

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM CONCENTRADO DE TOCOFEROIS-
(VITAMINA E) A PARTIR DO DESTILAMENTO DA DESODORIZAÇÃO -
DO ÓLEO DE SOJA.

08/88

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM CONCENTRADO DE TOCOFEROIS-
(VITAMINA E) A PARTIR DO DESTILAMENTO DA DESODORIZAÇÃO -
DO ÓLEO DE SOJA.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Paucer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Marta Maria Marquezan Augusto e aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de maio de 1988.

Campinas, 06 de maio de 1988.

Querna?

Presidente da Banca

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM CONCENTRADO DE TOCOFERÓIS (VITAMINA E) A PARTIR DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA.

Marta Maria Marquezan Augusto
Químico

Orientador:

Prof. Dr. Emilio ^{S.} Contreras Guzman

Contreras Guzman, Emilio S. t. OK

Tese apresentada para obter o título de Mestre em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

Campinas, SP - BRASIL

1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao Walter e a Tássia
com amor pela compreen
são e incentivo.

À minha mãe e irmãos.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Professor Dr. Emilio Contreras Guzman pela sua orientação, dedicação e apoio na execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. L. E. S. Baratta, pela ajuda na realização das análises de H.P.L.C..

Aos Professores Dr. Jaime Amaya-Farfan, Dr. Walter Esteves, Dra. Lireny e Dr. Waldemiro Sgarbieri, pelo auxílio no empréstimo de aparelhos de laboratório e reagentes.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Química da Fundação Universidade do Rio Grande, RS, pelas facilidades concedidas.

Ao pessoal do Laboratório, Judite e Maria pela colaboração.

À Regina e Maura B. Franco, Mariza Modernell, Prof^a. Débora Tavares pelo apoio e amizade e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação - ABIA, pelos subsídios de cópias do trabalho.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE QUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Importância da soja no Brasil	3
2.2. Composição do óleo de soja	6
2.3. Refinamento do óleo de soja	10
2.4. Composição do destilado da desodorização do óleo de soja	14
2.5. Tocoferóis e tocotrienóis	17
2.5.1. Estrutura e funções biológicas dos toco feróis e tocotrienóis	17
2.5.2. Características físicas, químicas e usos dos tocoferóis	20
2.5.3. Análise de tocoferóis	22
2.5.3.1. Extração	23
2.5.3.2. Purificação	24
2.5.3.3. Métodos espectrofotométricos .	26
2.5.3.4. Métodos cromatográficos	29
2.5.3.5. Métodos eletroquímicos	31
2.5.3.6. Métodos biológicos	31
2.6. Obtenção de concentrados de tocoferóis	32
2.7. Considerações sobre extração líquido-líquido .	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Matéria prima	39
3.2. Caracterização da matéria prima	39
3.2.1. Determinação do peso específico	39
3.2.2. Determinação do índice de peróxidos ...	40
3.2.3. Determinação do índice de acidez	40
3.2.4. Determinação de sólidos totais	40

3.2.5.	Determinação de ácidos graxos totais e matéria insaponificável	40
3.2.6.	Determinação de matéria insaponificá- vel.....	41
3.2.7.	Determinação de ácidos graxos livres .	41
3.2.8.	Determinação de ácidos graxos totais por cromatografia em fase gasosa	42
3.2.9.	Determinação de ácidos graxos livres por cromatografia em fase gasosa	43
3.2.10.	Determinação de tocoferóis totais	43
3.2.11.	Determinação de alfa-tocoferol e toco- feróis individuais	44
3.2.12.	Determinação de esteróis totais	44
3.2.13.	Determinação de esteróis por cromato- grafia em fase gasosa	45
3.2.14.	Determinação de hidrocarbonetos	46
3.3.	Análise da matéria insaponificável	47
3.4.	Processos de obtenção do concentrado de tocofe- róis	49
3.4.1.	Estudos da extração de impurezas com solventes hidrofílicos	49
3.4.1.1.	Efeito da concentração do sol- vente	51
3.4.2.	Estudos da partição do DDOS com hexano e etanol a diferentes graus de hidrata- ção	52
3.4.2.1.	Misturas hidroetanólicas a se- rem usadas nos sistema com he- xano	52
3.4.2.2.	Efeito da adição de hidróxido de potássio no comportamento da partição com hexano e os solventes hidrofílicos	54
3.4.2.3.	Monitoramento das extrações ..	54
3.4.2.4.	Parâmetros de avaliação da efe	

	<u>Página</u>
tividade das partições	54
3.4.2.5. Caracterização do concentrado de tocoferóis	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Caracterização da matéria prima	57
4.2. Composição de matéria prima	58
4.2.1. Composição do DDOS em ácidos graxos ..	59
4.2.2. Composição dos tocoferóis individuais do DDOS.....	62
4.2.3. Composição do DDOS em esteróis livres.	66
4.3. Composição da matéria insaponificável do DDOS	67
4.4. Estudos de purificação de tocoferóis do DDOS por extração com solventes	68
4.4.1. Extração de impurezas do DDOS com metanol	70
4.4.2. Extração de impurezas do DDOS com acetona	74
4.4.3. Extração de impurezas do DDOS com etanol	77
4.4.4. Extração de tocoferóis do DDOS por partição líquido-líquido	83
4.4.4.1. Caracterização do extrato obtido nas condições de eficiência máxima nos ensaios com 4,76 g de DDOS iniciais para diferentes relações hexano/ /etanol	95
4.4.4.2. Influência da relação entre hexano e etanol	96
5. CONCLUSÕES	107
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

ÍNDICE DE QUADROS

	<u>Página</u>
1. PRODUÇÃO NACIONAL DE SOJA NAS SAFRAS DE 1979 e 1986 ..	4
2. PRODUTOS BÁSICOS, SEMI-MANUFATURADOS E MANUFATURA- DOS DE SOJA QUE FORAM EXPORTADOS NOS PERÍODOS DE 1983 a 1986	5
3. COMPOSIÇÃO PORCENTUAL E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS TÍPI- CAS DO ÓLEO DE SOJA BRUTO	9
4. COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE SOJA EM TOCOFERÓIS, ESTERÓIS E ES- QUALENO NAS DIFERENTES ETAPAS DE SEU REFINAMENTO	13
5. COMPOSTOS VOLÁTEIS, TÍPICOS DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA E SUA RELAÇÃO COM O ODOR	15
6. COMPONENTES PRINCIPAIS DO DDOS DETERMINADOS POR VÁRIOS AUTORES	16
7. PROPORÇÕES SOLVENTE:ÁGUA NOS SISTEMAS USADOS PARA REDU- ÇÃO DE IMPUREZAS POR DISSOLUÇÃO SELETIVA	51
8. RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE TESTADAS PARA SEPARAÇÃO POR DISSOLUÇÃO SELETIVA DOS COMPOSTOS DO DDOS	51
9. PROPORÇÕES DDOS E HEXANO USADAS NO PREPARO DAS SOLU- ÇÕES-BASE DE DDOS	52
10. SOLUÇÕES HIDROETANÓLICAS TESTADAS NA OBTENÇÃO DO CON- CENTRADO DE TOCOFERÓIS	53
11. RELAÇÕES DDOS/ETANOL AQUOSO (D/E) E HEXANO/ETANOL AQUO- SO (H/E) NAS PARTIÇÕES PARA PURIFICAÇÃO DE TOCOFERÓIS DO DDOS	53
12. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO DDOS	57
13. COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DO DDOS	58
14. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO DDOS COMPARADO COM A COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE SOJA	59
15. COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DE TOCOFERÓIS DO DDOS	66
16. COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DE ESTERÓIS DO DDOS	66
17. COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO DDOS	67
18. RENDIMENTO DE SÓLIDOS E TOCOFERÓIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM METANOL 80% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO	

METANÓLICA.....	71
19. RENDIMENTO DE SÓLIDOS E TOCOFERÓIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM METANOL 85% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO METANÓLICA	72
20. RENDIMENTO DE SÓLIDOS E TOCOFERÓIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM METANOL 90% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO METANÓLICA	72
21. RENDIMENTO DE SÓLIDOS E TOCOFERÓIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM METANOL 95% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO METANÓLICA	73
22. SELETIVIDADE RELATIVA DAS EXTRAÇÕES DO DDOS COM METANOL HIDRATADO EM DIFERENTES PROPORÇÕES	73
23. RENDIMENTO DE SÓLIDOS E TOCOFERÓIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM ACETONA 85% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO ACETÔNICA	76
24. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM ACETONA 80% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO ACETÔNICA	76
25. SELETIVIDADE RELATIVA DA ACETONA DURANTE A EXTRAÇÃO DO DDOS EM DIFERENTES RELAÇÕES DDOS/SOLVENTE	77
26. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM ETANOL 90% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO ETANÓLICA	78
27. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM ETANOL 85% (P/V), EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO ETANÓLICA	78
28. RENDIMENTOS TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS A EXTRAÇÃO DO DDOS COM ETANOL 80% (P/V), EM DIFERENTES	

RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE - ANÁLISES REALIZADAS NA CAMADA NÃO ETANÓLICA	79
29. SELETIVIDADE RELATIVA DO ETANOL DURANTE A EXTRAÇÃO DO DDOS EM DIFERENTES RELAÇÕES DDOS/SOLVENTE	79
30. COMPARAÇÃO ENTRE EXTRAÇÃO DE TOCOFERÓIS DO DDOS EM UM SISTEMA DE HEXANO/ETANOL, 1% KOH (OH) E NO MESMO SISTEMA SEM ÁLCALI (N)	84
31. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS PARTIÇÃO DE 4,76 g DE DDOS COM ETANOL 80% e 1% DE KOH	85
32. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS PARTIÇÃO DE 4,76 g DE DDOS COM ETANOL 75% e 1% DE KOH	85
33. RENDIMENTOS TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS A PARTIÇÃO DO DDOS COM HEXANO E ETANOL 70% e 1% KOH	86
34. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS PARTIÇÃO DO DDOS ENTRE HEXANO E ETANOL 65% e 1% KOH ..	86
35. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS PARTIÇÃO DO DDOS ENTRE HEXANO E ETANOL 60% e 1% KOH ..	87
36. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS PARTIÇÃO DO DDOS ENTRE HEXANO E ETANOL 55% e 1% DE KOH	87
37. RENDIMENTOS TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS APÓS A PARTIÇÃO DO DDOS ENTRE HEXANO E ETANOL 50% e 1% KOH ...	88
38. COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO, OBTIDO NAS CONDIÇÕES DE MÁXIMA EFICIÊNCIA NOS ENSAIOS USANDO 4,76 g DE DDOS NA PARTIÇÃO COM ETANOL 55% e KOH, COM A COMPOSIÇÃO DO DDOS ORIGINAL	95
39. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS NA SEPARAÇÃO DE 3,77 g DO DDOS EM SISTEMA DE HEXANO E 70% ETANOL ALCALINO	98
40. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS NA SEPARAÇÃO DE 3,77 g DO DDOS EM SISTEMA HEXANO E 55% ETANOL ALCALINO	98
41. RENDIMENTOS TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS NA SEPARAÇÃO DE 3,77 g DE DDOS EM SISTEMA HEXANO E 50% ETANOL ALCALINO	99
42. RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS NA SEPARA	

	ÇÃO DE 7,42 g E 7,23 g DE DDOS EM SISTEMAS DE HEXA- NO E 70% ETANOL ALCALINO	99
43.	RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS NA SEPARA- ÇÃO DE 7,42 g E 7,23 g DE DDOS EM SISTEMAS DE HEXA- NO E 55% ETANOL ALCALINO	100
44.	RENDIMENTO DE TOCOFERÓIS E SÓLIDOS TOTAIS NA SEPARA- ÇÃO DE 7,42 g E 7,23 g DE DDOS EM SISTEMAS DE HEXA- NO E 50% ETANOL ALCALINO	100
45.	COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO, OBTIDO NAS CON- DIÇÕES DE MÁXIMA EFICIÊNCIA EM EXPERIMENTOS USANDO 3,77 g DE DDOS NA PARTIÇÃO COM ETANOL 50% COM KOH, COM A COMPOSIÇÃO DO DDOS ORIGINAL	104

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO GERAL PARA A ANÁLISE DO DDOS CRU E DO MATERIAL INSAPONIFICÁVEL DO MESMO PRODUTO	48
2. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO PARA A OBTENÇÃO DE UM CONCENTRADO DE TOCOFERÓIS POR EXTRAÇÃO COM SOLVENTES	50
3. CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS DO DDOS	60
4. CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DO DDOS	61
5. SEPARAÇÃO DOS TOCOFERÓIS DO DDOS, SEM PROCESSAMENTO, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	63
6. SEPARAÇÃO DE UMA MISTURA PADRÃO DE ESTERÓIS, POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA	64
7. SEPARAÇÃO DOS ESTERÓIS DO DDOS, POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA	65
8. CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DE TOCOFERÓIS QUE RESULTARIA DE EXTRAIR OS TOCOFERÓIS TOTAIS (A), ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (B), ESTERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (C), TODOS OS ÁCIDOS GRAXOS (D) E OS ESTERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS(E)	69
9. EFICIÊNCIA DA PURIFICAÇÃO DE TOCOFERÓIS DO DDOS COM METANOL DESDE 80 A 95% E DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE	75
10. EFICIÊNCIA DA PURIFICAÇÃO DE TOCOFERÓIS DO DDOS POR EXTRAÇÃO COM ETANOL 80, 85 e 90% EM DIFERENTES RELAÇÕES SOLUTO/SOLVENTE	80
11. SOLUBILIDADE DO DDOS EM ETANOL E METANOL HIDRATADOS A DIFERENTES PERCENTAGENS E USADOS EM RELAÇÕES DDOS/SOLVENTE DESDE 0,08 ATÉ 0,4	81
12. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DE TOCOFERÓIS DO DDOS EM SISTEMAS DE HEXANO E ETANOL 70% COM E SEM ADIÇÃO DE KOH	82
13. COMPORTAMENTO DO ETANOL ALCALINO (1,0% KOH) HIDRATADO A DIFERENTES PORCENTAGENS NA EXTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS DO DDOS NO SISTEMA HEXANO/ETANOL	89
14. COMPARAÇÃO DA SELETIVIDADE DE PURIFICAÇÃO DO DDOS NOS SISTEMAS HEXANO/ETANOL ALCALINO PARA CONCENTRAÇÕES DE ETANOL DESDE 50 ATÉ 80%	91

15. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA PURIFICAÇÃO DE TOCOFERÓIS NOS SISTEMAS HEXANO/ETANOL ALCALINO DESDE 50 A 80% ..	92
16. COMPARAÇÃO ENTRE O AUMENTO DE CONCENTRAÇÃO DE TOCOFERÓIS OBTIDOS COM OS SISTEMAS DE PARTIÇÃO DE HEXANO/ETANOL ALCALINO, VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DESDE 50 A 80%	93
17. COMPARAÇÃO ENTRE AS PORCENTAGENS DE TOCOFERÓIS OBTIDOS NA CAMADA HEXÂNICA APÓS EXTRAÇÃO DO DDOS COM ETANOL 50, 55, 60 e 70% E OS VALORES IDEAIS CORRESPONDENTES DOS MESMOS TEORES DE SÓLIDOS REMOVIDOS	94
18. CROMATOGRAMA DOS TOCOFERÓIS DO EXTRATO OBTIDO NA PARTIÇÃO DO DDOS ENTRE HEXANO E ETANOL 55% COM 1% DE KOH, NA RELAÇÃO 0,13	97
19. INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO HEXANO/ETANOL NA EFICIÊNCIA DE PURIFICAÇÃO DE TOCOFERÓIS EM 3,77 g E 7,23 g DE DDOS SUBMETIDOS A EXTRAÇÃO	102
20. INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO HEXANO/ETANOL NA EFICIÊNCIA DE PURIFICAÇÃO DE TOCOFERÓIS PARA 3,77 g E 4,76 g DE DDOS SUBMETIDOS A EXTRAÇÃO	103
21. CROMATOGRAMA DOS TOCOFERÓIS DO EXTRATO OBTIDO NA PARTIÇÃO DO DDOS ENTRE HEXANO E ETANOL 50% COM 1% DE KOH, NA RELAÇÃO 0,13	105

R E S U M O

A presente pesquisa relata a composição química, características físicas e possibilidades de purificação dos tocoferóis (vitamina E) contidos no destilado da desodorização de óleo de soja (DDOS), resíduo líquido obtido no processo de refino.

As análises pormenorizadas revelaram que o DDOS contém em torno de 60% de ácidos graxos totais dos quais 36,46% existem na forma livre. Nesta fração o ácido palmítico é o componente principal, enquanto que na fração esterificada o ácido mais abundante é o linoléico.

Quantitativamente importante também, são os esteróis que perfazem 17,05% do DDOS. A fração de esteróis é composta por 54,70% de β -sitosterol, 20,85% de estigmasterol e 24,45% de campesterol.

Os tocoferóis perfazem 8,50% do DDOS sendo formados por 13,4% de α -tocoferol, 53,3% de γ -tocoferol, 30,8% de δ -tocoferol e 2,5% de β -tocoferol.

Outras substâncias determinadas foram os hidrocarbonetos totais que perfazem 4,4% do DDOS.

Os tocoferóis são os compostos de maior interesse comercial, portanto, os ensaios de purificação se destinaram inicialmente à eliminação de ácidos graxos.

Foram pesquisadas as seguintes alternativas:

- a) Agitação direta do DDOS com metanol, etanol e acetona, adicionadas com água em porcentagens variáveis, à fim de forçar a separação das fases. O grau de hidratação dos solventes e a relação DDOS/solvente foram as variáveis

dos sistemas, enquanto que a determinação do rendimento e do aumento de concentração dos tocoferóis foram os critérios de seleção e eficácia das extrações.

De um modo geral as extrações foram pouco seletivas, sendo menos eficiente o sistema de metanol 85% usado na relação 0,08 (DDOS/solvente), com o qual a concentração de tocoferóis aumentou de 8,5% para 10,56%.

