publicadas sobre a composição química de ostras brasileiras são muito raras nos periódicos brasileiros.

O trabalho mais antigo encontrado foi publicado por MORAIS et al. (1978), que investigaram a composição aproximada dos tecidos comestíveis de ostra cultivada *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck), proveniente da região lagunar do Estado de São Paulo, denominada Cananéia. O método descrito pela AOAC, versão 1975, foi usado para quantificação do teor de gordura. Os dados quantitativos sobre a composição centesimal foram os seguintes: Umidade - 87,75 (85,03 - 92,65%), Proteína - 5,68% (4,76 - 7,00%), matéria graxa - 0,72% (0,36 - 1,10%), cinzas - 1,82% (1,23 - 2,29%), glicogênio - 0,76% (0,52 - 1,22%). Os resultados mostram que os meses mais favoráveis para o consumo destas ostras cultivadas são setembro a novembro e março a abril

Para a ostra, *C. rhizophorae* (Fortaleza, Ceará), os resultados publicados por CAÚLA (2000), em uma única amostra, acusou valores de 83,8% de umidade, 7,6% de proteína, 2,6% de lipídios totais (método de BLIGH & DYER), 1,5% de cinzas e 4,5% de carboidratos (por diferença).

Esta mesma espécie foi pesquisada por PEDROSA & COZZOLINO (2001), que notaram, com exceção do teor de umidade e da fração Nifext, aumento dos macro-nutrientes presentes na cozida em relação à da ostra crua, que tiveram, respectivamente, 79,71 e 76,97% de umidade, 14,19 e 15,82% de proteína, 1,79 e 2,62% de LT (método de SOXHLET), 1,36 e 1,69% de cinzas e 2,95 e 2,90% de carboidratos (fração Nifext, obtida por diferença).

No exterior, a composição do pescado foi divulgada na revisão feita por MURRAY & BURT (1969), sendo relatado para a ostra, *Ostrea edulis*, os seguintes dados: Umidade (77 – 83%), proteína (8,6 – 12,6%), lipídios totais (1,1 – 2,5%) e valor energético (79,5 – 101,4 kcal/100g).

Para PAZOS et al. (1996) o conteúdo de lipídios totais na ostra *C. gigas* de origem italiana e cultivada na Galícia (Espanha) apresentou variação sazonal no teor de lipídios totais, e que isto estava correlacionado com a concentração da disponibilidade da concentração de fitoplâncton e ciclo sexual. Esta variação se deve principalmente, às mudanças nos triacilgliceróis, a classe lipídica predominante. O método de descrito por Beninger & Lucas em 1984 foi utilizado para extração e quantificado segundo o método colorimétrico de Marsh & Weinstein publicado em 1966. Infelizmente, os resultados foram expressos em forma de gráfico, numa escala impossível de estabelecer o valor encontrado pelos autores.

Ostras, *C. virginica* mantidas em várias estações de cultivos em Washington (EUA) foram analisadas por MALTA et al. (1998), quanto aos teores de umidade e de lipídios extraídos pelo método de Bligh & Dyer (1959). A concentração média no tempo zero de cultivo foi de 82,1% de umidade e de 1,00% de LT. Após 62 dias, a concentração média de água nas ostras das estações variou de 81,9% a 86,1%, enquanto nas amostras individuais, esta variação foi de 81,2 a 86,4%. Para o teor de lipídios, o conteúdo variou de 0,27 a 1,38% nas ostras das estações, e, individualmente, a variação foi de zero a 1,53%.

A composição química da ostra do Pacífico, *C. gigas* da Irlanda, num período de 13 meses foi investigada por LINEHAN et al. (1999), sendo encontrado, em base úmida, os seguintes valores: Umidade – 75,3% (73,0 - 79,5%), glicogênio – 6,5% (5,1 – 10,1%), proteína – 10,5% (9,9 – 14,3%), lipídios totais – 1,9% (1,7 – 2,1%) e cinzas – 1,7% (1,0 – 3,0%).

Ostras do Pacífico, *C. gigas*, de três anos de idade cultivadas na baía de Marennes Oléron (França) foram analisadas por SOUDANT et al. (1999), nos meses de abril a julho, correspondendo ao período reprodutivo e de desova naturais e artificiais. Os lipídios totais (LT) foram extraídos de amostras liofilizadas de acordo com o método de FOLCH et al. (1957) modificado por Ways & Hanahan em 1964. O conteúdo de lipídio aumentou e se acumulou nas gônadas, mas em maior extensão sob condições naturais. A proporção de LT durante o curso reprodutivo artificial aumentou durante as primeiras 6 semanas de 16 a 17,5% em base seca, permanecendo estável até a desova. Nas ostras naturais o LT aumentou de 16 a 21%., porém não houve diferença estatística significativa entre as ostras naturais e artificiais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

Seis (6) amostras de ostra nativa ou do mangue, *Crassostrea rhizophorae* foram adquiridas em um ponto comercial de Fortaleza – Ceará, no estado congelado. Cada amostra era composta por um lote de cerca de 50 unidades, totalizado aproximadamente 300 indivíduos.

3.2. Preparo das amostras para análise

No Laboratório de Recursos Aquáticos (LARAq) do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, as ostras foram lavadas com água corrente para retirada de sujidades externas nas valvas, sendo então pesadas e abertas com auxílio de faca pontiaguda. A porção comestível foi retirada, colocada dentro de um béquer, para em seguida, proceder uma filtração em peneira comum de plástico durante cerca de 15 min., para drenagem do líquido naturalmente presente dentro das ostras. Encerrada a drenagem, mediu-se o volume do líquido drenado e os órgãos internos foram pesados, para em seguida serem homogeneizados em mini-processador até obtenção de uma massa uniforme que foi utilizada para as determinações químicas.