- b) A segunda alternativa foi a inclusão de hexano nos sistemas aquosos de metanol, etanol e acetona a fim de produzir uma divisão entre fases polares e não polares. Os ensaios não apresentaram aumento de seletividade em relação aos sistemas sem hexano, pelo contrário com os álcoois mais diluídos a seletividade diminui.
- c) A terceira alternativa consistiu na adição de pequenas quantidades de álcali nos sistemas mencionados em (b). A inclusão de 1% de KOH na fase hidrofílica melhorou notavelmente a seletividade dos sistemas alcoólicos causando um aumento dos tocoferóis acima de 70% na fase hexana. A eficiência e seletividade máxima foram obtidas com etanol 50% na relação 0,13 (DDOS/solvente).

A partição com etanol alcalino extraiu cerca de 97% dos ácidos graxos livres iniciais, causando um acréscimo de 84,4% na concentração de tocoferóis. Também foram eliminados ácidos graxos esterificados, provavelmente na forma de mono e diglicerídios. Houve perdas mínimas de tocoferóis na camada alcalina. De modo que, verificou-se uma concentração de alta eficiência.

- d) Outra alternativa para redução das impurezas consistiu na saponificação total do DDOS e recuperação dos tocoferóis na fração insaponificável. O processo demonstrou ser pouco operativo, requerer muito solvente e causa oxí

dação dos tocoferóis.

Finalmente cabe ressaltar que a partição líquido-líquido do DDOS entre hexano e etanol alcalino, é uma operação rápida e simples, realizada à temperatura ambiente e portanto pouco deteriorante dos tocoferóis e cumpre com os objetivos de pré-purificar a matéria prima original removendo quase por completo os ácidos graxos do DDOS.

S U M M A R Y

This research reports the chemical composition, physical characteristics and possible methods for purification of tocopherols (vitamin E) contained in the distillate from soybean oil deodorization (DDOS), a liquid by product from the oil refining.

Chemical analysis revealed that DDOS is composed by approximately 60% of total fatty acids, being 36,46% in the free form. This fraction shows a high percentage of palmitic acid, whereas the esterified fraction is higher in linoleic acid.

Importance are also given to the sterols that built 17,05% of DDOS. The sterol fraction was made of 54,70% of β -sitosterol, 20,85% stigmasterol and 24,45% campesterol.

Tocopherols built 8,5% of DDOS being 13,40% of α -tocopherol, 53,3% of γ -tocopherol, 30,8% of δ -tocopherol and 2,5% of β -tocopherol.

DDOS was made up by 4,4% of hydrocarbons and 10% of minor components as carotenoids, mono and di-glycerides, plastoquinones, etc.

Tocopherols represent the most valuable commercial fraction in DDOS; therefore, the initial assays were performed to remove fatty acids through the following alternative methods.

- a) Direct mixing of DDOS with methanol, ethanol and acetone in a different water contents to produce layers separation. Hydration level and the ratio DDOS/solvent were the system variables and the selectivity and efficiency criteria were measured by the increase of concentration and yield of tocopherols. Extraction in

general were not selective, although 85% methanol in a 0,08 DDOS/solvent showed an increase in tocopherol concentration from 8,5% to 10,58%.

- b) The second method was the addition of hexane to the aqueous systems of methanol, ethanol and acetona to induce a real partition between polar and non-polar phases. Assays showed no selectivity improvements; on the contrary, a decrease was observed when diluted alcohols were used.
- c) On the third method, small amounts of hydroxides were added to systems mentioned in "b". Inclusion of 1% KOH in the hydrophilic phase clearly improved the removal of fatty acids in the aqueous layer, promoting a tocopherol increase in more than 70% in the hexanic layer. The maximum selectivity and recovery of tocopherols was obtained with 50% ethanol - 1% KOH in a 0,13 (DDOS/solvent ratio). Hexanic extracts resulting from alkaline ethanol partitions were analysed showing that 97% of the initial free fatty acids had been removed and this event caused an 84,4% increase of tocopherols concentration. Some esterified fatty acids were also removed, probably as mono and di-glycerides. Despite some minimum losses of tocopherol in the alkaline layer, this concentration was carried out with high yields.
- d) Another procedure to remove fatty acids consisted in the complete saponification of DDOS and subsequent recovery of tocopherols in the unsaponifiable fraction. This process was not advantageous because it consumed high amount of solvent and promoted some tocopherol oxidation.

Finally it has to be pointed out that partition of DDOS between hexane and alkaline ethanol is a simple and fast

1. INTRODUÇÃO

Os tocoferóis, compostos quimicamente relacionados ao cromanol, são de grande importância na nutrição humana e animal por apresentar atividade vitamínica, comumente denominados de Vitamina E. Estes compostos são de interesse em ciência e tecnologia de alimentos por sua ação antioxidante e também encontram aplicabilidade industrial em farmácia e, em cosméticos. Suas peculiaridades fazem que estes compostos mereçam a atenção científica e tecnológica como fica evidenciado pela crescente bibliografia.

Uma das fontes de vitamina E, com potencial industrial aproveitável, é um dos resíduos da indústria de óleo de soja: o destilado da desodorização, onde os tocoferóis perfazem em torno de 10% do peso total do resíduo.

Para produzir óleo comestível de soja é necessário eliminar alguns componentes responsáveis por odores e sabores desagradáveis; com esta finalidade o processo de desodorização é o mais usado. Após este processo se obtém um óleo de sabor neutro e um resíduo oleoso que representa entre 0,1 e 0,4% do peso do óleo original.

Considerando a produção nacional com uma média anual de 16 milhões de toneladas de soja, produziriam-se se empregados para extração de óleo, aproximadamente 4.000 t de tocoferóis a partir do resíduo da desodorização, quantidade essa que ajudaria na demanda interna dos produtos de vitamina E e derivados; amenizando, dessa forma, o total da alíquota de sua importação (124,7 t), que representa aproximadamente dois milhões de dólares (CACEX 1984b, 1986b). Este quadro favorável é referendado pela capacidade instalada no parque industrial de aproximadamente 94.000 t/dia de processamento de soja (AUGUSTO-RUIZ, 1985).

A importação de vitamina E e derivados, principalmente do mercado Europeu, tem aumentado consideravelmente nos últimos

anos. Esses produtos geralmente são adquiridos na forma sintética e, em menor quantidade como concentrado natural de tocoferóis.

Na indústria de alimentos o uso de antioxidantes sintéticos é regulamentado por órgãos internacionais como a OMS e a FDA. No Brasil, o INAN, recomenda usar antioxidantes naturais no programa nacional de merenda escolar. Esses fatos alertam para a urgência na adaptação de tecnologias para a melhor utilização dos recursos disponíveis que ora não estão sendo devidamente aproveitados.

A partir do subproduto cru "DDOS" (Destilado da Desodorização do Óleo de Soja) visa-se obter extratos semi-purificados mediante métodos químicos e físicos como alternativa para eliminar substâncias acompanhantes, principalmente ácidos graxos livres.

Com estas técnicas, se pretende atingir um primeiro grau de purificação, eliminando compostos que por existir em quantidades muito elevadas, dificultam os processamentos usados convencionalmente para concentração e purificação de vitamina E.

Para tanto esta pesquisa pretende abordar os seguintes aspectos:

- a) Aplicação de uma sequência de métodos analíticos para conhecer a composição dos DDOS típicos. Tal metodologia deverá permitir a determinação de alfa, beta, gama e delta-tocoferóis, de esteróis vegetais, de ácidos graxos individuais livres e esterificados e de outros compostos lipídicos de menor importância.
- b) Estudo do potencial de extração seletiva das impurezas com diversos solventes de uso comum.
- c) Estudo das perspectivas da saponificação na redução ou eliminação de impurezas.
- d) Emprego de sistemas de solventes, polares e não polares, na redução de impurezas específicas e no grau de concentração dos tocoferóis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DA SOJA NO BRASIL

A soja é reportada ter-se originado no leste Asiático. Os primeiros registros sobre o uso da soja na alimentação humana da ta de 2.838 anos A.C sendo seu nome derivado do vocábulo chinês "Chiang-yiu", porém encontram-se mais de 50 nomes diferentes para esta leguminosa (SMITH & CIRCLE, 1978).

A introdução da soja no Brasil data do século passado, sua exploração industrial tem-se acentuado nos últimos anos atingindo 8,5 milhões de hectáres (AUGUSTO-RUIZ, 1985), o que representa mais de 3% da área mundial desta cultura (HORAN, 1974); os es tados do Paraná e Rio Grande do Sul são os de maior expressividade na produção nacional desta leguminosa (CARVALHO, 1984).

Na década de 70, o setor agrícola brasileiro experimentou grande desenvolvimento, particularmente a cultura de soja (CARVALHO, 1984). Diversos fatores contribuíram para esse quadro favorável, mencionando-se as condições do mercado interno e externo, alternância com outras culturas, capitalização das empresas agrícolas, apoio à pesquisa e assistência técnica (AUGUSTO - RUIZ, 1985). É interessante notar que enquanto as culturas industriais se expandiam, em virtude do mercado de exportação, reduziam-se a oferta de alimentos tradicionais; por exemplo, a produção per-capita de alimentos básicos apresentou uma diminuição de 13% no período 77/84, enquanto que as culturas de exportação, entre elas a soja, aumentaram em 19%.

A produção nacional de soja no período das safras 79/86, se gundo dados estatísticos (ANON, 1986), apresentados no Quadro 1, demonstra que houve uma diminuição de aproximadamente 28% devido, principalmente, à queda do seu preço no mercado internacional (CA CEX, 1986a).

Apesar da redução observada na comercialização externa dos produtos básicos, como a soja e o café, o valor total das exportações, neste ítem, no ano de 1986, superou ligeiramente o valor exportado em 1985 (CACEX, 1986a). O farelo de soja ocupou o segundo lugar dos produtos básicos de exportação durante o período de janeiro a outubro de 1986 contribuindo com 5,8% do total e uma receita de 204 milhões de dólares a mais comparado com o mesmo período de 1985 (CACEX, 1986a).

QUADRO 1. Produção Nacional de soja nas safras de 1979 a 1986

Ano	Produção (1000 t)	Contribuição do total das oleaginosas, (%)
79/80	14.887,4	88,4
80/81	15.484,8	89,9
81/82	12.890,8	87,3
82/83	14.533,8	90,3
83/84	15.337,7	89,7
84/85	18.211,5	87,7
85/86	13.156,1	87,7
86/87 *	15.786,4	----

Fonte: ANON, 1986.

* Estimativa feita em outubro de 1986.

Os produtos de soja exportados nos períodos de 1983 a 1986 estão registrados no Quadro 2. (CACEX, 1984a, 1986a).

QUADRO 2. Produtos básicos, semimanufaturados e manufaturados de soja que foram exportados nos períodos de 1983 a 1986.

Produtos	Exportação (1.000 t)			
	1986	1985	1984	1983
Farelo de soja	6.004	6.537	7.027	7.958
Soja em grão	1.196	3.472	1.564	1.295
Óleo de soja bruto	188	401	790	308
Óleo de soja refinado	155	349	89	695
Total	7.543	10.839	9.470	10.256

Fonte: CACEX, 1984a, 1986a.

A soja assumiu um proeminente papel dentre as oleaginosas, não somente como fonte rica em proteínas (30 a 46%), mas também pelo seu teor em óleo comestível; isto se evidenciou a partir da publicação do relatório das Nações Unidas referente à crise mundial de proteínas (LIENER, 1978).

A principal contribuição da soja na nutrição humana, se relaciona com o teor e a qualidade de sua proteína, teor de óleo, carboidratos, vitaminas e minerais; estes últimos são nutrientes que podem ser decisivos em condições onde esses nutrientes sejam limitantes. Energéticamente contribui com 14,54 Kj/g de proteína, 35,97 Kj/g de óleo e 7,04 Kj/g de carboidratos digestíveis (LIENER, 1978).

As maiores fontes comerciais de óleos comestíveis de origem vegetal, são as plantas anuais como a soja, algodão, amendoim entre outros e as plantas perenes como oliveira e palmáceas (SWERN, 1964). Dentre estas a de maior representatividade é a soja, sendo que, aproximadamente se produzem anualmente no Brasil 2,3 milhões de toneladas de óleo a partir desta leguminosa (BARATA & CONTRERAS, 1984). O parque industrial da soja no Brasil, conta com uma ca

pacidade instalada de aproximadamente 94.000 t/dia de processamento de soja o qual representa 92,2% da produção nacional de óleo comestível (CARVALHO, 1984).

2.2. COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE SOJA

Os óleos e gorduras são constituídos principalmente de ésteres de glicerol, denominados glicerídios e, em menor quantidade de uma fração não-glicerídica (SWERN, 1964). Uma classificação usada para estas substâncias tem como base o número de iodo classificando-as em não secantes, semi-secantes e secantes se seu número de iodo for baixo, médio ou alto respectivamente. Essa classificação pode ser substituída por outra que toma por base seus constituintes: os ácidos graxos, classificando-as em 10 grupos:

1. Grupo da gordura do leite, predomina o ácido butírico
2. Grupo de ácido láurico, característico das palmáceas, onde atinge 40 a 50%
3. Grupo da manteiga vegetal, ricos em ácidos graxos saturados, com C14 a C18, característicos na manteiga de cacau
4. Grupo das gorduras animais, ricos em C16 e C18, característicos dos sebos animais
5. Grupo dos ácidos oléico-linoléico, todos de origem vegetal, predominando C18:1 e C18:2, sendo que o C18:3n-3 quase é inexistente, característicos de algodão, amendoim, milho, girasol, oliva e palma
6. Grupo do ácido linolênico, este ácido é considerado secante, característico da soja e linho
7. Grupo dos ácidos conjugados como eleosteárico (C18:3 cis-cis trans) característico do óleo de tungue
8. Grupo do ácido erúcico, característico da mostarda e colza onde perfazem 40 a 50%
9. Grupo dos óleos marinhos, apresentam alto teor de ácidos saturados e insaturados C16, C18, C20 e C22 altamente poliinsaturados
10. Grupo dos hidroxi-ácidos, glicerídios do ácido ricinoléico (12-hidroxi-octadecenóico), característico do óleo de mamona.

Os óleos vegetais não refinados contém, em média, 5% do material não-glicerídico; este material está constituído principalmente por:

1. Fosfatídios como lecitinas e cefalinas, Agem como sinergistas dos tocoferóis;
2. Esteróis, principalmente beta-sitosterol, estigmaesterol, gamma-sitosterol e campesterol;
3. Álcoois graxos: encontram-se combinados como ácidos graxos e ceras;
4. Hidrocarbonetos como o esqualeno;
5. Carotenos, principalmente beta-caroteno;
6. Clorofilas;
7. Tocoferóis, alfa, beta, gama e delta-tocoferol. Principais compostos antioxidantes;
8. Outros antioxidantes, como a sesamolina do óleo de sésamo, gossipol do óleo de algodão. São glucosídios de compostos fenólicos;
9. Compostos odoríferos, próprios ou derivados da ação hidrolítica. Principalmente cetonas com Cl₂, terpenóides e metiletilcetonas;
10. Vitaminas lipossolúveis pró-vitamina A, E e D;
11. Minerais, principalmente fósforo, sódio, cobre (0,1 a 0,3 ppm), manganês (0,1 a 0,7 ppm), ferro (1 a 5 ppm) e níquel (0,1 a 0,2 ppm).

O óleo de soja é obtido industrialmente por extração com solventes lipofílicos. O hexano é um excelente solvente de triglicerídios e outros lipídios. Tem-se experimentado, com algum sucesso, outros solventes como misturas dos álcoois metílico, etílico, isopropílico, propílico, n-butílico e isobutílico; misturas hexano-etanol, hexano-metanol ou até mesmo solventes clorinados; estes últimos tem sido usados por ser seletivos para lipídios e não serem inflamáveis, porém, apresentam toxicidade (EMMERIE & ENGEL, 1938).

Os óleos vegetais, como o de soja, para torná-los comestíveis

veis é necessário um processo de refino onde acontecem inevitáveis perdas de alguns componentes como os tocoferóis que no branqueamento perde-se entre 14 a 48%, na desodorização entre 14 a 35%, na neutralização entre 5 a 20% e na hidrogenação entre 5 até 70% (BAUERNFEIND, 1980).

O óleo de soja é altamente insaturado, classificado como semi-secante; em 1920 foi usado na indústria de tintas, vernizes e sabão; em 1930, com o aumento na demanda de óleos comestíveis, se adaptaram tecnologias que permitiram seu uso na alimentação (SMITH & CIRCLE, 1978).

A composição do óleo de soja varia em função das características genéticas, técnicas culturais e meio ambiente onde o cultivar é explorado (SMITH & CIRCLE, 1978); porém, pode-se estabelecer alguns limites de seus principais componentes, como os reportados no Quadro 3.

Outros componentes do óleo de soja não refinado são: ácidos graxos livres, carotenos, clorofilas, xantofilas, quinonas, dicetonas, quatro classes de esteróis (livres, esterificados, glicossilados ou acilados) sendo os mais importantes são campesterol, estigmaesterol e beta-sitosterol; contém dois álcoois terpênicos, o cicloartenol e o ciclolaudenol, sete terpenos, sendo os mais importantes o alfa e a beta-amirina. Os ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico, mirístico, araquídico e behênico são os principais acil componentes dos esteril glicosídeos acetilados (RAKIS, 1978; FEDELI et alii, 1966; KOCHHAR, 1983).

O óleo de soja é considerado uma excelente fonte do ácido essencial linolênico (HUNTER, 1981), e este deve ser, em parte, o responsável pelo odor e pouca estabilidade (LANDERS & RATHMANN, 1981), por causar a reversão do "flavor". Óleos ricos em ácidos insaturados apresentam um alto teor de tocoferóis (GUTFINGER & LETAN, 1975a) como milho, soja, trigo, oliva (BOATELLA, 1975).

QUADRO 3. Composição porcentual e algumas características típicas do óleo de soja bruto

Composição	Limites
Peso específico (25°C/25°C)	0,917 - 0,921
Índice de refração (25°C)	1,470 - 1,476
Índice de iodo	120 - 141
Número de saponificação	189 - 195
Acidez (%)	0,5
Triglicerídios totais (%)	99
Ácidos graxos saturados (%):	
Láurico	traços
Mirístico	0,2 - 0,5
Palmítico	7 - 12
Esteárico	2 - 5,5
Araquídico	0,2 - 1,0
Behênico	0,1 - 0,5
Total de saturados	10 - 19
Ácidos graxos insaturados (%):	
Oléico	20 - 50
Linoléico	35 - 60
Linolênico	2 - 13
Eicosenóico	0,05 - 0,1
Total de ácidos graxos insaturados (%)	80 - 88,1
Fosfatídios (%)	1,3 - 2,5
Matéria insaponificável (%):	
Esteróis totais	0,01 - 0,33
Tocoferóis totais	0,15 - 0,21
Alfa-tocoferol (mg/100 g)	3,4 - 11,5
Minerais:	
Ferro (ppm)	1,0 - 3,0
Cobre (ppm)	0,03 - 0,05
Teor de óleo na semente (%)	18 - 22

Fontes: ERICKSON, 1983; LANDERS & RATHMANN, 1981; STAGE, 1982,

GUTFINGER & LETAN, 1974a, 1974b e 1975a; SWERN, 1964; SHERWIN, 1976; KHAFISOV, 1972a; SMITH & CIRCLE, 1978; BAUERNFEIND, 1980; HAFEZ, 1983; MERCADANTE & RODRIGUEZ, 1986; MATIL, 1964.

Este óleo é considerado uma das fontes naturais de tocoferóis e esteróis (NELSON & MILUN, 1968), onde o principal componente é o gama-tocoferol (GUTFINGER & LETAN, 1974a), com 61,9% do total (GOVIND & PERKINS, 1972), 20% de alfa-tocoferol, traços de beta-tocoferol e 20% do delta-tocoferol de um total de tocoferóis de 100 a 200 mg/100 g de óleo (AMES, 1972a BAUERFEIND & .CORT, 1975; BOATELLA, 1975; CARPENTER et alii, 1976; GOVIND & PERKINS, 1972; GUTFINGER & LETAN, 1974a, 1974b).

O conteúdo de alfa-tocoferol depende de muitos fatores tais como: genéticos, geográficos, estacionais, culturais, processamento e armazenamento (AMES, 1972; CONTRERAS, 1984; GUTFINGER & LETAN, 1975a; BROOKS & CSALLANY, 1978).

A partir do óleo de soja se tem isolado e identificado um dímero, como o produto da oxidação do gama-tocoferol, com atividade antioxidante semelhante ao dos tocoferóis (KOMODA & HARADA, 1969; GUTFINGER & LETAN, 1975a).

2.3. REFINAMENTO DO ÓLEO DE SOJA

A separação do óleo, de uma matéria prima, constitui uma divisão especializada da tecnologia de óleos. Dentre os processos de obtenção de óleos se menciona a desintegração mecânica, prensagem e a extração com solventes; o objetivo final é a obtenção de um óleo puro, com alto rendimento, que seja econômico e que produza um farelo que possa ser utilizado (NORRIS, 1964).

Em matérias primas com baixo teor de óleo, como a soja, o recomendável é usar um processo de extração com solventes por apresentar um rendimento de 99%, se as sementes forem descortiza-

das antes da extração; porém, este processo apresenta um elevado investimento inicial (NORRIS, 1964).

O processamento para a obtenção de um óleo de soja comestível consta de extração, degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização, as vezes hidrogenação (ERICKSON, 1983).

O objetivo da degomagem e neutralização, também denominada de refino é: a remoção de gomas, mucilagens e proteínas, hidratação de fosfatídios e a transformação de ácidos graxos livres em sabões. Na neutralização geralmente se usa soda cáustica ou carbonato de sódio (LANDERS E RATHMANN, 1981), ou ainda outras operações físicas (JAWAD et alii, 1983).

O branqueamento é o tratamento que se dá ao óleo com bentonitas seguido de filtração, com terra de diatomácea, neste processo se elimina as substâncias que dão cor e alguns pesticidas (LANDERS & RATHMANN, 1981; NORRIS, 1964).

A desodorização, é o tratamento para a remoção de substâncias responsáveis por odores e sabores característicos da soja (LANDERS & RATHMANN, 1981), isto é possível devido a grande diferença de volatilidade entre os triglicerídios e as substâncias odoríferas. É um processo de destilação por arraste com vapor a elevadas temperaturas, maiores que 200 °C, e a pressão de vácuo, menor que 10 mm de Hg; esta última variável é para evitar a oxidação com o oxigênio atmosférico e a hidrólise dos triglicerídios pela ação do vapor na temperatura de trabalho (MATTEL, 1964; DUDROW, 1983; HUNTER, 1981).

Alguns dos componentes responsáveis pelo sabor e odor do óleo de soja são a laurilnonilcetona, metilendecilcetona, aldeídos triperpênicos com 5 até 12 átomos de carbono, ácidos graxos livres oxidados com 5 até 8 átomos de carbono e o n-deca-2,4-dienal (derivado do ácido linolênico) o qual apresenta um "threshold" de 0,5 ppb em água (MATTEL, 1964). Se essas substâncias

não forem eliminadas, os óleos podem apresentar o fenômeno da reversão do "flavor". Essas substâncias podem ser próprias do óleo ou contaminantes acidentais do processo de refinamento (GILBERT & TANDY, 1979; GAVIN, 1978; ZEHNDER, 1976) ou do armazenamento (GAVIN, 1981).

A desodorização é a última etapa do processamento de refino do óleo comercial de soja (ZEHNDER, 1976); seus parâmetros operacionais são temperatura, pressão, tempo, vapor, ar e meio de aquecimento (RAWLINGS et alii, 1948; NAUDET et alii, 1969; DUDROW, 1983; PUDROW, 1983; GAVIN, 1981). Num processo em batelada se usa 210 a 274 °C com 1 a 6 mm de Hg, por 3 a 8 horas, e um fluxo de vapor na relação de 5 a 15% respectivo ao óleo (ERICKSON, 1983). Como um substituto do vapor pode ser usado um gás inerte, como meio de arraste, desde que os voláteis sejam facilmente removidos do desodorizador (MATTIL, 1964).

A desodorização completa, de muitos óleos, requer prolonga da destilação (SWERN, 1964), ainda a qualidade do óleo desodorizado depende da natureza do óleo original (MATTIL, 1964).

Na desodorização removem-se também matéria insaponificável, menos volátil, como esteróis e tocoferóis os que, dependendo da temperatura de destilação, sua concentração final no óleo pode diminuir de 30 a 60% da inicial. Os triglicerídios são menos voláteis que os outros constituintes do óleo; porém, se encontram mono e di-glicerídios no destilado indicando que estas substâncias poderiam ser produzidas pela hidrólise dos triglicerídios ou serem próprios do óleo (MATTIL, 1964).

Os componentes insaponificáveis do óleo são removidos gradualmente durante cada etapa da refinação (GUTFINGER & LETAN, 1974b). Os pigmentos, responsáveis pela cor característica do óleo, são instáveis ao calor pelo que a desodorização reduz marcadamente a cor do óleo original (MATTIL, 1964). Na desodorização ainda podem ser retirados componentes do óleo, devido ao arraste

pelo vapor (DUDROW, 1983).

No processo de refinamento a etapa que causa a maior perda de tocoferóis e de esteróis é o tratamento com soda; essas perdas podem ser causadas por adsorção no sabão formado, produzindo um resíduo rico nesses componentes (NORRIS, 1964). Algumas perdas de tocoferóis são dadas pela formação de dímeros durante a desodorização e esses ficam no óleo (GUTFINGER & LETAN, 1974b); porém reporta-se que durante todo o processo se perdem, aproximadamente, entre 20 a 45% do total de tocoferóis (SWERN, 1964; GUTFINGER & LETAN, 1974b); sendo que de 5 a 35% são perdidos na desodorização (HUNTER, 1981; GUTFINGER & LETAN, 1974b). Esses limites amplos, são decorrentes dos processos em batelada, onde se mencionam, por exemplo, que as perdas dos tocoferóis, em cada etapa de um processo em batelada, pode ficar em torno de 30% na degomagem e neutralização, 14 a 18% no branqueamento, 14 a 35% na desodorização e de 5 a 70% na hidrogenação (BAUERNFEIND, 1977).

A variação do conteúdo de tocoferóis, esteróis e hidrocarbonetos do óleo de soja, pelo refinamento, se apresenta no Quadro 4 onde se verifica que as perdas dos tocoferóis num processo em batelada são muito variadas de etapa para etapa.

QUADRO 4. Composição do óleo de soja em tocoferóis, esteróis e esqualeno nas diferentes etapas de seu refinamento.

Etapas do Processo	Tocoferol		Esteróis		Esqualeno	
	mg %		mg %		mg %	
Óleo original	110	115	350	390	140	145
Óleo degomado	100	110	360	373	140	145
Óleo clarificado	100	107	300	305	135	145
Óleo desodorizado	80	90	260	265	85	95

Fontes: BARATTA & CONTRERAS, 1984; HUNTER, 1981; GUTFINGER & LE-

TAN, 1974b; BAUERNFEIND, 1980.

As perdas dos tocoferóis durante a degomagem em batelada, se devem principalmente ao arraste de compostos polares nos fosfolipídios hidratados (HUNTER, 1981). Para diminuir as perdas dos tocoferóis durante o branqueamento, pode-se usar "ascarite" (ASKINAZI, et alii, 1983), enquanto que, na desodorização deve-se controlar bem o vapor, temperatura, pressão e tempo para evitar, além das perdas dos tocoferóis, a polimerização dos ácidos graxos poliinsaturados e a interesterificação dos triglicerídios (JAWAD et alii, 1984); uma alternativa é usar a destilação molecular (ZEMANOVIC, 1975).

A desodorização completa aumenta a estabilidade do óleo de soja devido, ao fato de eliminar pró-oxidantes e ativar os antioxidantes, como os tocoferóis (DUDROW, 1983; MATTIL, 1964).

Durante a estocagem e uso o óleo é exposto à luz e ao oxigênio atmosférico ocorrendo o fenômeno denominado "reversão" do "flavor" devido a interação do oxigênio e precursores como o ácido linolênico (LANDERS & RATHMANN, 1981).

2.4. COMPOSIÇÃO DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA

O destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) consiste de uma mistura complexa de ácidos graxos livres, glicerídeos parciais, aldeídos insaturados de elevado peso molecular, hidrocarbonetos parafínicos, oleínas, esqualeno, esteróis, tocoferóis além de produtos oxidados não identificados (NAUDET & CECCHI, 1970).

Recentemente a recuperação dos destilados da desodorização tem aumentado em interesse por sua alta concentração em tocoferóis e esteróis que tem demanda na produção de vitamina E e outros produtos (KEHSE, 1976; GUTFINGER & LETAN, 1974b; FEDELI & GASPAROLI, 1977; GAVIN, 1981). Sistemas de recuperação em grande escala

são necessários para o controle da poluição (GAVIN, 1978; KEHSE, 1976), e recuperação de material que pode ser usado na produção de concentrados de tocoferóis ou de esteróis; embora, desde 1974, tanto a vitamina E natural quanto a sintética, não signifique um bom atrativo para a indústria (ZEHNDER, 1976).

Relacionando a perda média de tocoferol durante a desodorização, de 11 a 22 mg/100 g, com a percentagem média de tocoferol no DDOS, de 6,68%, estima-se que para cada tonelada de óleo desodorizado produziria de 1,0 a 2,0 Kg de DDOS com um rendimento de 0,1 a 0,3 Kg de tocoferóis (BARATTA & CONTRERAS, 1984; CONTRERAS, 1984), e de 0,10 a 0,22 Kg de esteróis (GUTFINGER & LETAN, 1974b).

QUADRO 5. Composição voláteis, típicos da desodorização do óleo de soja e sua relação com o odor

Compostos	Odor
Acetaldeído	forte a frutas
Dimetil sulfito	desagradável
Acetato de etila	fragante
2-butanona	semelhante a acetona
Diacetil	irritante
n-hexanal	semelhante a aldeído
Acetoína	aromático
5-metil-2-hexanona	agradável
2-heptanona	desagradável
Ácido butírico	desagradável
Ácido acético	acre

Fontes: GILBERT & TANDY, 1979.

QUADRO 6. Componentes principais do DDOS determinados por vários autores

Compostos	Porcentagem
Tocoferóis totais	2 - 9
alfa-tocoferol	1,04
beta-tocoferol	0,18
gama-tocoferol	5,03
delta-tocoferol	2,40
Triglicerídios	2 - 5
Ácidos graxos totais	60 - 70
Ácidos graxos livres	36
Ácidos graxos esterificados	24
Hidrocarbonetos	3,5
Esteróis	26
Plastoquinonas	menor que 3
Álcoois alifáticos	menor que 3
Terpenóides	menor que 3

Fontes: FEDELI & GASPAROLI, 1977; CAVINS & INGLET, 1974; BARATTA & CONTRERAS, 1984; HOFFMAN et alii, 1964).

Na fração insaponificável do DDOS encontram-se entre outros, os álcoois triterpênicos: cicloartenol, euforbol, butiroespermol, ciclolaudenol; os terpenos alfa e beta amirina; os esteróis: beta-sitosterol (50 a 72 mg/100 g), estigmaesterol (10 a 24 mg/100 g), campesterol (15 a 25 mg/100 g) e colesterol em traços (FEDELI et alii, 1966; ITOH et alii, 1973; FEDELI & GASPAROLI, 1977; NAUDET et alii, 1973).

O n-deca-2,4-dienal foi identificado como o composto carbonílico de maior concentração no DDOS, e nos destilados do sebo, da banha e do algodão; esse composto é formado por aquecimento do metil-linoleato na presença do n-hepta-2-enal e dos ClO e

A fração hidrocarboneto do DDOS, está constituída de 50% de esqualeno, 4,2% de parafínicos de C29 e C31 e outra fração de aproximadamente 30 a 35 átomos de carbono; esses componentes são próprios do óleo de soja (EVANS et alii, 1964).

A estabilidade do DDOS se deve principalmente ao seu teor em tocoferóis, sendo que esses compostos estabilizam o DDOS em relação à ação do ferro (3+), oxigênio e hidroperóxidos, tanto quanto a ação de alguns antioxidantes como o NDGA, ascorbilpalmato, galatos, pirocatecol e topanol (POKORNY et alii, 1974).

2.5. TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

2.5.1. Estrutura e funções biológicas dos tocoferóis e tocotrienóis

Em 1920, EVANS et alii (apud SCHUDEL et alii, 1972) reportaram a descoberta de um fator indispensável para a reprodução de animais de laboratório, o que denominaram de "fator x" e, posteriormente de vitamina E (KASPAREK, 1980). Em 1936, os mesmos autores, reportaram que o "fator x" era de natureza múltipla sendo capazes de isolar, a partir do óleo do germe de trigo, dois compostos que denominaram alfa e beta-tocoferol. Em 1937, EMERSON et alii (apud SCHUDEL et alii, 1972) fizeram a descoberta de um terceiro composto, o gama-tocoferol e em 1947, STERN et alii (apud SCHUDEL et alii 1972), descobrem o quarto composto a partir do óleo de soja, o delta-tocoferol.

Na década de 60 foram descobertos quatro homólogos dos tocoferóis que se denominaram α' , β' , γ' , δ' — tocotrienol respectivamente (SCHUDEL et alii, 1972).

Em 1965 publicou-se uma revisão bibliográfica com 192 páginas e 434 referências sobre o teor da vitamina E nos alimen-

tos (BAUERNFEIND, 1980).

A vitamina E consiste em oito cromanóis, derivados do 6-cromanol ou cromano-6-ol, sendo quatro tocóis e quatro tocotrienóis, todos com diferente atividade biológica e estereoquímica própria. Nos animais predomina o alfa-tocoferol. Os demais compostos representam apenas de 1 a 5% da atividade biológica do alfa-tocoferol. Nos óleos vegetais predominam os gama e delta-tocoferóis (DESAI, 1980).

O termo "tocol", foi proposto por Karrer et alii em 1938 para denominar um derivado saturado do cromanol e o termo "tocotrienol", proposto por Bungam et alii em 1961, para denominar o derivado insaturado do cromanol respectivo (SCHUDEL et alii, 1972).

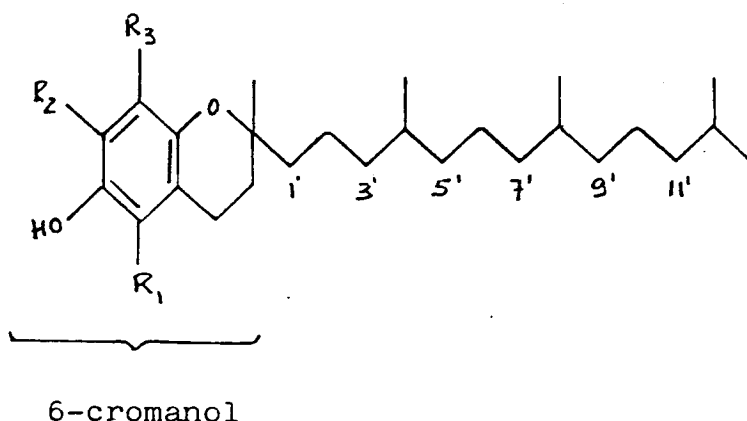
A função principal dos tocoferóis, na célula, é a de antioxidante, protetora das membranas e sistemas lipídicos (SWERN, 1964; KOMODA et alii, 1968). Sua função de antioxidante natural se deve a sua capacidade de doar elétrons (CORT, 1974), a qual está relacionada com sua estrutura (ANON, 1981); essa capacidade demonstra a seguinte ordem decrescente de atividade antioxidante: gama, delta, beta e alfa-tocoferol (CHOW & DRAPER, 1974; CAMPASOL et alii, 1976; FUKUSAWA et alii, 1982; BAUERNFEIND, 1980) enquanto que a atividade vitamínica se apresenta em ordem decrescente de alfa, beta, gama e delta-tocoferol (YUKI et alii, 1979).

Os tocoferóis (alfa, beta, gama e delta) apresentam atividade biológica em humanos (VITALI, 1972), pelo que, a US Food & Board recomenda consumir entre 8 e 10 mg de alfa-tocoferol por dia para manter um estado saudável em adultos; essa quantidade é bem suprida na ingestão diária de óleos comestíveis (HUNTER, 1981).

A correta estrutura do alfa-tocoferol foi estabelecida por Fernholz em 1938, sendo essa uma importante descoberta para a elucidação das demais estruturas dos tocoferóis e tocotrienóis, estes últimos eram denominados de E-tocoferóis (KASPAREK, 1980).