3.3. Determinações químicas

3.3.1. UMIDADE - determinada em triplicata, através de secagem realizada em estufa 105°C, até atingir peso constante (NAGAKURA, 1972).

3.3.2. PROTEÍNA TOTAL – avaliada em triplicata, através da quantificação do nitrogênio total (NT), usando o método semi-micro Kjeldal descrito por PEARSON (1983). Para conversão de NT em proteína foi usado o fator 6,25.

3.3.3. CINZAS – determinada em triplicata, através de incineração da amostra por 5 h na temperatura de 600°C em forno Mufla (NAGAKURA, 1972).

3.3.4. LIPÍDIOS TOTAIS - foram usados os métodos de Soxhlet (método de referência) e de Bligh & Dyer (1959) modificados pela adição e subtração de água.

(A) Método de Soxhlet descrito por NAGAKURA (1972)

O procedimento foi realizado da seguinte maneira:

- ➡ Pesar 4 a 5 g da amostra úmida dentro um béquer de 50 mL, numa balança semi-analítica (4,00 – 5,00g).

- Adicionar sulfato de sódio anidro sobre a amostra misturando-os com o auxílio de um bastão de vidro até obtenção de uma mistura semidesidratada de aspecto farináceo.
- Transferir cuidadosamente a mistura para dentro de um cartucho cilíndrico feito com papel filtro (apoiado dentro de um béquer de 100 mL), usando uma pequena espátula de aço inoxidável. Para transferência quantitativa, limpar os vestígios de amostra dentro do béquer, no bastão de vidro e na espátula, usando para isto pequenos pedaços de algodão, segurando-os sempre com uma pinça de aço inoxidável. Repetir esta operação em quantidade suficiente para limpeza total do béquer, bastão e espátula, porém, nunca esquecendo de colocar os algodões de limpeza dentro do cartucho. Continuar a limpeza do béquer, bastão e espátula, agora com o algodão umidificado com acetona, permitindo o gotejamento do solvente sobre o algodão anteriormente colocado dentro do cartucho. Finalmente, colocar um chumaço maior de algodão na boca do cartucho e dobrar as bordas do papel para evitar possíveis escapes de material sólido de dentro do cartucho.
- Colocar o cartucho dentro do extrator (E). Montar todo o conjunto de Soxhlet como mostrado na figura 3.

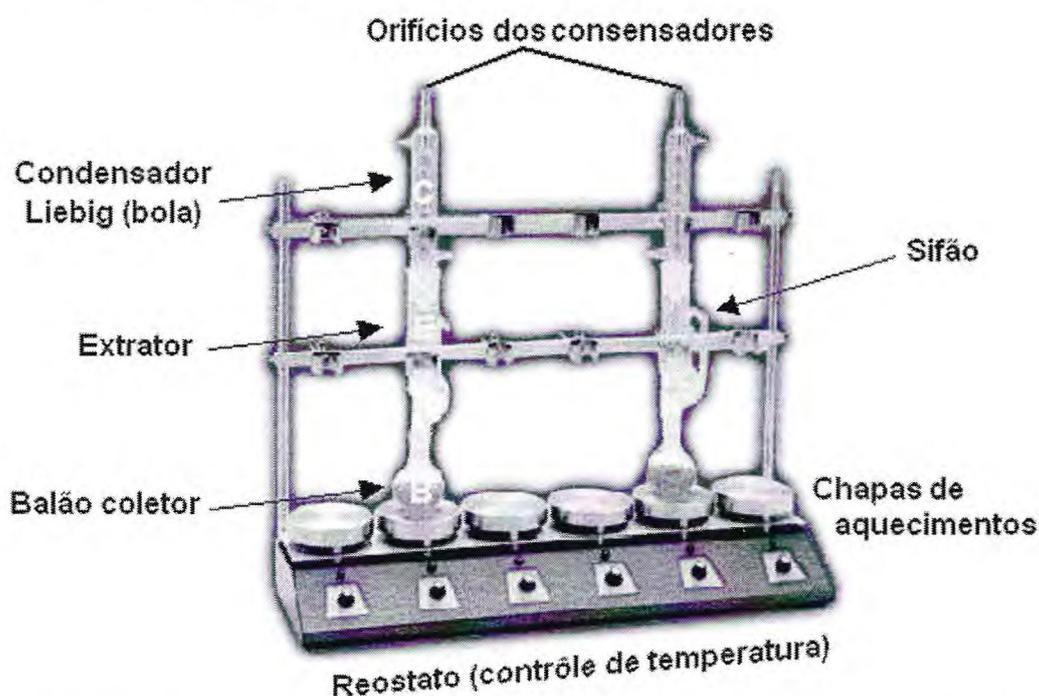


FIGURA 3 – Conjunto Soxhlet ou bateria de Sabellin usado para extração de gordura pelo método de Soxhlet.