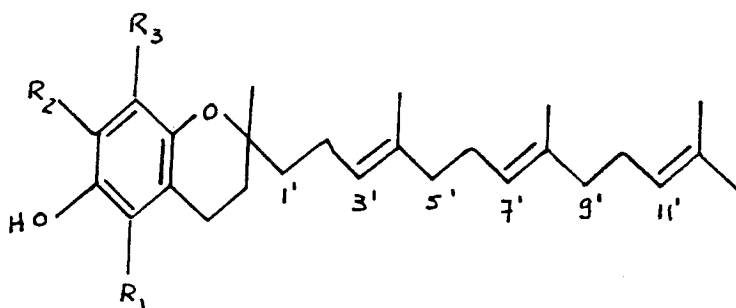
Em 1964, a IUPAC-IUB, aceitou a proposta de Pennock et alii para nomear sistematicamente os tocoferóis e tocotrienóis (SCHUDEL et alii, 1972); assim por exemplo, o alfa-tocoferol é o 5,7,8-trimetil-2-(4',8',12'-trimetildecil)-6-cromanol (HARRIS, 1972).

A estrutura e nomenclatura aceita dos tocoferóis se representam a seguir (KASPAREK, 1980; SCHUDEL et alii, 1972).



Nomes		Abreviatura	R1	R2	R3
alfa-tocoferol ou 5,7,8-trimetiltocol	(αT)	Me	Me	Me	
beta-tocoferol	5,8-dimetiltocol	(βT)	Me	H	Me
gama-tocoferol	7,8-dimetiltocol	(γT)	H	Me	Me
delta-tocoferol	8-metiltocol	(δT)	H	H	Me

A estrutura e nomenclatura aceita para os tocotrienóis se representa a seguir (KASPAREK, 1980; SCHUDEL et alii, 1972).



Nomes	Abreviatura	R1	R2	R3
alfa-tocotrienol ou 5,7,8-trimetiltocotrienol	(αT_3)	Me	Me	Me
beta-tocotrienol ou 5,8-dimetiltocotrienol	(βT_3)	Me	H	Me
gama-tocotrienol ou 7,8-dimetiltocotrienol	(γT_3)	H	Me	Me
delta-tocotrienol ou 8-metiltocotrienol	(δT_3)	H	H	Me

2.5.2. Características físicas, químicas e usos dos tocoferóis

Os tocoferóis são óleos a temperatura ambiente, o alfa-tocoferol apresenta as seguintes características: ponto de fusão de 2,5 a 3,5 °C, insolúvel em água, solúvel em solventes apróticos, poder rotatório, a 25 °C, de + 0,32° em etanol; nesse mesmo solvente apresenta uma máxima absorbância entre 292 a 298nm sendo que sofre um efeito hipsocrômico quando transformado em seu derivado acetilado com comprimento de onda máximo entre 276 a 285 nm.

Os tocoferóis são destruídos pela ação do oxigênio for

mando quinonas, dímeros, trímeros (BAUERNFEIND, 1980; CILLARO et alii, 1980). A oxidação é acentuada pela ação da luz, calor, bases, íons Fe (3+) e Cu (2+). São estáveis em meio ácido e, na ausência de oxigênio, apresentam relativa estabilidade frente as bases, luz e calor (BAUERNFEIND, 1980; LARS & NILSSON, 1977).

Os tocoferóis no estado puro são estáveis ao ar e à luz, por longos períodos. Em solução podem ser protegidos contra a ação principalmente dos íons Fe (3+) e Cu (2+), com os ácidos ascórbico e cítrico e o EDTA (CORT et alii, 1978).

Os tocoferóis se encontram nos alimentos, principalmente na forma não esterificada (BAUERNFEIND, 1980). As principais fontes são: germe de trigo, óleos de milho, algodão, girasol, soja, oliva, côco e amendoim (SLOVER, 1971; SCHUDEL et alii, 1972; BAUERNFEIND, 1980; LANDERS & RATHMANN, 1981; HERTING & DRURY, 1969). Sua distribuição nos alimentos é variada dependendo da espécie, estado de maturação, meio ambiente onde se cultiva a espécie, forma de colheita, processamento e armazenamento (BAUERNFEIND, 1980; KLYUCHKIN e SAFRONOVA, 1972). Alimentos de origem animal geralmente são pobres em tocoferol, nesses organismos sua concentração depende da alimentação do animal (BAUERNFEIND, 1980).

Os tocoferóis do óleo de soja sofrem modificações segundo o processo de refino; assim, verifica-se uma troca de compostos isoméricos, por exemplo o total dos isômeros alfa e delta diminuem enquanto o gama aumenta (KHAFIZOV et alii, 1972b); verifica-se também que os tocoferóis livres estão em maior concentração no óleo não refinado; no entanto o óleo refinado apresenta moléculas associadas como dímeros, oxipolímeros (MERCADANTE & RODRIGUEZ, 1986).

O processamento tecnológico e a estocagem afetam os tocoferóis dos óleos; por exemplo, menciona-se uma perda de 20% de tocoferol total no óleo de soja estocado durante 17 semanas (GUT FINGER & LETAN, 1975a).

Os tocoferóis são usados em tecnologia de alimentos por sua capacidade antioxidante, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja bem esclarecido (YUKI et alii, 1979) menciona-se que inibem a formação das nitrosaminas em bacon (GRAY et alii, 1982, TANAKA, 1982). São usados também como aditivo antioxidante em leite e produtos láteos (KING, 1968). Em combinação com hidrolisados de gelatina, apresentam ação sinergista (KAWASHIMA et alii, 1979). Os concentrados de tocoferóis naturais, se comportam como antioxidantes e sinergistas em produtos gordurosos (NAGAI, 1982).

2.5.3. Análise de Tocoferóis

Durante os últimos 15 anos as metodologias para a análise dos tocoferóis tem evoluído rapidamente. Um dos grupos de trabalho que tem contribuído na produção de metodologias de análise de tocoferóis é o de Pennock, (apud MULLER, 1976); porém, os esforços dos analistas de vitamina E remontam-se a quase 50 anos (BUNNELL, 1971). Hoje o analista dispõe de uma ampla gama de métodos tanto gravimétricos, volumétricos, espectrofotométricos, eletroquímicos quanto os cromatográficos.

Os métodos químicos e físico-químicos são úteis para determinações qualitativas e quantitativas, enquanto que os biológicos são úteis para as determinações da biopotência e da atividade vitamínica (DESAI, 1980).

A sequência das operações em curso para a análise de vitamina E pode, em geral, seguir as seguintes etapas (BUNNELL, 1967):

1. preparo da amostra
2. extração da fração que contém os tocoferóis
3. remoção dos interferentes ou purificação dos extratos
4. separação ou isolamento dos tocoferóis
5. determinação com métodos clássicos ou instrumentais

6. interpretação dos resultados

2.5.3.1. Extração

A etapa inicial, na determinação dos tocoferóis, inclui o preparo da amostra a que pode ser sólida ou líquida; no caso dos sólidos é frequente usar a operação de extração com solventes como a mistura clorofórmio : metanol (MIZOBUCHI et alii, 1977), acetona (DESAI, 1980), metanol (FEETER, 1974), isopropanol (THOMPSON et alii, 1978), ou ainda solventes apróticos onde se obtém a fração lipídica e componentes polares.

Na sequência das operações, tanto os extratos quanto as amostras líquidas, como óleos, podem sofrer saponificação para eliminar os glicerídios (TAYLOR et alii, 1976; BUNNELL, 1971; NELSON et alii, 1970; CASAGRANDE & FRIZZERA, 1979; CONTRERAS et alii, 1982; GERTIG & DUDA, 1979), enquanto que os tocoferóis e tocotrienóis são extraídos do material insaponificável usando solventes como éter etílico (GERTIG & DUDA, 1979; CONTE et alii, 1979), éter de petróleo (MANZ & PHILIPP, 1982), hexano (TAYLOR et alii, 1976), clorofórmio (CASAGRANDE & FRIZZERA, 1979) e outros solventes apróticos.

Na hidrólise básica recomenda-se usar um agente redutor, como o ácido ascórbico (TAYLOR et alii, 1976; MANZ & PHILIPP, 1982), pirogallol (CARPENTER et alii, 1976) ou usar um meio hidrolítico de menor atividade prótica como KOH em metanol ou KOH em etanol sob condições inertes de atmosfera de nitrogênio (MANZ & PHILIPP, 1982).

Outras técnicas alternativas de extração são a destilação molecular e a micro-sublimação, ambas demoradas e caras (DESAI, 1980). Uma alternativa muito usada é a cristalização a baixas temperaturas, onde os extratos e as amostras líquidas se separam em duas fases (CHOW et alii, 1969; MULLER, 1976; ZANDI & MCKAY, 1976); na fase sólida se encontram os glicerídios e na lí-

quida os tocoferóis e outros insaponificáveis, nessa operação os tocoferóis devem ser protegidos usando um redutor como o palmitato de ascorbila (MULLER, 1976).

Nas determinações rotineiras de tocoferóis se pode usar a extração direta da amostra (JOHNSON & PYE, 1979; GUTFINGER & LETAN, 1975a; TAGNEY et alii, 1979); porém se obtém melhores resultados quando se usa a extração a partir dos insaponificáveis (LOSI & PIRETTI, 1970; NELSON et alii, 1970; GUTFINGER & LETAN, 1975a; SEINO et alii, 1971), ou mesmo usando a cristalização fracionada em baixas temperaturas (MULLER, 1976).

2.5.3.2. Purificação

Cabe ressaltar que na determinação dos tocoferóis é necessário eliminar substâncias redutoras e oxidantes como luz, oxigênio, íons ferro (3+) e cobre (2+) (DESAI, 1980).

Tem-se desenvolvido uma variedade de métodos para purificação de extratos de tocoferóis (BUNNELL, 1967). Os mais usados são os cromatográficos (PARRISH, 1980), onde os tocoferóis podem ser caracterizados por seus tempos de retenção, retenção relativa ou por constantes de distribuição (SCHUDEL, et alii, 1972).

A purificação por cromatografia em coluna tem ampla aceitação usando como fases estacionárias: florisil (BUNNELL, 1967; BUSHNELL, 1967), sílica gel (MANZ & PHILIPP, 1982), fosfato ácido de magnésio (BRO & HJARDE, 1957) kieselguhr, alumina, carbonato de zinco + celite (KASPAREK, 1980). As fases móveis mais usadas são solução de ácido sulfúrico diluído (MANZ & PHILIPP, 1982; BUNNELL; 1967), éter etílico (BUSHNELL, 1967), éter de petróleo (BRO & HJARDE, 1957), etc. Neste tratamento se eliminam substâncias como carotenos, alguns esteróis e substâncias redutoras (BUNNELL, 1967; BRO & HJARDE, 1957; BUSHNELL, 1967).

A cromatografia em camada delgada (ccd) é amplamente

usada seja para purificar extratos, a nível analítico, ou para a separação qualitativa e quantitativa dos tocoferóis (BUNNELL, 1967). Nesta técnica as fases estacionárias mais usadas são: sílica gel G (TAKAGI & KAI, 1980; NADIROV et alii, 1973; MIZOBUCHI et alii, 1977; MANZ et alii, 1980), alumina para TLC (AMES, 1972), fosfato de cálcio (DOBOSZYNSKA & KACZMAREK, 1973), fosfato ácido de magnésio (DESAI, 1980); as fases móveis que mais se tem usado são: benzeno : metanol (98 : 2), hexano : acetato de etila (90 : 10) (YAMAUCHI & MATSUSHITA, 1979), clorofórmio : isooctano (5 : 5) (MANZ et alii, 1980), benzeno (MIZOBUCHI et alii, 1977), clorofórmio (NADIROV et alii, 1973; GUTFINGER & LETAN, 1974b), ou séries elutrópicas de partição líquido-sólido (DEAN, 1969), como 20% de isopropiléter em éter de petróleo (DESAI, 1980).

A cromatografia em camada delgada, tanto a de fase normal quanto a reversa seja mono ou bi-dimencional, tem sucesso na análise dos tocoferóis (DESAI, 1980; SCHUDEL et alii, 1972; WHITTEL & PENNOCK, 1967).

Após o desenvolvimento da placa é necessário revelar os componentes eluídos. Os tocoferóis podem ser revelados com os seguintes reagentes: $SbCl_5$, ácido fosfomolibdico, $FeCl_3$ +dipiridil, $FeCl_3$ +batofenantrolina (MANZ et alii, 1980; DESAI, 1980), α , α' -dipiridil (AMES, 1972), 1, 1'-difenil- β -picrilhidrazil (GLAVIND & HOLMER, 1967), batofenantrolina (TAKAGI & KAI, 1980) e 2,2'-biquinolina.

Em geral a cromatografia em camada delgada separa tocoferóis e tocotrienóis melhor que outras técnicas cromatográficas (PARRISH, 1980); porém, é necessário que se tomem as devidas precauções nas purificações prévias; assim por exemplo, se usou a C.C.D para separar os tocoferóis, tocotrienóis do óleo de soja (KATO et alii, 1981).

Observa-se na camada delgada, em geral, que a hidroxila do grupo fenólico é a que determina a velocidade de migração dos

tocoferóis, sendo a seguinte sequência da migração: trimetil maior que dimetil e este maior que mono-metil (SCHUDEL et alii, 1972).

A cromatografia em papel também tem sido usada para a purificação das frações que contêm tocoferóis (BUNNELL, 1971; PARRISH, 1980), geralmente se utiliza como fase estacionária o papel impregnado com carbonato de zinco, esta foi recomendada como técnica oficial da British Analytical Methods Committee (BUNNELL, 1967; GOVIND & PERKINS, 1972).

Outros métodos para purificação dos tocoferóis é a hidrogenação das substâncias insaturadas como carotenos. Este método tem a vantagem de ser simples e rápido, porém, substâncias reductoras oxidadas como as tocoferil quinonas não são removidas (BUNNELL, 1967). Um tratamento com solução de ácido sulfúrico a 85% remove substâncias como carotenóides, ácidos graxos insaturados, etc, mas também ocorre alguma destruição dos tocoferóis, pelo que este método não tem ampla aceitação (MANZ & PHILIPP, 1982; BUNNELL, 1967).

A cromatografia de permeação em gel, usando sephadex 20 HL, tem demonstrado um alto rendimento na purificação de extratos de tocoferóis separando esteróis e ácidos graxos (KIM & RHEE, 1982).

2.5.3.3. Métodos espectrofotométricos

Na determinação de vitamina E o método mais usado é o de Emmerie & Engel conhecido desde 1939. Este método está baseado na reação redox dos tocoferóis e o reagente cromogênico $\text{Fe}(3+)/2, 2'$ -bipiridina ou α, α' -dipiridil produzindo um cromóforo que apresenta absorvância máxima a 520 nm (DESAI, 1980; FEDELI et alii, 1971; BUNNELL, 1967; AMES, 1972; EMMERIE & ENGEL, 1938; MANZ, 1982; PARRISH, 1980; GERTIG & DUDA, 1979). O mecanismo desta reação se estabelece entre os produtos intermediários $\text{Fe}(2+)/2, 2'$ -bipiridina (PARRISH, 1980), sendo que o alfa-tocoferol reage mais rapidamen-

te e o delta-tocoferol mais vagarosamente (BUNNELL, 1967).

A principal desvantagem do método de Emmerie & Engel é a fugacidade da intensidade da absorvância, de 15 a 30 seg.; este problema pode ser minimizado usando outro reagente cromogênico, a batofenantrolina (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) em ácido fosfórico o qual aumenta 2,5 vezes a sensibilidade do método nos primeiros 15 seg. da reação. A combinação do 2,4,6-tripiridil-5-triazina em ácido fosfórico também apresentam os mesmos resultados.

O método de Emmerie & Engel, não é específico para tocoferóis desde que algum composto redutor esteja presente (FEETER, 1974), daí a validade do processo de purificação antes da determinação colorimétrica (AMES, 1972).

Em 1948 Quaife, (apud GOVIND & PERKINS), 1972 adaptou um método para diferenciar tocoferóis baseado na observação de que o beta, gama e delta-tocoferol reagem com o ácido nitroso dando um derivado nitroso de cor amarelada enquanto que o alfa-tocoferol não reage e produz uma cor vermelha com o reagente de Emmerie & Engel.

Outro método usado foi o da dianisidina onde os gama e delta-tocoferol, após reação com a dianisidina, diazotada em solução básica, produzem um cromóforo de cor intensa (GOVIND & PERKINS, 1972).

A combinação da cromatografia em camada delgada e o método colorimétrico tem dado bons resultados, usando a batofenantrolina; com esse procedimento se conseguiu elevados rendimentos e alta reprodutibilidade (STURM et alii, 1966).

Um procedimento alternativo para o método de Emmerie & Engel é descrito por CONTRERAS & STRONG 1982a e 1982b, onde se apresenta uma sequência de operações para determinar tocoferóis em grãos, óleos comestíveis e sub-produtos da refinação do óleo

de soja.

Nesse procedimento a reação cromogênica é dada pela complexação dos íons Cu(+) e a 2,2'-biquinolina ou cuproína; essa complexação acontece na interfase do sistema heptano: etanol 80% onde o alfa tocoferol forma um cromóforo aos 10 seg. de reação. O cromóforo formado apresenta um comprimento de onda máximo a 545 nm com uma absorvabilidade molar de 14.490 L.mol⁻¹.cm⁻¹. A principal vantagem desta reação, sobre o de Emmerie & Engel, é sua estabilidade à luz.

A espectrofotometria no ultra-violeta, tem sido usada para quantificar tocoferóis (DOBOSZYNSKA & KACZMAREK, 1973; DESAI, 1980; PARRISH, 1980; BUNNELL, 1967). Os comprimentos de onda de máxima absorvância são 280, 292 e 301 nm respectivamente, podendo-se calcular a absorvabilidade molar pela seguinte relação (DESAI, 1980):

$$E(\text{amostra}) = 2.778 E_{292} - (1.552 E_{280} + 1.626 E_{301})$$
$$\text{Concentração de alfa-tocoferol} = \frac{E(\text{amostra})}{E(\text{padrão})}$$

Este método é de pouca sensibilidade com muitos interferentes, sendo que os tocoferóis, tocotrienóis e seus ésteres apresentam variadas absorvabilidades (PARRISH, 1980; BUNNELL, 1967).