- ➡ Adicionar acetona (solvente de extração) através dos orifícios dos condensadores, em quantidade suficiente para provocar a sifonação do líquido para dentro do balão coletor (B), previamente pesado. Após parar a sifonação, adicionar mais solvente dentro do extrator até a metade da altura máxima do sifão.
- ➡ Abrir a torneira de água para permitir sua passagem pelo condensador (C). Quando o fluxo ficar contínuo, ligar a fonte de aquecimento (reostatos) na intensidade máxima, ficando assim, até os primeiros sinais de ebulição do líquido dentro do balão coletor e/ou gotejamento do solvente na extremidade inferior do condensador. Quando isto acontecer, reduzir a taxa de aquecimento para intensidade média (posições 4 a 6).
- ➡ Deixar acontecer vários ciclos de vaporização, condensação e sifonação dentro de um período de tempo contínuo de 16 horas ou de modo descontínuo, por dois dias.
- ➡ Concluída a extração, colocar uma tela de amianto entre a chapa de aquecimento e o balão receptor, remover o condensador, retirar o cartucho de dentro do extrator usando uma pinça de aço inoxidável. Recolocar o condensador no extrator, retirar a tela de amianto e recuperar o solvente dentro do extrator, porém, evitando sua sifonação de volta ao balão coletor. Se necessário repetir estas operações para reduzir o máximo possível o solvente dentro do balão coletor, contudo, tendo o cuidado de não secar totalmente para não queimar a gordura, que interferirá nos dados quantitativos.
- ➡ Retirar o balão coletor do sistema, colocar numa estufa a 105°C durante 30 a 60 min para assegurar total evaporação do solvente e traços de água dentro do balão.
- ➡ Retirar o balão da estufa, colocar dentro de um dessecador evacuado, deixar esfriar à temperatura ambiente, então pesar, em balança analítica (precisão: 0,1mg).
- ➡ Calcular o teor percentual de LT na amostra úmida.

(B) Método de Bligh & Dyer modificado

No método original de Bligh & Dyer (1959), como descrito no item 2.2 da revisão de literatura, a água foi adicionada na etapa 2 (2ª extração) visando elevar a proporção final para 2:2:1,8, e com isto, obter a máxima extração dos LT da amostra. Na presente pesquisa, a modificação fundamental realizada envolveu a participação da água no processo de extração. Como primeira modificação, a água foi mantida do processo de extração (BD c/água), porém sendo adicionada sobre o resíduo sólido após a primeira filtração. Na outra modificação, a água foi suprimida da extração (BD s/ água).

Independente do método modificado, manteve-se a proporção inicial de 2:1:0,8 entre MeOH/CHCl₃/H₂O tissular. Para isto, determinou-se previamente o teor de umidade da amostra.

Para extração dos LT utilizou-se um agitador mecânico Ultra-Turrax com haste de aço inoxidável e uma palheta tipo borboleta montada na sua extremidade inferior, girando numa velocidade controlável de 5.000 rpm. Os procedimentos completos destes métodos modificados são mostrados no QUADRO 1.

3.4. Análise estatística

Os resultados comparativos entre os métodos foram analisados estatisticamente empregando-se a análise de variância unifatorial (ANOVA). Em caso de rejeição da hipótese (H₀), as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey, no nível de significância de 5%, realizados conforme CENTENO (1999) e MONTGOMERY (1976).

QUADRO 1 – Procedimentos realizados durante a extração de lipídios pelos métodos de BLIGH & DYER (1959) e BLIGH & DYER (1959) modificados, em ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae*.

Descrição das etapas	Etapas realizadas		
	BD ¹	BD c/água ²	BD s/água ³
(1) Pesar a amostra dentro do frasco extrator	X	X	X
(2) Adicionar MeOH e CHCl ₃ proporcional ao volume de água na amostra visando manter a proporção 2:1:0,8. Agitar no Ultra-Turrax a 5.000 rpm por 2 min.	X	X	X
(3) Filtrar com vácuo em funil Büchner e papel de filtração rápida.	N	X	X
(4) Transferir o resíduo sólido (ostra + papel) para o frasco extrator.	N	X	X
(5) Adicionar CHCl ₃ , elevando a proporção para 2:2:0,8. Agitar por 30 s.	X	X	X
(5) Adicionar H ₂ O elevando a proporção para 2:2:1,8. Agitar por 30 s.	X	X	N
(6) Filtrar com vácuo em funil Büchner e papel de filtração rápida.	X	X	X
(7) Transferir o resíduo sólido (ostra + papel) para o frasco extrator.	X	X	X
(8) Realizar nova extração com CHCl ₃ , usando o Ultra-Turrax por 2 min.	X	X	X
(9) Filtrar com vácuo em funil Büchner e papel de filtração rápida.	X	X	X
(10) Transferir o extrato para uma proveta graduada. Deixar em repouso para separação das fases superior (água + MeOH + impurezas não lipídica) e inferior (CHCl ₃ + LT). Anotar o volume de CHCl ₃ , e descartar a camada superior por sucção a vácuo.	X	X	X
(11) Transferir 3 alíquotas de 5,0 mL do extrato CHCl ₃ para cápsulas de alumínio taradas. Evapor o solvente em estufa a 105 °C por 30 min. Deixar esfriar a temperatura ambiente dentro de um dessecador a vácuo, então pesar em balança analítica.	X	X	X
(12) Calcular o teor de lipídios levando em conta o volume da alíquota, o volume total da camada CHCl ₃ e o peso da amostra.	X	X	X

¹ BD = método de Bligh & Dyer original;

N: Qdo etapa não realizada.

² BD c/água = método de Bligh & Dyer modificado ;

³ BD s/água = método de Bligh & Dyer modificado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comparação entre os métodos de Soxhlet e de Bligh & Dyer modificados.