A espectrofotometria infra-vermelha demonstrou ser uma técnica útil na determinação da influência do processamento nos tocoferóis da soja; no entanto, os métodos espectrofluorométricos tem sido usados para analisar tocoferóis em tecidos biológicos onde é necessária uma elevada sensibilidade (BUNNELL, 1967; PARRISH, 1980).

A automação na química analítica permitiu adaptar um sistema de análise contínuo de tocoferóis, esse foi o sistema de

análise por injeção em fluxo segmentado. Nesse sistema se usa a reação de Emmerie e Engel para a formação do cromóforo do tocoferol o qual é determinado colorimetricamente (HONNOLD et alii, 1969).

2.5.3.4. Métodos cromatográficos

A análise de misturas de tocoferóis, por métodos químicos, apresenta limitações principalmente devido a interferentes e baixa sensibilidade. Na tentativa de resolver este problema adotaram-se métodos gás-cromatográficos (PARRISH, 1980; BUNNELL, 1967; AMES, 1972; LEHMANN & SLOVER, 1976; PRIETLEY et alii, 1980; NELSON & MILUN, 1968).

A cromatografia em fase gasosa é o método que permite separar e analisar tocoferóis individuais em extratos (BUNNELL, 1967); porém, substâncias com reatividade química do grupo hidroxila fenólico, se apresentam como interferentes, como é o caso dos esteróis (AMES, 1972), não acontecendo o mesmo com a presença dos metil-ésteres dos ácidos graxos, hidroperóxidos e produtos de oxidação (LEHMANN & SLOVER, 1976); assim por exemplo, tem sido reportada a análise dos tocoferóis do óleo de soja, extraídos do material insaponificável (PRIESTLEY et alii, 1980; MORDET, 1970b; BOATELLA, 1975; FEETER, 1974) ou a partir do DDOS (NELSON & MILUN, 1968).

A cromatografia em fase gasosa tem a vantagem sobre os métodos químicos, na reprodutibilidade, exatidão e tempo da análise (ABE et alii, 1976); porém, os problemas associados com esta determinação são: pureza dos extratos, razão do fluxo da fase móvel, pré-condicionamento e carga das colunas, estabilização do detector, calibragem com padrões, uso de padrão interno e a necessidade de trabalhar com compostos voláteis (PARRISH, 1980).

Os derivados voláteis mais usados na determinação de tocoferóis são os trimetilsililéteres ou TMS-tocoferil (SLOVER et

alii, 1969; SLOVER et alii, 1983; LERCKER et alii, 1981; GOVIND & PERKINS, 1972; SLOVER et alii, 1967; ABE et alii, 1976; LEHMANN & SLOVER, 1976), os quais são preparados pela dissolução da amostra num sistema de agente silalizantes (HDMS, BSTFA, etc) em piridina anidra (SLOVER, et alii, 1967).

A separação tem sido efetuada usando fases estacionárias co mo a 0,5% Apiezon L, 2% SE - 30 (SLOVER et alii, 1969; SLOVER et alii, 1967; GUTFINGER & LETAN, 1975a), OV - 17 (SLOVER et alii, 1969), OV - 1 (ABE et alii, 1976), QF - 1 (GOVIND & PERKINS, 1972) usando temperaturas de coluna de aproximadamente 235°C (SLOVER et alii, 1969) ou de 265°C no caso de separar os ésteres de tocofe ril (ABE et alii, 1976).

A identificação de cada tocoferol pode ser efetuada me diante o uso de padrão interno como o 5,7-dimetiltocol (MARIANI & FEDELI, 1982), ou ainda usando os índices de retenção de kováts (SLOVER et alii, 1967); porém, a tendência é usar combinação GC-MS por permitir a análise estrutural dos componentes separados (GOVIND & PERKINS, 1972), ou ainda usar a cromatografia capilar em fase gasosa de elevada resolução (SLOVER et alii, 1969; SLOVER et alii, 1983; LERCKER et alii, 1981).

Em 1972 foi publicada uma metodologia para analisar tocoferóis usando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), e desde então esta técnica tem sido também usada nessas análises (PARRISH, 1980; CORTESI & FEDELI, 1980; BARNES, 1980; KANEMATSU et alii, 1984; CARPENTER, 1979; ZONTA & STANCHER, 1983). Uma das vantagens desta técnica é que permite usar extratos sem purificação (CARPENTER, 1979; ABE, 1976), embora isso possa encurtar o tempo de vida útil da coluna, todavia permite eliminar as reações de derivação, diminuir o tempo da análise (BARNES, 1980, KANEMAT-SU et alii, 1984), usar baixas temperaturas de operação (PARRISH, 1980), etc.

Os tocoferóis são separados por HPLC usando fases esta-

cionárias como Corasil II (CAVINS & INGLETT, 1974; NIEKERK, 1973), sílica gel (KANEMATSU et alii, 1983; MANZ & PHILIPP, 1982), florisil, alumina (KOMODA & HARADA, 1969) entre outros. Como fases móveis se usam misturas de solventes como hexano:isopropanol (99,75 : 0,25) (TATSUMI et alii, 1982), hexano : isopropanol : benzeno : éter (85 : 15 : 4 : 1) (KOYAMA et alii, 1982), hexano : éter etílico : metanol (CORTESI & FEDELI, 1980), hexano : dioxano:isopropanol (98,7 : 1,0 : 0,3) (KANEMATSU et alii, 1984), éter diisopropílico : hexano (2 : 98) (ABE, 1976; NIEKERK, 1973). A detecção dos compostos eluídos é feita usando um detector U.V a comprimento de onda de 280 nm (MANNZ & PHILIPP, 1982; TATSUMI et alii, 1982), ou a 294 nm (CORTESI & FEDELI, 1980), ou ainda usando detector fluorescente (MANZ & PHILIPP, 1982).

2.5.3.5. Métodos eletroquímicos

Dentre os métodos eletroquímicos, usados na análise de tocoferóis, mencionam-se a titulação potenciométrica com sulfato cérico (BUNNELL, 1967; GOVIND & PERKINS, 1972), com diclorofenol-indofenol em presença de Fe(2+) (BUNNELL, 1971); ou ainda a polarografia de onda anódica (ATUMA & LINDQUIST, 1974; McBRIDE & EVANS, 1973; GOVIND & PERKINS, 1972; PARRISH, 1980). Este último método tem a vantagem da rapidez mas perde em sensibilidade devido a que o eletrodo de trabalho é facilmente contaminado (DESAI, 1980).

2.5.3.6. Métodos biológicos

A vitamina E pode ser analisada com métodos biológicos (AMES, 1972). As técnicas de bioensaio são úteis para avaliar a atividade dos tocoferóis e estimar os requerimentos de vitamina E em humanos e animais (DESAI, 1980). A verdadeira atividade vitamínica pode ser determinada segundo se possa prevenir ou reverter os sintomas de deficiência; sendo que, essas variam de espécie para espécie nos animais. As deficiências mais comuns, em animais de laboratório, são: a esterilidade, distrofia muscular, necrose

hepática, entre outros (DESAI, 1980).

Os métodos biológicos para a determinação da vitamina E podem ser agrupados em dois tipos (AMES, 1972): aqueles que permitem medir a resposta fisiológica real e aqueles de resposta relativa. Dentre estes últimos mencionam-se a determinação do teor dos tocoferóis no sangue e nos tecidos e a hemólise das hemácias. Os métodos da resposta verdadeira ou real, mais usados em ratos são a medida da distrofia muscular, determinação das alterações na reprodução, reabsorção fetal, atrofia testicular e nível de creatinina e a encefalomalacia em pintos (AMES, 1972). Desse método, o clássico é o da reabsorção fetal em ratos (DESAI, 1980).

Todos os bioensaios dependem da digestibilidade e absorção desta vitamina e da eficiência no seu transporte sanguíneo (AMES, 1972).

2.6. OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE TOCOFERÓIS

A obtenção de tocoferóis, a partir de produtos naturais, especialmente dos resíduos da indústria do óleo de soja (TAKAGI & KAI, 1980; KIM & RHEE, 1982), é de grande interesse na indústria farmacêutica e de cosméticos (LIEBING et alii, 1983); porém, o preparo de um concentrado de alfa-tocoferol tem maiores preferências nestas indústrias por apresentar a maior atividade fisiológica (AMES, 1972). Os concentrados de tocoferóis freqüentemente são submetidos a derivações químicas com a finalidade de convertê-los em produtos economicamente viáveis, um destes produtos é o acetato de tocoferol o qual é muito estável em condições atmosféricas.

O método usado no processamento industrial, depende da qualidade do produto final desejado; assim por exemplo, concentrados de "baixa biopotência" podem ser preparados a partir do insaponificável do óleo de soja (AMES, 1972), ou da acetilação ou da esterificação, com álcoois poliidrícos do DDOS (TAKAGI & KAI, 1980;

NISSHIN, 1980).

Dentre os concentrados de tocoferóis que tem sido usados, pela sua atividade antioxidante, estão os acetil e succinil derivados; esses produtos foram preparados a partir do óleo do germe de trigo ou de soja. Estes concentrados são formulados para um teor de 350-500 mg/g (AMES, 1972).

Os produtos sintéticos apresentam-se na forma racêmica (all racemic)d-alfa-tocoferol o qual é produzido a partir do iso fitol;esse composto apresenta oito estereoisômeros o qual diminui significativamente sua atividade fisiológica.O d,l-alfa-tocoferol (all racemic) é comercializado na forma de acetato (AMES, 1972).

Para separar os tocoferóis da matéria prima pode-se usar a extração com solventes, tratamentos químicos, destilação molecular (KIM & RHEE, 1982), cromatografia, cristalização fracionada com solventes como Etanol, pentano e acetona (SCHUDEL et alii, 1972), ou ainda combinações de uma ou mais operações como extração, destilação molecular, saponificação, lavagens com ácido, hidrogenação, etc. Nenhum desses procedimentos, em forma isolada, tem dado bons resultados (AMES, 1972).

Dentre as reações de derivação química menciona-se a trans formação dos tocoferóis em alofenatos ou em p-fenilazobenzoatos os que se separam por cristalização fracionada (SCHUDEL et alii, 1972).

Tem-se reportado que, a partir do DDOS, se podem obter tocoferóis e esteróis. Para esta finalidade o DDOS é destilado para remover os ácidos graxos e, após saponificação são extraídos os insaponificáveis. O material insaponificável é tratado com metanol obtendo-se os esteróis por pre cipitação em resfriamento, entretanto os tocoferóis são recuperados após a passagem numa resina de troca iônica (KIM, 1975). Uma forma alternativa para se obter esses compostos é a combinação da

extração com a destilação molecular (BECKER, 1974).

A destilação molecular tem sido usada para obter concentrados de tocoferóis (SANO et alii, 1978; SOCIETY-SARB, 1972; STIRTON, 1964; SWERN, 1964; BUNNELL, 1967), esta operação consiste em passar a amostra através de um trocador de calor, a elevada temperatura, num sistema de alto vácuo. A destilação molecular do DDOS pode ser efetuada a 210°C e 0,001 mm Hg (SOCIETY-SARB, 1972; STIRTON, 1964); com esse processo se obteve um concentrado com 20% de tocoferóis e 43% de esteróis (SANO et alii, 1978).

A destilação molecular tem a vantagem, sobre a saponificação, de evitar a destruição dos tocoferóis e remover simultaneamente, outras substâncias não saponificáveis de alto peso molecular; porém, a principal desvantagem é o uso de equipamentos específicos para esta finalidade (BUNNELL, 1967; DEAN, 1969).

Métodos usados para obter concentrados de tocoferóis a partir do DDOS são: extração com solventes, tratamentos químicos e a destilação molecular. Menciona-se que num processo de extração com solventes se obtém um concentrado com 28% de tocoferóis e demonstrou ser superior aos outros testados (KIM & RHEE, 1982).

2.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

O sucesso da operação de extração com solventes teve seu início na década de 1940 quando se adaptou um processo industrial de extração líquido-líquido (CHRISTENSEN, 1983).

A extração com solvente tem sido definida como uma operação de transporte de materiais, de uma para outra fase, com a finalidade de separar um ou mais componentes da mistura (JOHNSON & LUSAS, 1983). Porém a separação dos constituintes de uma mistura homogênea é um dos problemas mais frequentes encontrados na tecnologia química (HANSON, 1975).

A teoria da dissolução, na extração com solventes, está baseada nas leis da termodinâmica, explicada por Sedine & Hasegawa, (apud JOHNSON & LUSAS, 1983). Durante a dissolução dos dois componentes: o soluto e o solvente, formam uma mistura molecular; esta dissolução é sempre acompanhada por uma troca de energia livre, relatada pela equação de Gibbs ($G = H - T \cdot S$) produzindo-se um aumento na desordem do sistema. A distribuição do soluto atingirá o equilíbrio quando apresente a mesma energia livre em ambas as fases (DEAN, 1969).

A extração líquido-líquido, é uma técnica relativamente simples, versátil, não dispendiosa. A operação consiste em dissolver a amostra num líquido, denominado refinato, o qual está em contato com outro líquido denominado extratante ou solvente, ambos imiscíveis (MILLER, 1975; TREYBAL, 1951); porém, os processos em contra-corrente de múltiplos estágios, são vagarosos e laboriosos, além de não ter uma teoria adequada que a sustente (MILLER, 1975).

No processo da extração devem-se observar os seguintes fatores (TREYBAL, 1951):

1. a relação fase/equilíbrio, descreve a concentração das substâncias distribuídas entre as fases imiscíveis
2. velocidade de extração e difusão, esta depende da saída do sistema em equilíbrio e das características físicas do solvente ou extratante
3. balanço de material, descreve as quantidades das substâncias envolvidas no processo
4. capacidade e performance do equipamento usado

Obtém-se bons rendimentos quando a substância é estável e o solvente é de fácil recuperação. Para se obter bons rendimentos em escala laboratorial é necessário usar grandes quantidades de solvente em várias extrações. Em escala industrial não é usual mais de dois estágios de extrações sucessivas devido, principalmente, ao volume de solvente e dos equipamentos usados (WOLF, 1971).

As técnicas de extração com solventes, em escala laboratorial, tem sua atenção focalizada na busca de solventes adequados e processos economicamente viáveis (BLUMBERG et alii, 1975). Os resultados obtidos em escala laboratorial podem ser considerados a nível industrial se levado em conta (COLEBY, 1975):

1. investimento inicial para a carga e circulação do solvente
2. perda de solvente
3. transferência de solutos
4. tipos de solventes
5. disponibilidade
6. facilidade de manipulação
7. pureza do produto
8. rendimentos
9. custos

A escolha do solvente é também influenciada pelo tipo do processo, volume do solvente em circulação e sua recuperação. É recomendável que o solvente escolhido apresente propriedades físicas, como gravidade específica relativa, viscosidade, tensão superficial, ponto de ebulição e a tendência a formar emulsões sejam bem definidas (BLUMBERG et alii, 1975).

Nos critérios a serem considerados na escolha do solvente devem incluir (WOLF, 1971):

1. razão de partição, deve ser alta para se obter altos rendimentos, com pouco solvente seletivo. A razão, ou coeficiente de partição, de uma substância entre duas fases, está relacionada com a energia livre requerida para transportar um mol de substância de uma para outra fase (DEAN, 1969); esta pode ser representada pela relação das concentrações ou das atividades do soluto entre as duas fases (WOLF, 1971).
2. polaridade do solvente; a polaridade está relacionada com a constante dielétrica (água = 78,5 e do hexano = 1,89); em geral refinato e extratante devem apresentar polaridades diferentes
3. perdas e remoção do solvente, o solvente pode ser recuperado

por destilação, absorção, precipitação, etc.

4. reatividade, devem-se evitar solventes reativos como os ésteres por serem hidrolisados em meios ácidos, básicos ou ainda reagir com álcoois e ácidos por transesterificação; solventes amínicos podem ser acilados ou formar bases de Schiff com grupos cetônicos.
5. facilidade de separar as fases; a formação de emulsão e a insuficiência de separar as fases se apresenta quando as densidades das fases são similares. Alguns solutos estimulam a formação de emulsões sendo necessário usar nesses casos resfriamento, adição de sais ou de surfactantes.

A distribuição de um soluto entre duas fases geralmente reflete a atração ou repulsão relativa das moléculas do soluto competindo com as moléculas do refinato ou do extratante. As principais interações físicas são: interação dipolar, indução e interação por pontes de hidrogênio (DEAN, 1969). As interações químicas das espécies extratadas, geralmente na fase orgânica, deslocam o equilíbrio na direção da maior extratabilidade, a menos que, o produto da reação seja mais solúvel na fase aquosa (FREISER, 1973).

Partindo de uma mistura de ésteres metílicos e tocoferóis, em solução etanólica, se podem separar totalmente os tocoferóis com benzeno e éter isopropílico embora o delta-tocoferol apresente um rendimento de 78% de extração (HARA et alii, 1977).

O princípio de que um soluto não polar é mais solúvel num solvente não polar, e vice-versa, é fato aceito; entretanto, alguns solventes polares podem dissolver determinados solutos não polares; por exemplo, metanol dissolve triglicerídios.

A energia requerida para a ruptura das ligações solvente-solvente deve ser o suficiente mas não para impedir o ganho de energia da interação soluto-solvente. A solubilidade está em função da temperatura; assim, ao se atingir a temperatura crítica da solução, os líquidos se tornam miscíveis em todas proporções, por

exemplo, óleo de soja e acetona (JOHNSON & LUSAS, 1983).

Uma importante vantagem do método da extração com solventes é que permite, com facilidade, a análise das espécies extraídas (FREISER, 1973).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foi usado material comum de laboratório, como vidraria e instrumentos de uso diário. Os reagentes e produtos químicos na sua grande maioria foram de grau analítico p.a, de diversas procedências comerciais.

Os solventes, usados nas determinações analíticas e na obtenção do concentrado de tocoferóis, embora de grau analítico p.a, foram purificados no laboratório para remover as substâncias redutoras e oxidantes, normalmente presentes, as que interferem nas determinações analíticas dos tocoferóis. Hexano e heptano foram tratados segundo as recomendações da bibliografia (CONTRERAS, 1980; BUNNELL, 1967).

A limpeza do material de vidro usado nas determinações analíticas, foi efetuada segundo as recomendações da bibliografia (CONTRERAS, 1980).

3.1. MATÉRIA PRIMA

A matéria prima foi o destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS). Este resíduo foi cedido por uma indústria do Rio Grande do Sul.

O DDOS foi recebido no laboratório em tambores de 200 Kg e estocado a temperatura ambiente retirando-se periodicamente amostras menores. Estas foram acondicionadas em recipientes de polietileno, protegidas da luz e estocadas em refrigeração até sua utilização.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

3.2.1. Determinação do peso específico

Para esta determinação se usou um balão volumétrico

de 25 mL que após pesagem foi levado a volume com o DDOS à temperatura ambiente.

3.2.2. Determinação do índice de peróxidos

O índice de peróxidos foi determinado com os métodos números 2802 e 28024 da A.O.C.S. 1978.

3.2.3. Determinação do índice de acidez

O índice de acidez do DDOS foi determinado por volumetria, seguindo o procedimento descrito em 3.2.7.

3.2.4. Determinação de sólidos totais

Os sólidos totais foram determinados por gravimetria. A amostra foi dissolvida em etanol absoluto purificado e, após levada a um volume de referência, foram tomadas alíquotas as quais foram evaporadas até peso constante em estufa a 80°C.

3.2.5. Determinação de ácidos graxos totais e matéria insaponificável

Esta determinação foi realizada segundo os métodos números 28030 a 28035 descritos na AOAC 1980.

3.2.6. Determinação de matéria insaponificável

A matéria insaponificável do DDOS, foi determinada por gravimetria, segundo o método número 28035 da AOAC 1980.

Para extrair e analisar a matéria insaponificável (Figura 1), o extrato foi levado a um volume de 100 mL com etanol absoluto e desta solução foram retiradas alíquotas de 20 mL cada.

Cada alíquota foi transferida para proveta de 250 mL com tampa e, após a adição de solução de NaCl 5%, foram efetuadas extrações com hexano (4 x 25 mL). Os extratos hexânicos foram transferidos para funil de separação de 250 mL e lavados com etanol 30% (2 x 30 mL) e depois com água destilada (2 x 30 mL); esses extratos foram desidratados sobre sulfato de sódio anidro e aferidos a 100 mL com hexano.

Alíquotas de 10 mL foram evaporadas em estufa a 80 °C até peso constante sendo a matéria insaponificável calculada por gravimetria.

3.2.7. Determinação de ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres, presentes na amostra, foram determinados por volumetria, segundo o método descrito por KE e WOYEWODA, 1978.

No cálculo dos ácidos graxos livres se usou a seguinte expressão:

$$AGL = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 282 \cdot 100}{P}$$

onde:

AGL = ácidos graxos livres expressos em porcentagem
de ácido oléico

Va, Vb = Volume da base gasto na titulação da amostra e do branco respectivamente

N = normalidade da base

282 = peso equivalente ao ácido oléico

P = peso da amostra em mg

3.2.8. Determinação da composição de ácidos graxos totais por cromatografia em fase gasosa

O DDOS foi saponificado segundo os procedimentos descritos na AOAC 1980, métodos 28053 a 28068.

A saponificação foi efetuada em solução de KOH em etanol, extraíndo-se insaponificáveis com hexano na presença de cloreto de sódio para evitar emulsão. A mistura de sabões foi acidificada com ácido sulfúrico 30% e submetida a extrações com hexano.

O extrato de hexano, após lavagens com água, foi evaporado e re-dissolvido em éter de petróleo, neste último extrato se efetuou a reação de metilação segundo a bibliografia (METCALFE et alii, 1966).

Os metilésteres foram separados usando uma coluna de aço inox de 6' x 1/8' com 20% de PEGS sobre chromosorb W instalada num cromatógrafo Varian-2485D equipado com detector de ionização de chama. As condições operacionais foram 35, 250 e 30 mL/min de nitrogênio SS, ar sintético e hidrogênio SS, respectivamente. A temperatura do detector e injetor foi 210°C e da coluna foi de 180°C.

A identificação dos compostos eluídos foi feita no gráfico de Ackman (log Tr x Número de átomos de C), construído com uma mistura de padrões conhecidos. A quantificação foi realizada com a normalização interna do cromatograma.

3.2.9. Determinação de ácidos graxos livres por cromatografia em fase gasosa

Para esta determinação pesou-se uma amostra de um grama de DDOS a que foi dissolvida em 25 mL de hexano. A extração dos ácidos graxos livres foi feita com solução de 5% de carbonato de sódio (3 x 5 mL) na presença de cloreto de sódio.

A fase aquosa foi acidificada para a liberação dos ácidos antes saponificados, nesta etapa se usou 2 a 5 mL de ácido sulfúrico 30%. Os ácidos liberados foram extraídos com hexano (3 x 10 mL) e, após lavagens com água destilada, foi evaporado em estufa a 80 °C redissolvendo o resíduo em éter de petróleo e processada a reação de metilação de acordo com METCALFE, 1966.

Os metilésteres preparados foram analisados por cromatografia em fase gasosa usando as mesmas condições operacionais descritas no item 3.2.8.

3.2.10. Determinação de tocoferóis totais

Para a determinação dos tocoferóis totais, foi usada a reação com íons cúpricos.

O procedimento seguido é descrito por vários autores (CONTRERAS & STRONG, 1982a; 1982b; CONTRERAS et alii, 1982; CONTRERAS, 1980); alterado apenas nas quantidades das soluções reagentes usadas: 2,5 mL da solução de ácido ascórbico, 2,5 mL da solução de KOH etanólico e foi usada uma solução de etanol a 70%.

Para a determinação dos tocoferóis totais, na análise dos insaponificáveis (Figura 1), foram retiradas alíquotas de 1,0 mL do extrato hexânico, previamente desidratado e aferido a 100 mL. Essa alíquota foi levada a 10 mL com heptano e nessa solução se determinaram os tocoferóis totais.

3.2.11. Determinação de alfa-tocoferol e tocoferóis individuais

Utilizou-se a cromatografia em camada delgada para separar os tocoferóis do DDOS. Para tanto, seguiu-se o método descrito por CONTRERAS 1980, modificado no que diz respeito à quantidade de amostra, que foi de 250 a 300 mg e no preparo de placas preparativas: placas de 20 x 20 com fase estacionária de sílica gel G, ativada a 110 °C por 30 min, com 0,5 mm de espessura. A fase móvel foi hexano:acetato de etila (92,5:7,5v/v) segundo MULLER, 1976.

Foram aplicados 150 uL de amostra, na forma de bandas de 3 cm sendo que, nos extremos e no centro da placa, aplicou-se padrão de alfa-tocoferol (5,0 mg/mL de heptano). Após um desenvolvimento de 16 cm revelou-se o padrão usando o reagente de acetato cúprico e cuproína.

As áreas correspondentes ao alfa-tocoferol foram recolhidas num tubo de ensaio e extraídas com 6 mL de etanol, em banho maria por 20 min e agitação ocasional. Após filtração foi quantificado colorimetricamente mediante a reação da cuproína (CONTRERAS, 1980), usando-se um padrão de alfa-tocoferol recuperado da camada delgada (40 uL de solução-padrão 5,0 mg/mL de heptano aplicado em banda alternadamente entre as amostras).

Em outros ensaios foi usada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com BARATTA & CONTRERAS, 1986; usando as seguintes condições: concentração de amostra 1% em heptano injetando-se 5 uL numa coluna NH2-10-VARIAN, fluxo do solvente de eluição (hexano:isopropanol 99,5:0,5v/v) de 60 mL/Hr e pressão de 50 psi, detector UV-294 nm e sensibilidade 0,1 a 50 mV.

3.2.12. Determinação de esteróis totais

Os esteróis totais foram determinados por acetilação

em ácido sulfúrico (BARTOS & PEREZ, 1976). Para isto dissolveram-se 50 mg de DDOS em 10 mL de hexano purificado, retirada uma alíquota de 1,0 mL e levada a 5,0 mL com hexano. Um mL desta solução foi evaporada e dissolvida em 2,5 mL de ácido acético glacial seguida da adição de 5,0 mL da solução de anídrico acético : ácido sulfúrico (19 : 1). Depois de 35 min, a temperatura ambiente, foi lida a absorbância a 625 nm.

A concentração dos esteróis foi calculada mediante uma curva-padrão, preparada a partir de uma solução estoque de 500 ppm de esteróis totais (280 ppm de beta-sitosterol mais 110 ppm de campesterol mais 110 ppm de estigmasterol).

Para a determinação se retirou uma alíquota da solução estoque a que foi evaporada, em estufa a 80 °C, dissolvida e levada a um volume de referência com ácido acético glacial. A faixa da concentração usada foi de 0 a 1.250 ug de esteróis totais. Cada solução da curva-padrão foi levada a um volume de 2,5 mL com ácido acético e adicionados de 50 mL do reagente acetilante.

Para determinar o teor de esteróis totais no insaponificável (Figura 1), foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do extrato hexânico e, após evaporar o solvente em estufa a 80 °C, foram redissolvidas em 1,6 mL de ácido acético glacial e continuou-se com o mesmo procedimento.

3.2.13. Determinação de esteróis por cromatografia em fase gasosa

Para esta determinação pesaram-se 200 mg de DDOS, adicionaram-se 20 mL de etanol absoluto e 2 mL de KOH 50% e, após homogeneização, foi aquecida em sistema de refluxo por 30 min. A seguir transferiu-se para proveta de 100 mL adicionando-se 20 mL de NaCl 2% e homogeneização manual. Esta mistura foi extraída com hexano (4 x 15 mL) mediante agitação enérgica.

os extratos em hexano foram transferidos para funil de separação de 250 mL e lavados com etanol 33% (3 x 10 mL). A fase hexânica foi desidratada sobre Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório até quase secura; esse extrato foi recuperado em 2 mL de heptano e purificado em camada delgada preparativa (Sílica gel G 20 x 20 cm e 0,50 mm, sistema de desenvolvimento de hexano : acetato de etila 92,5 : 7,5). As amostras foram aplicadas em bandas de 3 cm e nos extremos da placa foi colocada uma mistura padrão-monitor.

Após um desenvolvimento de 16 cm revelaram-se apenas os monitores com mistura sulfocrômica e localizaram-se assim as áreas correspondentes aos esteróis das amostras. Cada área foi recolhida num tubo de ensaio e extraídas com 5 mL de metanol e agitação por 5 min a 40 - 50 °C.

Os extratos metanólicos foram injetados num cromatógrafo de gás (Perkin Elmer, Sigma 3B) equipado com uma coluna de aço inox (6' x 1/8") contendo 3% OV-17 sobre chromosorb W-HP 100-120 mesh. As condições operacionais dessa separação foram:

Temperatura de detector	=	310 °C
Temperatura de injetor	=	310 °C
Temperatura de coluna	=	260 °C (isoterma)
Nitrogênio SS	=	50 mL/min
Ar sintético	=	200 mL/min
Hidrogênio SS	=	35 mL/min

Cada componente eluído foi identificado pelo seu tempo de retenção relativo e por comparação com um padrão. A quantificação foi realizada por normalização interna do cromatograma.

3.2.14. Determinação de hidrocarbonetos

O método descrito por CONTRERAS, 1980, para a determinação de hidrocarbonetos, foi adaptado no seguinte procedimento.

Dissolveram-se 1,50 g do DDOS em 25 mL de uma solução 0,5 N em KOH/etanol e preparado o insaponificável como foi descrito anteriormente.

Uma alíquota de 10 mL, dos insaponificáveis em hexano desidratada, foi cromatografada numa coluna de sílica gel (25x 125 mm) coletando-se duas frações do processo da eluição.

A primeira fração foi coletada da eluição de 60 mL de hexano e a segunda após a eluição de 150 mL de metanol.

Os hidrocarbonetos foram calculados por gravimetria das frações coletadas com hexano, após evaporação até peso constante.

Uma alíquota da segunda fração foi evaporada para determinação dos sólidos permitindo comprovar se a eluição do material aplicado na coluna tinha sido completa.

3.3. ANÁLISE DA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL

A matéria insaponificável do DDOS (1,5 g), obtida de acordo com o item 3.2.6 foi analisada seguindo o diagrama esquemático da Figura 1.

O índice de saponificação foi determinado pelo método oficial número Cd-3-25 (AOCS, 1978), realizando algumas modificações como a retirada de uma alíquota de 10 mL do extrato resultante da saponificação do DDOS que após ser aferido a um volume de referência de 100 mL, com etanol absoluto, foi transferido para erlenmayer de 250 mL onde se adicionou 30 mL de etanol absoluto.

Para a titulação foi usada uma solução de HCl a 0,1079N, na presença de fenolftaleína. Na solução-branco foi usado 25 mL de KOH e prosseguiu-se de maneira semelhante à amostra.

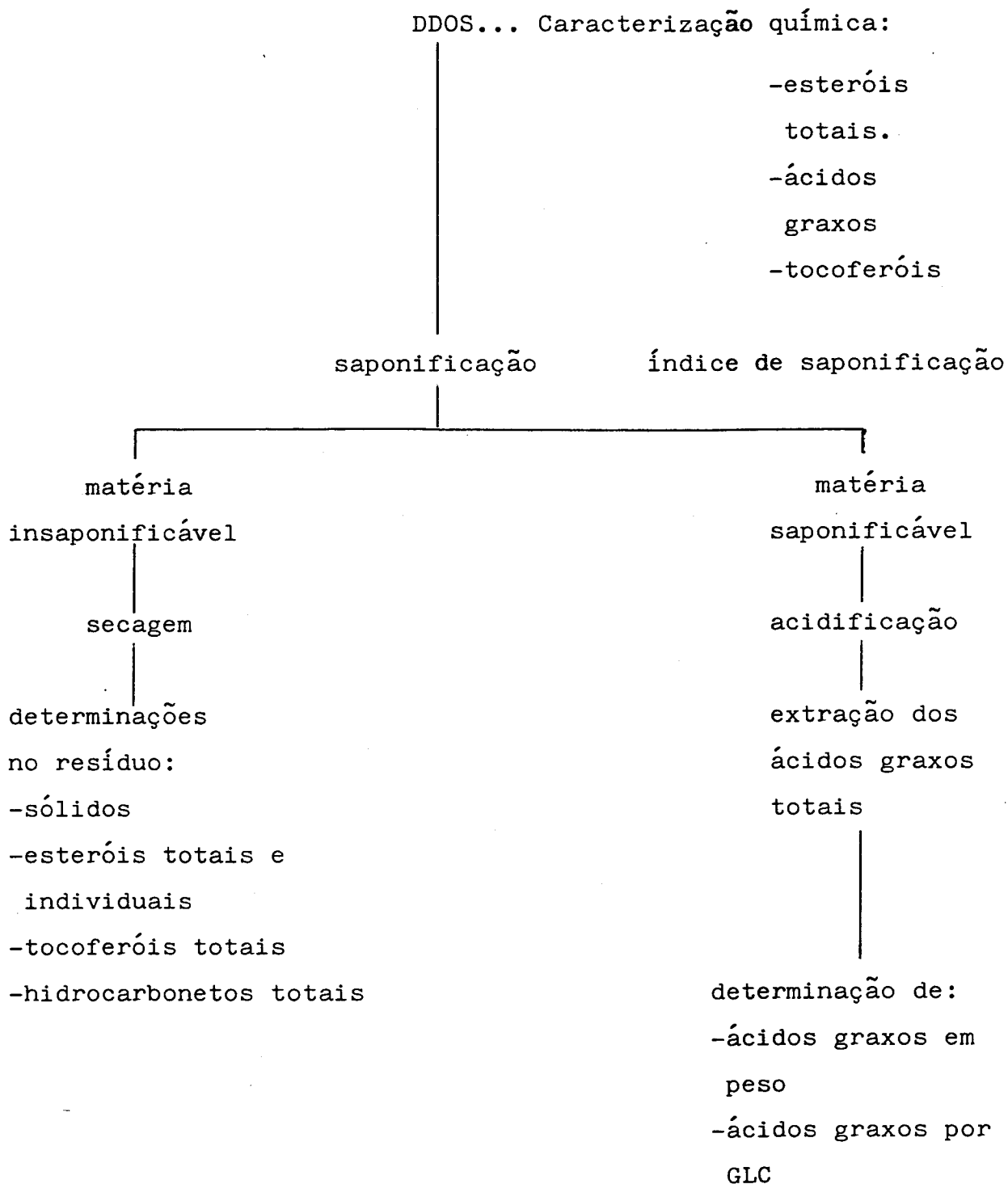


FIGURA 1. Diagrama esquemático geral para a análise do DDOS cru e do material insaponificável do mesmo produto

No material saponificado foram quantificados os ácidos graxos resultantes da extração dos insaponificáveis. Os ácidos graxos foram extraídos com heptano (4 x 5 mL) na presença de NaCl e ácido sulfúrico. Uma alíquota de 10 mL desse extrato foi evaporada até peso constante em estufa a 80 °C e calculadas as percentagens de ácidos graxos totais.

Paralelamente foi realizada uma determinação volumétrica segundo o procedimento descrito por KE & WOYEWODA, 1978. Para tanto, 5,0 mL do extrato dos ácidos graxos, em heptano, foram adicionados a 50 mL da mistura clorofórmio : isopropanol : metanol (1 : 1 : 0,5) e se continuou com o mesmo procedimento da bibliografia.

3.4. PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO CONCENTRADO DE TOCOFERÓIS

A concentração dos tocoferóis foi estudada por extração seletiva com diferentes álcoois e acetona e por partição entre hexano e etanol hidratado como consta na Figura 2.

3.4.1. Estudos de extração de impurezas com solventes hidrofílicos.

Primeiramente foi testada uma separação seletiva de impurezas com misturas aquosas de metanol (M), etanol (E) e acetona (A), estudados individualmente. Não foram usados esses solventes puros por dissolverem todo o DDOS; portanto foram adicionadas de diversas percentagens de água para provocar a separação das duas camadas. Trata-se de uma "pseudo-partição" já que só existe um solvente (álcool ou acetona) formando uma camada e o restante do DDOS permanece líquido formando a outra camada.