Em função da comunicação pessoal de CAULA, narrando ter encontrado enormes dificuldades na operação de filtração da amostra durante extração de lipídios na carne de ostra usando o método original de BLIGH & DYER (1959), foi testado também no presente experimento, a aplicação deste método por duas vezes, tendo sido confirmando as observações de CAULA.

Por isso, algumas tentativas de modificações foram realizadas com o objetivo sempre de aperfeiçoar a etapa de filtração. Os relatos experimentais acham-se descritos abaixo:

- (1) Adição de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (30 mL), com o objetivo de desnaturar as proteínas e hidrolisar as ligações dos lipídios com carboidratos e proteínas, seguindo-se então todas as etapas do método de BLIGH & DYER (1959) original. A filtração também não foi concluída, sendo por isso descartada a amostra sem quantificação do teor de lipídios.
- (2) Adição de 20 mL de TCA a 30% e uso do método de Bligh & Dyer. A filtração foi completa, porém um pouco demorada. Na proveta, o extrato apresentou-se com 5 camadas, com a camada inferior apresentando uma coloração verde amarelado, com 5,6% de LT, valor inesperadamente alto em relação a revisão de literatura feita e aos resultados desta monografia.
- (3) Com o intuito de verificar a influência sobre a velocidade de filtração, foi testado o uso de areia do mar (20g), que foi adicionada no frasco extrator antes da filtração do extrato bruto do método de Bligh & Dyer (FIGURA 2). Em relação ao método original de BD, a filtração foi concluída, mas também foi lenta. Um teor razoável de 2,3% de LT foi encontrado na camada clorofórmica.
- (4) Também foi comparado o uso dos métodos de FOLCH (1957) e de BLIGH & DYER (1959) com areia (40g), tendo sido encontrados teores de 2,7% e de 1,5%, respectivamente. Não houve demora na filtração no método FOLCH, enquanto esta continuou sendo demorada no método de BD. Como a adição de areia não tornou a filtração mais rápida do que se esperava, esta terminou sendo descartada. Já o método de FOLCH deixou

de ser usado em função dos grandes volumes de solventes utilizados para extração dos lipídios. No presente experimento, as quantidades de amostras estavam na faixa de 20 a 25g, sendo então necessário usar de 400 a 500 mL de metanol e 200 a 250 mL de clorofórmio, um problema em relação ao tamanho do frasco extrator disponível. Os volumes de MeOH e CHCl_3 no método de BD seriam algo em torno de 50 e 25 mL, quantidades proporcionais ao volume de água na amostra.

- (5) Finalmente, foram testadas as modificações no método de BD, principalmente na adição ou eliminação de água depois de mantida a primeira proporcionalidade entre os solventes (QUADRO 1), os resultados comparativos estão mostrados na TABELA 1.

TABELA 1 – Quantificação percentual de lipídios em carne de ostra, *Crassostrea rizophorae* extraídos pelos métodos de SOXHLET e BLIGH & DYER (BD) modificados.

Amostras	Método de Soxhlet (%)	Métodos de Bligh & Dyer modificados	
		BD c/água (%)	BD s/água (%)
1	1,5	1,7	1,5
2	2,3	1,1	1,3
3	1,3	1,5	1,6
4	1,3	0,9	1,5
5	0,9	1,4	1,4
6	0,9	0,9	1,5
Média	1,37 ± 0,52	1,25 ± 0,33	1,47 ± 0,10

Os resultados foram muito próximos entre si, a maior quantidade extraída ocorreu com o método de BD sem água e o menor para o método de BD com adição de água.

O teste de ANOVA indicou a aceitação da hipótese de nulidade (H_0) para a variável LT, não há diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nos teores de lipídios extraídos pelos 3 métodos devido ao valor F calculado ter sido menor do F crítico (TAB.2). Como não houve rejeição da hipótese H_0 não foi necessário realizar o teste de Tukey (CETENO, 1999; MONTGOMERY, 1976).

TABELA 2 – Resultados estatísticos do teste de análise de variância unifatorial (ANOVA).

Análise de variância unifatorial						
RESUMO						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
Método de Soxhlet	6	8,2	1,366667	0,266667		
Método de B&D c/água	6	7,5	1,25	0,111		
Método de B&D s/água	6	8,8	1,466667	0,010667		
ANOVA						
Fonte de Variação	SQ	GL	Variância	F calculado	Valor P	F crítico
Entre grupo	0,141111	2	0,70556	0,545064	0,590865	3,682317
Dentro dos grupos	1,941667	15	0,129444			
Total	2,082778	17				

Os dados da TABELA 1 estão apresentados no gráfico abaixo.

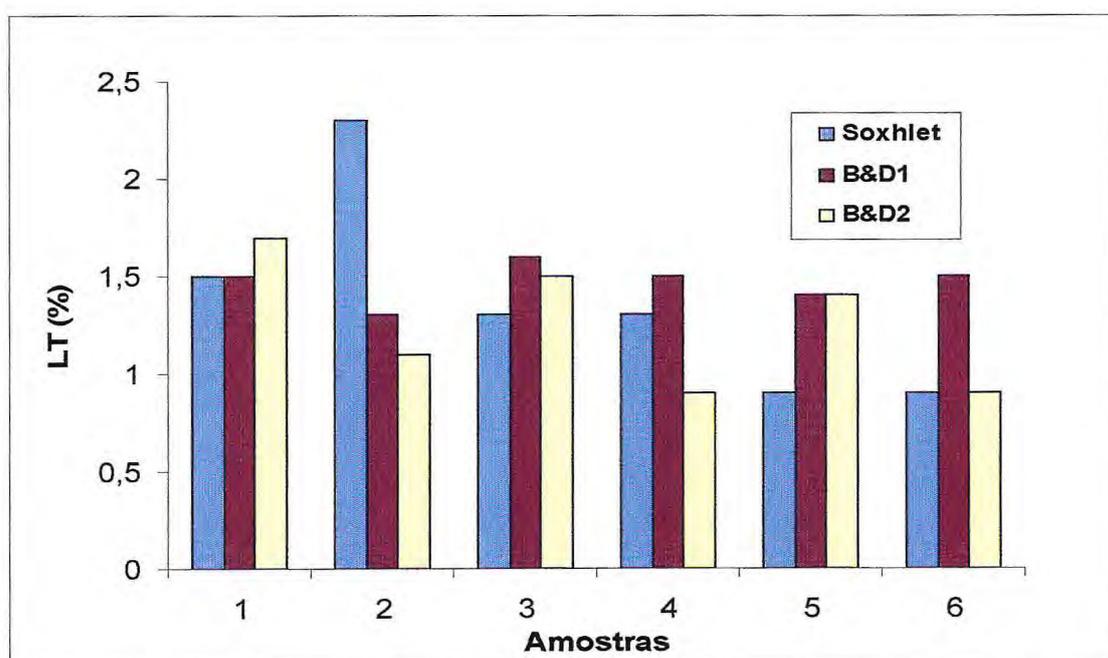


FIGURA 4- Dados comparativos entre os teores de lipídios em ostra extraídos pelos três métodos.

Pelos dados mostrados na Tabela 1, nota-se que o método de Soxhlet apresentou maior variabilidade entre as amostras (CV = 37,9%), seguido em menor intensidade pelo método de BD com água (CV = 26,4%). O método de BD sem uso de água apresentou menos variação com coeficiente de variação de 6,8%. Este comportamento não deve ter sido devido às diferenças entre as amostras, mas sim, provavelmente, pelas excessivas manipulações no método de Soxhlet, como no caso da transferência quantitativa da amostra para dentro do cartucho de extração (resultados inferiores aos outros métodos) ou presença de partículas sólidas das amostras dentro do frasco coletor (resultados superiores). Já a variabilidade intermediária do método de BD c/água pode ser devido aos resultados inesperados nas amostra 4 e 6, onde o método de BD sem água acusou valores de 1,5%. Em função destes fatos considera-se o método de BD sem água como o mais confiável e simples para extração de lipídios em ostras.

O teor médio de LT encontrado na ostra desta pesquisa, por qualquer método usado, foi um pouco inferior aos valores descritos para a mesma espécie por CAÚLA (2000) (2,6%) e pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da USP (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998), que registra um teor de 1,79% para a ostra crua, *C. rhizophorae* de Natal, quantificado pelo método de Soxhlet por PEDROSA & COZZOLINO (2001). Em compensação, resultados inferiores foram encontrados por MORAIS et al. (1978) para a ostra, *C. braziliiana*, que teve média de 0,72% (0,36 – 1,10%). Diferenças entre espécies ou mesmo de métodos podem ser os fatores responsáveis pelos dados discrepantes desta pesquisa em relação aos de Moraes et al. (1978). Já, o resultado superior de CAÚLA (2000) não pode ser levado em conta porque foi analisada apenas uma amostra pelo método original de BLIGH & DYER (1959), com problemas na fase de filtração.

Embora diferenças de espécies possam explicar possíveis resultados diferentes, parece que ostras de diferentes espécies, de modo em geral, apresentam teores de lipídios baixos, variando na faixa de 1,1 a 2,5% (MURRAY & BURT, 1969), de 0,0 a 1,53% (MALTA et al., 1998) e de 1,7 – 2,1% (LINEHAN et al., 1999).

Dessa maneira, estudo comparativo dos resultados da literatura e aqueles obtidos no presente experimento, permite afirmar que os três métodos utilizados foram adequados para extração de lipídios em ostras e por ter sido resolvido o problema da demora de filtração do método original de BLIGH & DYER (1959), recomenda-se o uso do método de BD modificado sem adição de água para extração de lipídios em ostras, *C. rhizophorae*.

4.2. Relação entre os teores de lipídios extraídos pelos três métodos e a composição química.

O desempenho dos três métodos de extração também foi comparado através da soma dos teores dos nutrientes. É de conhecimento geral, que em amostra, contendo ou não carboidrato, a soma percentual dos seus componentes deve situar-se em torno 100%. Isto é mostrado através das fórmulas seguintes:

$$\Sigma (\%H_2O + \%PT + \%LT + \%CZ) \cong 100\% \quad (\text{fórmula 1})$$

$$\% CHO = 100\% - \Sigma (\%H_2O + \%PT + \%LT + \%CZ) \quad (\text{fórmula 2})$$

onde,

PT = proteína total;

LT = lipídio total;

CZ = cinza; e

CHO = carboidrato.

Estes relações foram levadas em conta nos resultados relacionados na Tabela 2.

TABELA 3 – Resultados sobre os teores de umidade, proteína, cinza, lipídios e carboidrato das seis amostras de carne de ostra, *Crassostrea rizophorae*.