As porções solvente:água para a dissolução seletiva dos componentes do DDOS aparecem no Quadro 7.

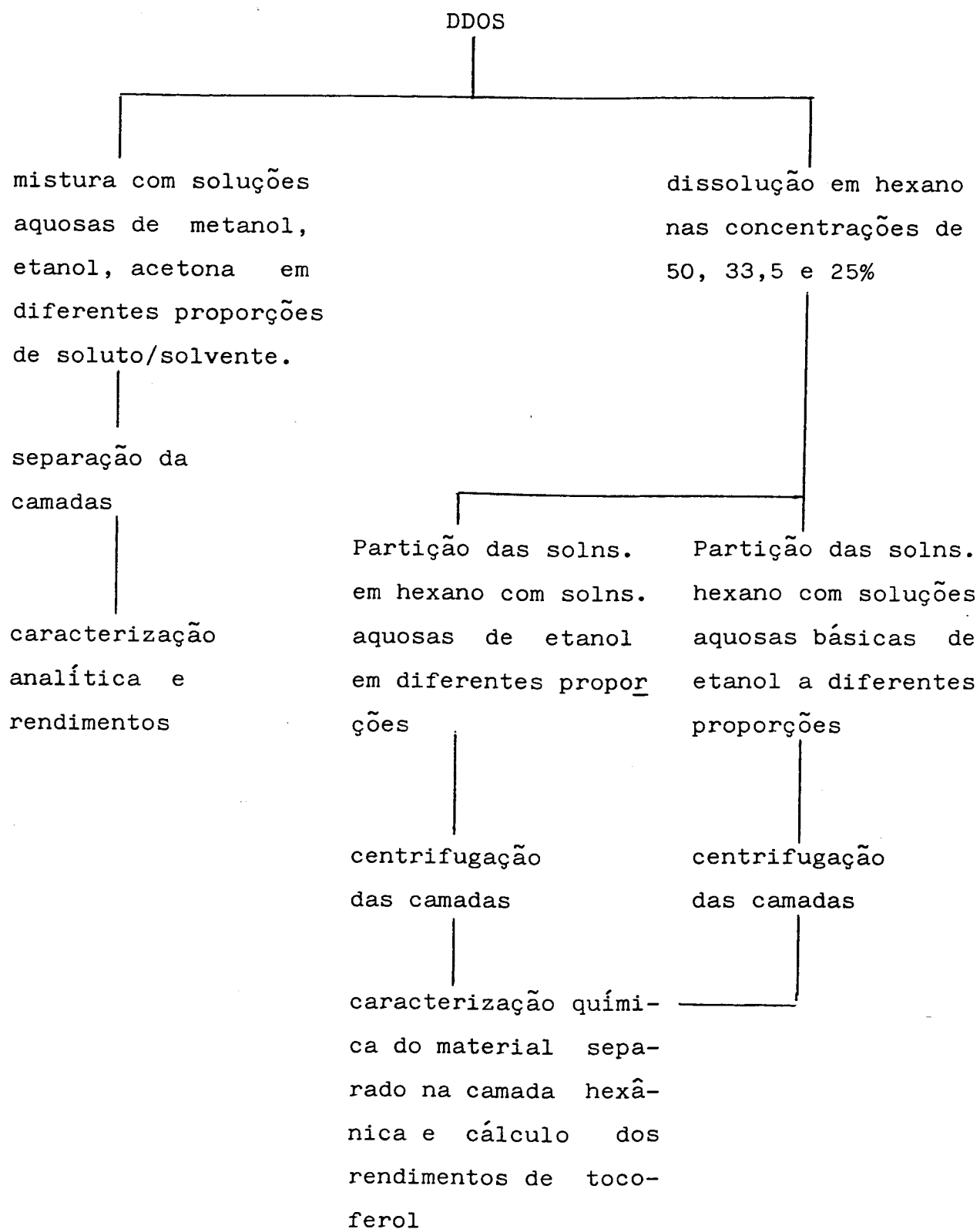


FIGURA 2. Diagrama esquemático para a obtenção de um concentrado de tocoferóis por extração com solventes.

QUADRO 7. Proporções solvente:água nos sistemas usados para redução de impurezas por dissolução seletiva.

Identificação dos solventes	Proporção (v/v)	
	Solvente	Água
(M, E, A) 95%	95	5
(M, E, A) 90%	90	10
(M, E, A) 85%	85	15
(M, E, A) 80%	80	20

(M = metanol, E = etanol, A = acetona)

No total foram preparados 12 solventes.

3.4.1.1. Efeito da concentração do solvente

Testaram-se cinco relações do DDOS/solvente hidrofílico conforme os dados do Quadro 8.

QUADRO 8. Relações soluto/solvente testadas para separação por dissolução seletiva dos compostos do DDOS.

Relação DDOS/Solvente	Quantidade	
	DDOS (g)	Solvente (mL)
0,40	5,0	12,5
0,20	5,0	25,0
0,13	5,0	37,5
0,10	5,0	50,0
0,08	5,0	60,0

As 5 relações DDOS/solvente, combinadas com os 12 solventes, do Quadro 7, resultaram em 60 tratamentos.

Os ensaios foram realizados em tubos graduados de 100 mL, com tampa, estabelecendo-se um peso de 5,00 g de DDOS para cada relação soluto/solvente nos sistemas M, E, e A no Quadro 8.

Os tubos foram agitados energicamente por um min. e, após repouso por 10 min. a temperatura ambiente, centrifugados a 1000 rpm por dois min.; dessa forma separou-se uma fase superior e uma inferior, ambas foram medidas e separadas alíquotas para as determinações analíticas.

3.4.2. Estudos da partição do DDOS com hexano e etanol a diferentes graus de hidratação.

Este grupo de testes corresponde a experimentos de partição verdadeira pois no sistema existem 2 solventes não miscíveis.

O hexano serviu de veículo para carregar o DDOS e também como fase hidrofóbica do sistema. Para este fim foram preparadas três soluções base de DDOS em hexano mantendo as proporções do quadro seguinte:

QUADRO 9. Proporções DDOS e hexano usadas no preparo das soluções base de DDOS.

Identificação	DDOS (g)	Hexano (mL)	vol. total
DDOS 50,0%	50,0	45,2	100
DDOS 33,3%	33,5	63,3	100
DDOS 25,0%	25,0	72,6	100

3.4.2.1. Misturas hidroetanólicas a serem usadas no sistema com hexano.

Foram preparadas as seguintes misturas hidroetanólicas nas proporções descritas no Quadro 10.

QUADRO 10. Soluções hidroetanólicas testadas na obtenção do concentrado de tocoferóis.

Identificação	Proporção (v/v)	
	Etanol	Água
Etanol 80%	80	20
" 75%	75	25
" 70%	70	30
" 65%	65	35
" 60%	60	40
" 55%	55	45
" 50%	50	50

As extrações (partições) foram efetuadas com cada uma das soluções em hexano mantendo-se um volume fixo de 15 mL para cada solução-base e adicionando suficiente solução hidroetanólica para obter as seguintes relações de DDOS/etanol hidratado.

QUADRO 11. Relações DDOS/etanol aquoso (D/E) e hexano/etanol aquoso (H/E) nas partições para purificação de tocoferóis do DDOS

Sol. Base + Etanol aq. (mL) (mL)		Concentração da sol. base					
		50%		33,5%		25%	
		D/E	H/E	D/E	H/E	D/E	H/E
15 + 12,5		0,6	0,54	0,40	0,76	0,30	0,87
15 + 25,0		0,3	0,27	0,20	0,38	0,15	0,44
15 + 37,5		0,2	0,18	0,13	0,25	0,10	0,29
15 + 50,0		0,15	0,14	0,10	0,19	0,075	0,22
15 + 62,5		0,12	0,11	0,08	0,15	0,060	0,17

Os componentes do sistema, mantendo as relações do Quadro 11, foram agitados durante um min., sendo logo centrifugado a 1000 rpm; os volumes das camadas foram registrados e analisados.

3.4.2.2. Efeito da adição de hidróxido de potássio no comportamento da partição com hexano e os solventes hidrofílicos.

Para esta finalidade testou-se o efeito da alcalinização das misturas hidroetanólicas com KOH. Para tanto foi adicionado KOH a nível de 1,0% procedendo-se às extrações segundo o descrito em 3.4.2.

3.4.2.3. Monitoramento das extrações

Todas as extrações foram acompanhadas quanto ao teor de sólidos totais e tocoferóis totais das fases superiores (hexânicas) e com uma diluição de até 1250 vezes, seguindo-se os procedimentos descritos em 3.2.4 e 3.2.10 respectivamente.

Para selecionar os sistemas que permitissem otimizar a concentração de tocoferóis, foram considerados o tipo de solvente, proporção solvente/água e a relação soluto/solvente.

3.4.2.4. Parâmetros de avaliação da efetividade das partições.

Na posse dos dados dos volumes da camada hexânica, teor de sólidos totais, e tocoferóis totais e da quantidade inicial de DDOS, submetida a extração, obtiveram-se as seguintes relações:

- a) SE = sólidos totais extratados na camada hexânica
- b) SA = sólidos totais na amostra submetida a extração
- c) RS = rendimento da extração de sólidos = $(SE/SA) \times 100$
- d) TE = tocoferóis extratados na camada hexânica (g)
- e) TA = tocoferóis na amostra submetida a extração (g)
- f) RT = rendimento dos tocoferóis = $(TE/TA) \times 100$
- g) CTA= concentração de tocoferóis na amostra inicial (%)
- h) CTE= concentração de tocoferóis na amostra extratada (%)

i) V = volume da camada hexânica (mL)

Ainda foram calculadas duas expressões aritméticas que permitem visualizar melhor os méritos dos sistemas de partição. Uma primeira expressão, nomeada como "A", representa o acréscimo de concentração de tocoferóis:

$$A = CTE - CTA$$

o acréscimo "A" multiplicado pelo rendimento (RT/100), dá um fator que representa a eficiência do sistema de partição em questão:

$$E = (CTE - CTA) \times (RT/100)$$

a diferença CTE - CTA terá um valor máximo de 91,5 que será atingido quando CTE seja 100% já que CTA terá um valor fixo (nestes experimentos) de 8,5%. RT/100 terá um valor máximo de 1,0 quando RT = 100%, de modo que variará entre 0 e 1,0; portanto:

$$91,5 \geq E \geq 0$$

valores de E negativos indicaram que a fração descartada (alcoólica) era mais concentrada em tocoferóis que a fração hexânica usada para análises.

Outra forma de avaliar o processo é comparar a concentração de tocoferóis real com a concentração teórica para igual teor de sólidos totais removidos no álcool.

Deste modo se evita que os valores reais sejam comparados com valores teóricos irreais pois os solventes só extrairão grupos de substâncias com propriedades afins e não qualquer classe de compostos.

Não poderia se esperar, por exemplo, que o etanol ou o meta-

no aquoso remove hidrocarbonetos e lipídios neutros que de fato são insolúveis em solventes aquosos; porém, poderá extrair lipídios polares e consequentemente reduzir o teor de sólidos da camada hexânica em proporção aos teores dessas substâncias no DDOS.

Pode-se ainda definir um parâmetro de "seletividade" (S) a uma relação entre o rendimento de tocoferóis totais RT(%) e o rendimento de sólidos totais RS:

$$S = (RT\%)/(RS\%)$$

se essa relação for maior que 1,0 o sistema tem seletividade para tocoferóis.

3.4.2.5. Caracterização do concentrado de tocoferóis

O extrato obtido com os sistemas que apresentaram as maiores eficiências, foram caracterizados quanto a seus teores de: sólidos totais, tocoferóis totais, esteróis totais e hidrocarbonetos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A matéria prima, DDOS, é um material oleoso a temperatura ambiente, de odor penetrante com uma cor marrom escuro; cujas principais características, estão descritas no Quadro 12.

QUADRO 12. Principais características físicas e químicas do DDOS

Características	média $\pm$ d.p	
Peso específico (g/mL)	0,9116	$\pm$ 0,0003
Índice de peróxidos (meq/Kg)	3,40	$\pm$ 0,28
Índice de acidez (g ácido oléico/100 g)	37,09	$\pm$ 0,83
Índice de saponificação (mg de KOH/g)	159,40	$\pm$ 0,05
Sólidos totais (%)	95,26	$\pm$ 0,85

Os valores médios e desvio padrão resultaram de oito determinações feitas no mesmo lote do DDOS (200 Kg), porém, em diferentes ocasiões através da pesquisa.

Os dados mais importantes do Quadro 12 referem-se ao baixo teor de peróxidos, e ao elevado valor da acidez, demonstrando que este material acumula ácidos graxos livres cuja eliminação é uma das principais finalidades desta pesquisa.

4.2. COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A composição do DDOS se encontra reportada no Quadro 13.

QUADRO 13. Composição porcentual do DDOS

Componentes	(%)
Ácidos graxos totais (a)	65,50
Ácidos graxos totais (b)	58,13
Ácidos graxos totais (c)	60,13
Ácidos graxos livres	37,09 $\pm$ 0,83
Matéria insaponificável (d)	26,10
Matéria insaponificável (e)	36,46 $\pm$ 0,91
Tocoferóis totais	8,50 $\pm$ 0,31
alfa-tocoferol	1,40
Esteróis	17,05 $\pm$ 0,07
Hidrocarbonetos	4,40

- a) determinados com o método gravimétrico da AOAC 1980
- b) determinados com o método gravimétrico descrito em CONTRERAS, 1980
- c) determinados com o método volumétrico descrito KE & WOYEWODA, 1978. Expresso em porcentagem de ácido oléico
- d) determinado com o método gravimétrico da AOAC, 1980.
- e) determinado com o método gravimétrico descrito em CONTRERAS, 1980

As análises pormenorizadas do DDOS revelam a complexidade deste resíduo que se aproveitado exaustivamente seria uma boa fonte de esteróis vegetais e tocoferóis (vitamina E).

Comparando com os dados da literatura (CONTRERAS, 1980; FELLI & GASPAROLI, 1977; HOFFMANN et alii 1964) percebe-se que os teores de tocoferóis, esteróis, hidrocarbonetos e ácidos graxos se encontram dentro das faixas ali reportadas. Trata-se então de um DDOS bastante típico o que permitirá extrapolar as informações desta pesquisa para ensaios com outros resíduos.

4.2.1. Composição do DDOS em ácidos graxos

A composição do DDOS, em ácidos graxos, determinados por cromatografia gasosa apresenta-se no Quadro 14 e nas Figuras 3 e 4.

QUADRO 14. Composição de ácidos graxos do DDOS comparado com a composição do óleo de soja.

Átomo C.	Ác. graxo	Óleo de soja (%)	DDOS (%)	AGT (%)	AGL (%)
10	Caprílico	-	tr	-	0,28
12	Láurico	tr	1,10	3,38	1,78
	ni	-	tr	0,12	tr
	ni	-	tr	-	tr
14	Mirístico	0,05	tr	0,78	5,58
	ni	-	-	tr	-
14:1	-	-	tr	0,27	0,96
14:2	-	-	tr	0,83	0,64
16	Palmitico	10,87	23,11	19,39	25,60
16:1	Palmitoléico	-	-	0,39	0,64
	ni	-	-	tr	1,44
	ni	-	-	-	1,44
16:2	-	-	-	0,28	-
	ni	-	-	tr	-
18	Estearico	3,48	3,59	4,82	9,36
18:1	Oléico	21,76	19,52	21,95	24,48
18:2	Linoléico	57,06	48,51	40,23	20,00
18:3	Linolênico	6,47	3,88	-	tr
	ni	-	-	tr	-
	ni	-	-	tr	-
20	Araquídico	0,33	tr	tr	2,40
20:1	-	-	-	7,56	2,40
20:2	-	-	-	tr	-
	ni	-	-	tr	tr
	ni	-	-	tr	tr
	ni	-	-	tr	-
22	-	-	-	-	tr

- = não detectado.

tr = traços.

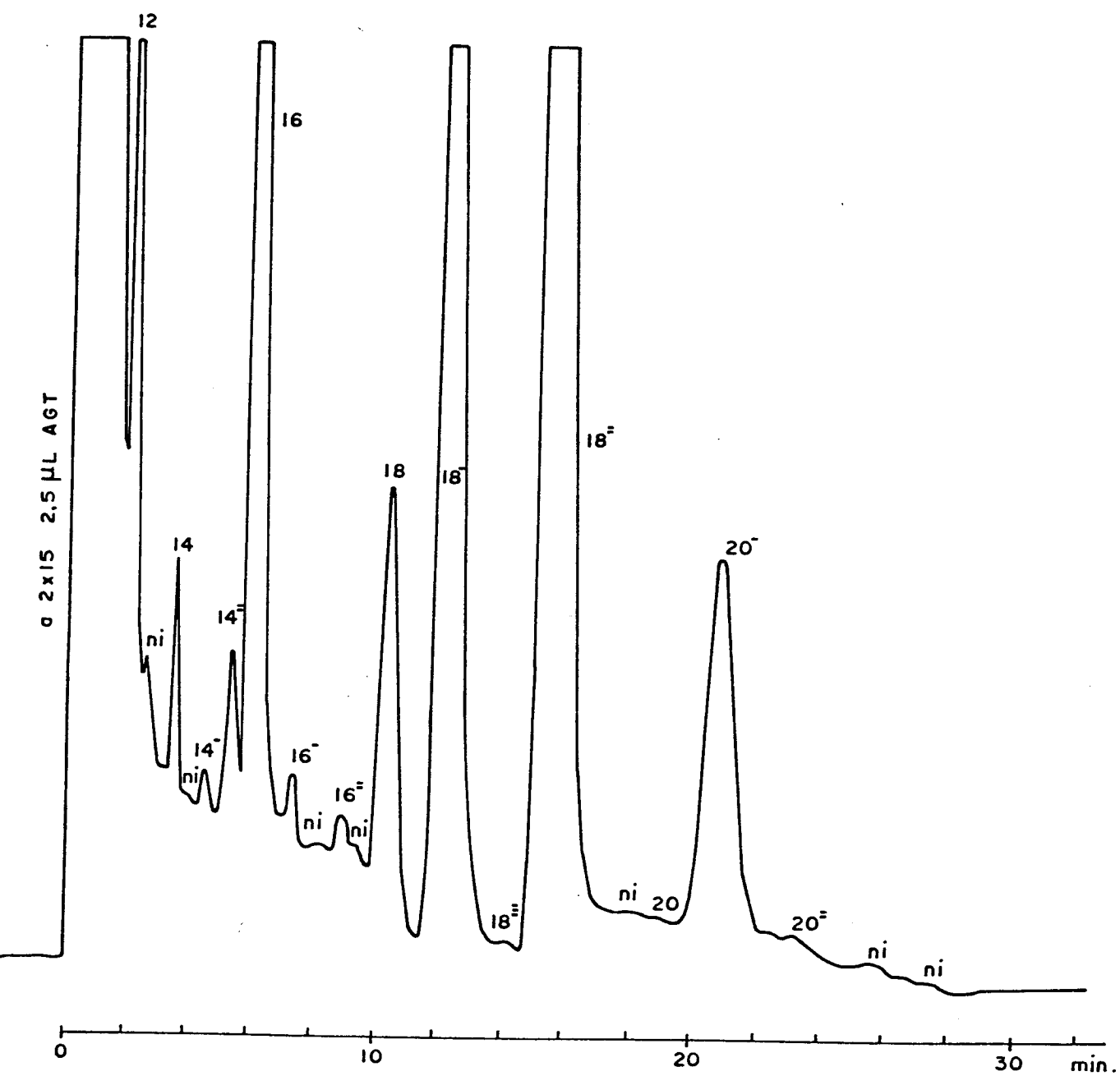


FIGURA 3. Cromatograma dos ácidos graxos totais do DDOS.