Amostra	1	2	3	4	5	6	Média ± dp¹ (%)
UMIDADE	90,6	89,9	86,9	87,0	86,0	90,0	88,40 ± 1,98
PROTEÍNA	7,0	7,5	8,0	8,0	8,0	7,0	7,58 ± 0,49
CINZA	0,8	1,6	1,5	1,1	1,9	1,9	1,47 ± 0,44
TOTAL (A)	98,4	99,0	96,4	96,1	95,9	98,9	97,45 ± 1,46
LIPÍDIO SOXHLET (B)	1,5	2,3	1,3	1,3	0,9	0,9	1,37 ± 0,52
LIPÍDIO B&D c/água (C)	1,7	1,1	1,5	0,9	1,4	0,9	1,25 ± 0,33
LIPÍDIO B&D s/água (D)	1,5	1,3	1,6	1,5	1,4	1,5	1,47 ± 0,10
TOTAL (A + B)	99,9	101,3	97,7	97,4	96,8	99,8	98,82 ± 1,77
TOTAL (A + C)	100,1	100,1	97,9	97,0	97,3	99,8	98,7 ± 1,46
TOTAL (A + D)	99,9	100,3	98,0	97,6	97,3	100,4	98,92 ± 1,43
CARBOIDRATO 100 – (A + B)	0,1	-	2,3	2,6	3,2	0,2	1,68 ± 1,43
CARBOIDRATO 100 – (A + C)	-	-	2,1	3,0	2,7	0,2	2,0 ± 1,26
CARBOIDRATO 100 – (A + D)	0,1	-	2,0	2,4	2,7	-	1,80 ± 1,17

¹ dp = desvio padrão;

² Carboidrato obtido por diferença para cada método de extração de lipídios.

Verifica-se pelos dados na tabela 3, que apenas na amostra 2, o total de 100% foi excedido. Isto pode ser um reforço para os comentários realizados na secção anterior, onde possíveis presenças de fragmentos de amostra poderiam estar contribuindo para o valor elevado de 2,3% no método de Soxhlet em relação aos valores mais baixos encontrados nos métodos de Bligh & Dyer modificados. Os valores acima de 100% nas amostras 1 e 2, envolvendo o teor de LT extraído pelo método de C (c/água) acha-se dentro do limite de aceitação da variabilidade da composição química. Todavia, isto poderá ser uma falha do método ou falhas do operador, tendo em vista a previsível presença de carboidratos em ostras (MORAIS et al. (1978), LINEHAN et al., 1999; PEDROSA & COZZOLINO, 2001) ou pelos resultados das amostras em

que a soma não atingiu o teor de 100% (Tabela 3). Estes mesmos comentários podem ser feitos para o método de BD sem água, onde as amostras 2 e 6, atingiram o valor aceitável em torno de 100%, mas que levando em conta a presença de carboidratos, conduziram aos valores absurdos acima de 100%. Isto serve de alerta para futuras pesquisas, onde criteriosos controles das análises devem ser seguidas para evitar resultados inesperados. Assim fica a dúvida sobre a presença segura ou não de carboidratos na ostra analisada neste experimento.

Um resumo dos dados sobre a composição centesimal da ostra do mangue é mostrado na Tabela 4.

TABELA 4 – Composição química centesimal média da ostra, *Crassostrea rizophorae*.

Nutrientes	Valores médios
Umidade	88,40%
Proteína	7,58 %
Lipídios ¹	1,36%
Cinza	1,47%
Carboidrato ²	1,19%
Valor energético	49,56 kcal/100g

¹Valores médios referentes a média dos três métodos de extração (tabela 3)

²Teor de carboidrato obtido por diferença: (100 – soma dos outros nutrientes).

Nesta tabela, o teor médio de lipídios é o resultado do cálculo envolvendo as médias dos três métodos de extrações (tabela 3), tendo em vista a inexistência de diferenças estatísticas entre eles. Levando em conta esses resultados finais, o teor médio de carboidrato, obtido por diferença, foi próximo de 1,2%.

Em termos de umidade, a média foi superior àquela relatada para a ostra de Natal que teve 79,7%. Esta diferença contribuiu para as diferenças nos teores dos outros nutrientes registrados para a ostra de Natal (PEDROZA & COZZOLINO, 2001; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998) e para ostras de diferentes espécies do exterior (MURRAY & BURT, 1969; LINEHAN et al.,

1999). O valor mais próximo relatado foi para *C. virginica* dos Estados Unidos que teve uma faixa de 81,9 a 86,1% (MALTA et al. 1998).

A ostra pode ser considerada como um nutriente de baixo valor calórico pois seu conteúdo energético foi de cerca de 50kcal/100g de amostra, o que em termos de requerimentos para os seres humanos, numa dieta de referência de 2000kcal, contribui apenas com 2,5% das necessidades diárias.

4.3. Dados complementares sobre as ostras, *C. rhizophorae* pesquisadas.

Os dados sobre os rendimentos das partes comestíveis como um todo e do volume de água drenado durante o processo de aberturas das ostras estão mostradas na Tabela 5.

TABELA 5 – Informações sobre rendimento da parte comestível e líquido drenado de ostra, *C. rhizophorae*.

Amostra	ostras (n)	Peso total (g)	Peso médio (g)	Parte comestível		Líquido drenado	
				Peso (g)	% ^a	Volume (mL)	% ^a
1	56	1.957,82	34,9	127,39	6,5	107	5,6
2	53	1.776,73	33,5	172,95	9,7	75	4,2
3	58	2.008,17	34,6	127,01	6,3	115	5,7
4	50	2.006,91	40,0	144,71	7,2	95	4,7
5	56	2.271,87	40,6	90,95	4,0	180	7,9
6	51	1.822,05	35,7	113,75	6,2	140	7,7
		MÉDIA	36,6	129,46	6,6	118,7	6,0

^a Calculado em relação ao peso total da amostra.

Percebe-se que a parte comestível de ostra teve baixo rendimento em relação ao seu peso total. O rendimento médio foi de 6,6%.

Embora as ostras sejam consideradas organismos filtradores de água, o que se espera a presença deste nutriente dentro das valvas, mas não em quantidade tão relevante ao ponto de se aproximar em termos de volume, em torno de 6,0%, portanto próximo da parte comestível. Para padronização da metodologia de umidade em ostras, então sugere-se que o processo de drenagem ser conduzido ou não. Se for realizado, deve-se definir o tempo padrão para a drenagem ser realizada, para em seguida a amostra ser homogeneizada para as determinações químicas.

5. CONCLUSÕES

(1) Mediante resultados obtidos através dos métodos utilizados, o de BLIGH & DYER (1959) e o de SOXHLET(NAGAKURA,1972), não há diferença entre um e outro no tocante a determinação do total de lipídios presente em ostras.

(2) Em relação a padronização do método de BLIGH & DYER (1959) foi comprovado que o uso da água durante a filtração só retarda a mesma, então é melhor não utilizá-la, deixando apenas o metanol e o clorofórmio junto com a amostra no momento de filtrar a mistura, sem interferir no resultado final da extração.

(3) De acordo com a quantidade de lipídios totais encontrados na ostra, a mesma pode ser considerada uma espécie magra já que apresentou baixos teores.

(4) Quanto ao teor de proteínas a ostra apresenta baixo teor, sendo portanto, considerado como um alimento de baixo teor protéico.

(5) Considerando o baixo valor calórico recomenda-se o consumo de ostras para seres humanos que necessitam controlar suas dietas.

(6) Os resultados sobre a composição química centesimal da ostra acham-se dentro dos resultados divulgados pela literatura, mas o teor de umidade foi mais elevado quando comparados com todas essas amostras.

(7) os dados sobre rendimento da parte comestível da ostra foi muito baixo em relação ao peso total, sendo equivalente à presença de água drenada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.; RUIZ, C.; MARTIEZ, D.; MOSQUERA, G. SÁNCHEZ, J.L. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostra edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.110C, nº 2, p.109 – 118, 1995.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. HELRICH, K. (Ed.), 15th edn., Methods 920.39 & 960.39. Association of Official Analytical Chemists, 1990.

AURAND, L.W.; WOODS, A.E.; WELLS, M. R. Sampling and proximate analysis, In: _____ (Eds.), **Food Composition and Analysis**, 1987, chapter 2, p.19 – 34.

BLIGH, E.G.; DYER, W.K. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v.37, n.8, p. 911 – 917, 1959.

BROOKS, S. P.J.; RATNAYAKE, W.M.N.; LAMPI, B.J.; HOLLYWOOD, R. Measuring Total Lipid Content in Rat Carcasses: A comparison of Commonly Employed Extraction Methods. **J.Agric. Food Chem.**, v.46, p.4214-4217, 1998.

CAÚLA, F.C.B. Determinação do teor de colesterol total em pescado de água marinha e doce. Monografia (Curso de graduação em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000, 41p.

CAÚLA, F.C.B. Determinação de colesterol e avaliação nutricional de algumas espécies de pescado do Estado do Ceará. Dissertação (Curso de Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003, 127p.

CETENO, A.J. **Curso de estatística aplicada à biologia.** 2^a ed., Goiânia: Ed. Da UFB, 1999, 234p.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. **J.Biol.Chem.**; v.226, n.1, p.497-509, 1957.

HEU, M.-S.; KIM, J.-S.; SHAHIDI, F. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. **Food Chemistry**, n.82, p.235-242, 2003.

HONEYCUTT, M.E.; MCFARLAND, V.A.; MCCANT D.D.; A comparison of three lipid extraction methods. Environmental effects of dredging technical notes. Vicksburg, U.S. **Environmental Laboratory**, 6p., 1995.

JAHAN, K.; PATERSON, A.; SPICKETT, C.M. Fatty acid composition, antioxidants and lipid oxidation in chicken breasts from different production

regimes. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39,p.443-453,2004.

KARAKOLTSIDIS, P.A.; ZOTOS, A.; CONSTANTINIDES, S.M. Composition of the Commercially Important Mediterranean Finfish, Crustaceans, and Molluscs. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.8,n.3,p.258-273,1995.

KATIKOU, P.; ROBB, D.H.F. Evaluation and composition of the CEM rapid extraction method with official standard methods for the determination of lipid content in fillets of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.194, v.1-2, 99 – 105, 2001.

LEE, C.M.; TREVINO, B.; CHAIYAWAT, M. A simple, rapid solvent extraction method for determination of total lipids in fish tissue. Proceedings of the 18th Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas, august 20 – September 1, Williamsburg, Virginia, US, p. 337 – 343, 1993.

LIM, S.-Y.; PARK, W.-K.; SUZUKI, H. Analyses of Glycolipids from Fish, Shellfish, and Sea Snake Lipids by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Agric. Food Chem.**,v.47,n.3,p.960-963,1999.

LINEHAN, L.G.; O'CONNOR, T.P.; BURNELL, G. Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) . **Food Chemistry**, v. 64, n°2, p.211- 214, 1999.

MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Fatty acid composition of the total, neutral, and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Colossoma macropomum*. In: G. Charalombous (Ed.), **Food Science and Human Nutrition**, p.633 – 642, 1992.

MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; MORAES, M.A.C. Sensory and chemical avaluatin of the keeping quality of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa* in ice. **J. Food Science**, v. 48, n.4, p. 1075 – 1077, 1983.

MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B; FRANCO, M.R.B. Fatty acids of the total, neutral, and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **J. Food Comp. Anal.**, v. 7, n.4, p.240 – 251, 1994.

MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.;HOTTA, L.K. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian *Piaractus mesopotamicus*. **Int. N. Food Science Technol.**, v. 30, p. 591 – 597, 1995

MAIA, E.L.; OLIVEIRA, C.C.S.; SANTIAGO, A.P.; CUNHA, F.E.A.; HOLANDA, F.C.A.F.; SOUSA, J.A. Composição Química e Classes de Lipídios em água Doce Curimatã Comum, *Prochilodus cearensis*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas,v.19,n.3,p.433-437, set/dez 1999

MALTA, M.B.; SALAZAR, S.; MILL, L.; GRAY, G.; LINSE, J.; PERONARD, P.; FRONCENDESE, L. LCP Chemical Site Monitoring Study. Seattle, Washington. August, **NOAA Technical Memorandum NOS OR&R 5**, 148p, 1998.

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**, v.14,n.1,p.93-100, 2001.

MATHEW, S.; AMMU, K.; NAIR, P.G.V.; DEVADASAN, K. Cholesterol content of Indian fish and shellfish. **Food Chemistry**, v.66, p.455-461,1999.

MIZAEL, F.H Alterações físico-químicas no camarão mantido em solução salina resfriada. Dissertação (Curso de Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000, 82p.

MONTEGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments.** New York: Institute of Technology, 1976, 418p.

MORAIS, C. de; FIGUEIREDO, I.B.; ANGELUCCI, E. & KAI, M. Contribuição ao estudo da ostra de cultivo de Cananéia: composição química aproximada. **Boletim do ITAL**, v.56, p.115-128, 1978.

MOURA, A.F.P.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J.; TENUTA FILHO, A. Caracterização da fração lipídica de amostras comerciais de camarão-rosa. **Arch. Latinoameric.Nutrición**, v.52, n.2, s.2, 7p, 2002.

MURRAY, J.; BURT, J.R. **The composition of fish.** Torry Research Station, Torry Advisory Note nº36, 14p., 1969.

NAGAKURA, K. General analysis. In: OKADA, M.; HIRAO, S.; NOGUCHI, E.; SUZUKI, T.; YOKOSEKI, M. (Eds.), *Utilization of marine products*, Tokyo, Japan. Overseas Technical Cooperation Agency, p.159 – 169, 1972.

OLIVEIRA de, S.L.C.L. Estudo dos constituintes lipídicos em peixes do Ceará. Dissertação (Curso de Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999 117p.

ORBAN, E.; LENA, G.D.; NEVIGATO, T.; CASINI,I.; MARZETTI, A.; CAPRONI, R. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites.**Food Chemistry**, n.77, p.57-65,2002.

PAZOS, A. J.; RUÍZ, C.; MARTÍN, O.G.; ABAD, M.; SÁNCHEZ, J.L. Seasonal Variations of Lipid Content and Fatty Acid Composition of *Crassostrea gigas* Cultured in El Grove, Galicia, N.W.Spain. **Comp.Biochem.Physiol.**,v.114B, n.2, p.171-179,1996.

PEARSON, D. *Laboratory techniques in food analysis*. John Wiley & Sons, New York, p.27 – 77, 1973.

PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciê. Tecnol Aliment.**, v.21, n.2, p.154 – 157, 2001.

RONALD, B. J.; BARNETT, H.J. Determination of fat content in fish feed by supercritical fluid extraction and subsequent lipid classification of extract by thin layer chromatography-flame ionization detection. **AQUACULTURE**, v.03, n.216, p.1-4, p.263 – 282, 2003.

SINANOGLOU, V.J.; MINIADIS-MEIMAROGLOU, S.M. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. **Food Research Internacional**, v.31, n.6-7, p.467-473, 1998.

SKONBERG, D.I.; PERKINS, B.L. Nutrient composition of green crab (*Carcinus maenus*) leg meat and claw meat. **Food Chemistry**, v.77, n.4, p.401-404, 2002.

SOUDANT, P.; RYCKEGHEM, K.V.; MARTY, Y.; MOAL, J.; SAMAIN, J.F.; SORGELLOS, P. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.123-B, n.2, p.209-222, 1999.

TREVINO, B.; LEE, C.M. Factors affecting solvent extraction efficiency in fish lipid analysis. Proceedings of the 15th Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas. December 2 – 5, Orlando, Florida, US, p.134 – 140, 1990.

UNDELAND, I.; MAGNUS 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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (1998) Tabela de Composição de Alimentos – USP. Versão 4.0. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela> Acesso em: 22/11/2004.

UNO, S.; HYUN, Y.J.; KANENIWA, M.; KOYAMA, J.; YAMADA, H.; IKEDA, K. Lipid class and fatty acid composition of mussel, *Mytilus trossulis*, in Vancouver Harbour. **Pices Scientific Report**, n.16, p.43-47, 2001.

VOGT, A.; GORMLEY, T.R.; DOWNEY, G.; SOMERS, J. A Comparison of Selected Rapid Methods for Fat Measurement in Fresh Herring (*Clupea harengus*). **JFCA**, v.15, n.2, p. 205 – 215, 2002.