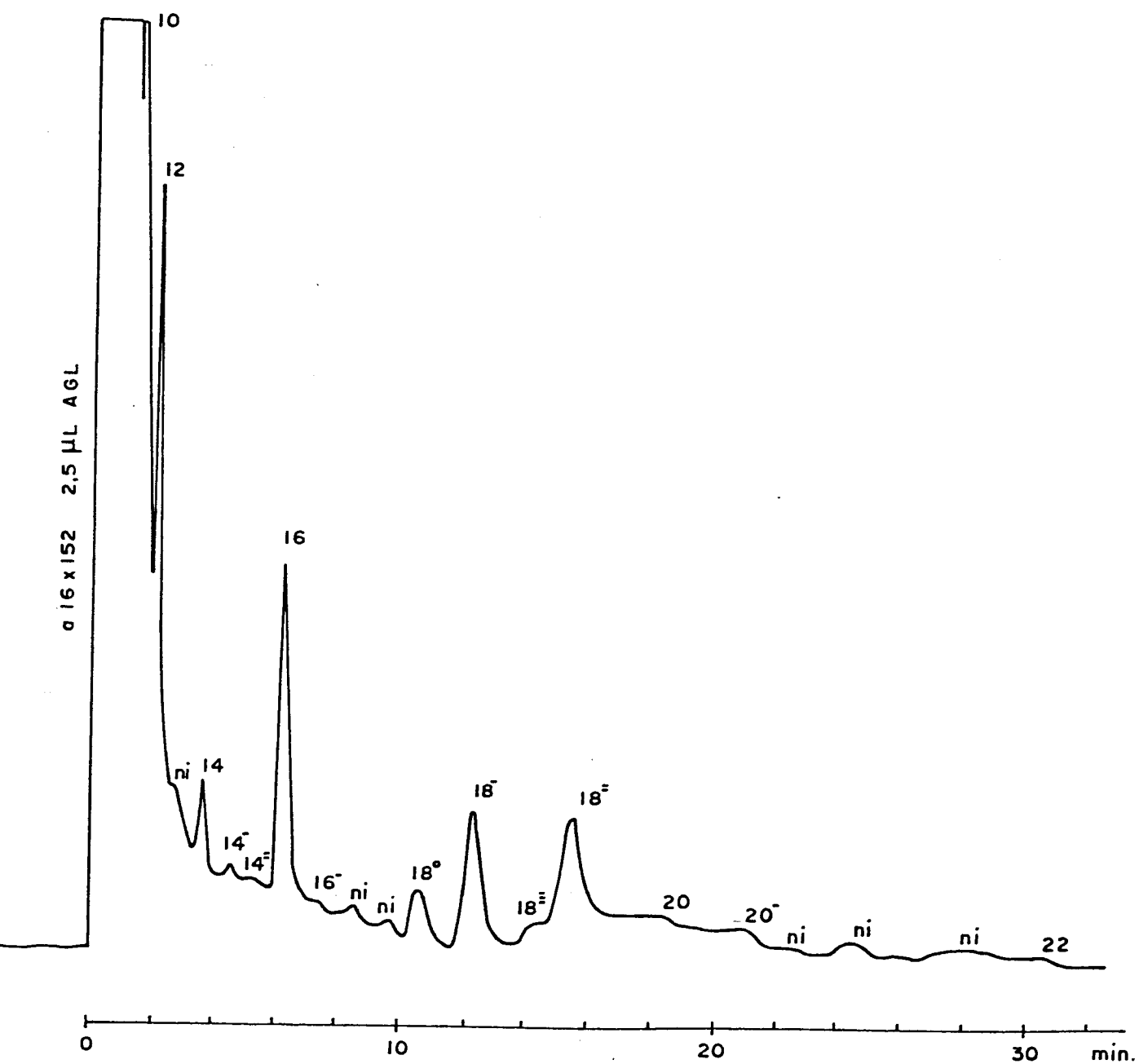


FIGURA 4. Cromatograma dos ácidos graxos livres do DDOS.

Nas amostras de ácidos graxos totais e livres do DDOS e no óleo de soja, se apresentaram alguns componentes não identificados (ni) ou em quantidades menores que 0,05% (tr). Alguns deles foram detectados no DDOS porém não apareceram no óleo de soja.

É necessário lembrar que o método de saponificação oferece muitos inconvenientes para eliminar ácidos graxos livres de baixo peso molecular (LOURY, 1967).

As amostras de AGL e AGT apresentaram alguns componentes que eluíram com o solvente quando se usou uma isoterma de 180 °C; porém, quando foi usado um programa linear de temperatura de coluna (150 a 180 °C a 0,5 graus/min), registraram-se, no mínimo seis compostos, bem resolvidos não podendo ser identificados por falta de padrões.

Aparte do aumento qualitativo e quantitativo de ácidos de cadeia média no DDOS, quando comparado com óleo de soja, é possível notar um grande acréscimo de ácido palmítico no DDOS indicando uma certa facilidade de hidrólise dos triglicerídios contendo este ácido graxo. Provavelmente a sua posição na molécula do glicerol seja responsável por esta susceptibilidade.

O ácido linolênico, pelo contrário encontra-se em menor proporção no DDOS fato que pode ser explicado de novo pela posição preferencial no carbono 2 da molécula do glicerol. É interessante notar que os ácidos palmítico, esteárico e oléico existem no DDOS em maior proporção na forma livre enquanto que os ácidos linoléico e linolênico aparecem esterificados com esteróis, hidrocarbonetos e outros compostos, alguns destes ésteres podem ter sido formados durante o próprio processo de refino.

4.2.2. Composição dos tocoferóis individuais do DDOS.

Os tocoferóis individuais existentes na amostra de DDOS são mostrados na Figura 5. Estes constituintes foram determi

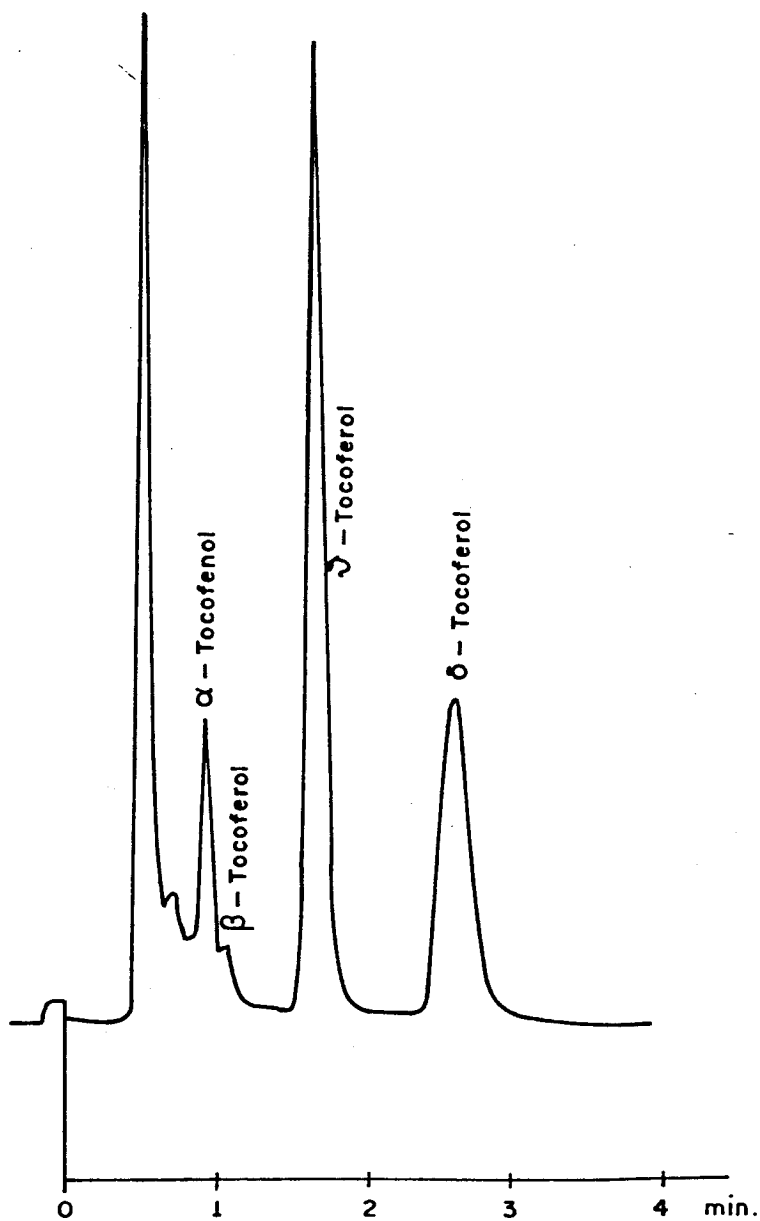


FIGURA 5. Separação dos tocoferóis do DDOS, sem processamento, por cromatografia líquida de alta eficiência.

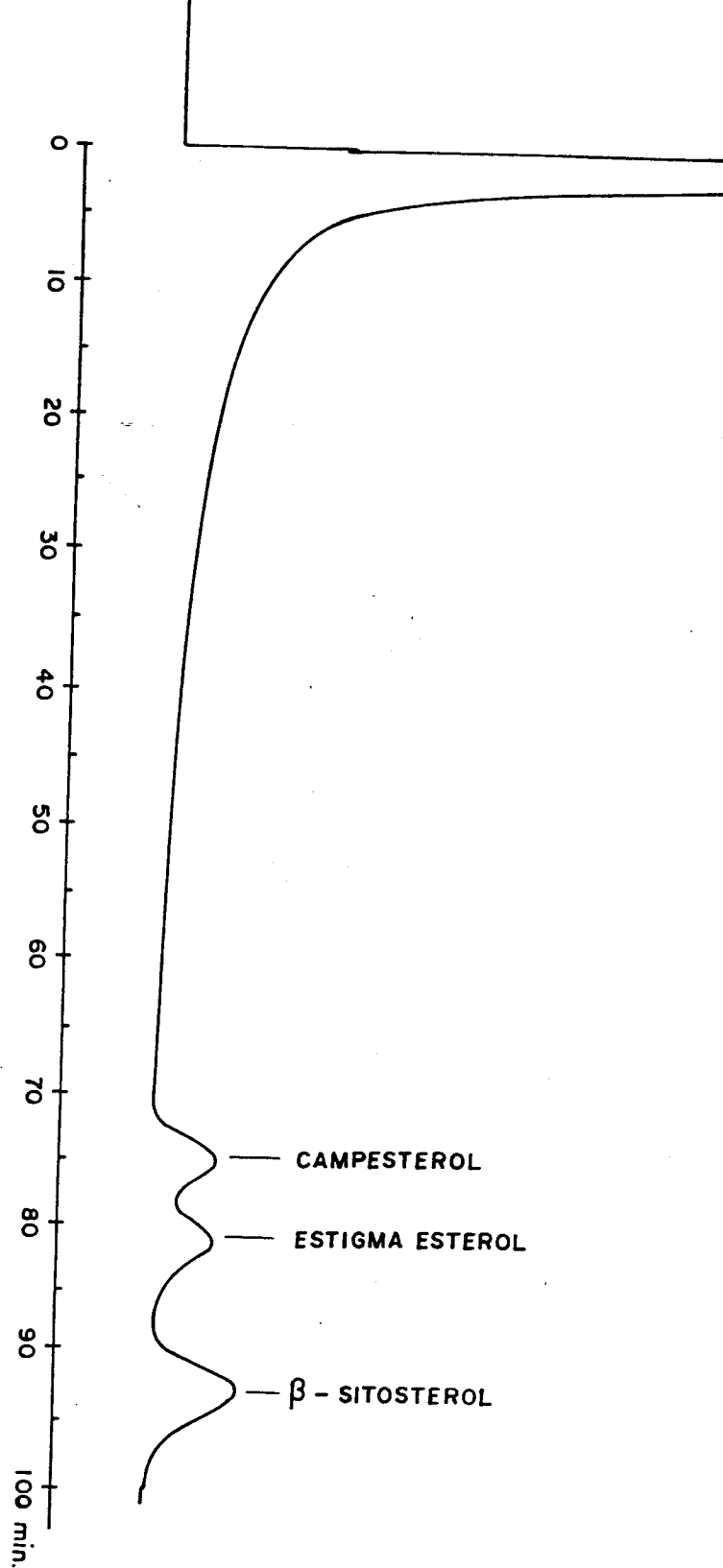


FIGURA 7. Separação dos esteróis do DDOS, por cromatografia em fase gasosa.

nados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e sua distribuição percentual se encontra no Quadro 15.

QUADRO 15. Composição percentual de tocoferóis do DDOS

Tocoferóis	Porcentagem	(tr')r
α -tocoferol	13,40	0,58
β -tocoferol	n.q.	0,64
γ -tocoferol	54,30	1,00
δ -tocoferol	32,30	1,58

(tr')r = tempo de retenção relativo, corrigido ao γ -tocoferol.
n.q. = não quantificável

Em referência à Figura 5, fica comprovado que o contribuinte principal é o gama-tocoferol sendo que o alfa-tocoferol (vitamina E) corresponde a 13,4% dos tocoferóis totais do DDOS.

4.2.3. Composição do DDOS em esteróis livres

Os esteróis livres do DDOS, determinados por cromatografia em fase gasosa, estão representados no cromatograma da Figura 7 e Quadro 16.

QUADRO 16. Composição percentual de esteróis do DDOS

Esteróis	Porcentagem	(tr')r
Campesterol	24,45	0,30
Estigmasterol	20,85	0,55
Beta-sitosterol	54,70	1,00

(tr')r = tempo de retenção relativo, corrigido ao beta-sitosterol.

A composição percentual em campesterol, estigmasterol e beta-sitosterol, encontrada no DDOS, está de acordo com resultados publicados por outros autores (NAUDET et alii, 1973; FEDELI & GASPAROLI, 1977; ITOH et alii, 1973); porém, existe uma ligeira divergência quanto aos tempos de retenção relativa entre os resultados do Quadro 16 e os publicados por FEDELI et alii, 1966; devido, provavelmente, às condições operacionais da cromatografia em fase

gasosa serem diferentes.

O termo (tr')r, foi usado conforme indicado na bibliografia (FEDELI et alii, 1966), calculado do cromatograma dos padrões de esteróis, esse critério serviu de base para a identificação dos esteróis do DDOS.

4.3. COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO DDOS

A matéria insaponificável do DDOS ficou entre 26,10 e 36,46% segundo o método aplicado na determinação. Os componentes principais aparecem no Quadro 17.

QUADRO 17. Composição porcentual da matéria insaponificável (*) do DDOS

Componentes	(%)
Tocoferóis totais	28,21
alfa-tocoferol	4,96
Esteróis totais	56,24
Hidrocarbonetos	14,83

(*) resultados são a média de três repetições, com uma matéria insaponificável de 29,67%.

A diferença de 1,79% de matéria insaponificável do DDOS, encontrada nos Quadros 13 e 17, provavelmente se deva às diferentes operações e métodos usados; porém, estes valores estão dentro os limites de aceitação do erro dos métodos gravimétricos (SKOOG & WEST, 1984).

Os resultados encontrados na composição da matéria insaponificável do DDOS, Quadro 17, coincidem com resultados de outros autores (BARATTA & CONTRERAS, 1984; CONTRERAS, 1984; FEDELI & GASPAROLI, 1977); porém, ligeiramente menores que os encontradôs em (NAUDET et alii, 1973; MATTIL, 1964), sendo de esperar essas diferenças uma vez que, a composição do DDOS está em função do cultivar de soja processado, condições operacionais da desodorização e manejo posterior do DDOS.

A análise da fração insaponificável revela que a eliminação dos ácidos graxos de 100 g do DDOS deixará um resíduo de 29,67 g. O conteúdo de tocoferóis no DDOS era então de 8,36 g, um dado que coincide com o valor 8,50 do Quadro 13. Expressos como percentagens do insaponificável, os tocoferóis correspondem a 28,21% indicando que este seria a concentração máxima que poder-se-ia atingir pelo método de saponificação.

Dado as dificuldades de trabalhar com saponificação, esta eventual opção para purificação de tocoferóis é remota. Além do mais o processo é caro pois utiliza vitamina C e volume relativamente grandes de solventes para recuperação do insaponificável. Por esta causa decidimos tentar a pré-purificação dos tocoferóis por extração com solventes e por partição entre dois solventes imiscíveis.

4.4. ESTUDOS DE PURIFICAÇÃO DE TOCOFERÓIS DO DDOS POR EXTRAÇÃO COM SOLVENTES

O Quadro 13 mostrou que o DDOS é um material extremamente complexo e portanto, para purificar os tocoferóis eram necessários vários processos concatenados. Porém, qualquer um que seja o processo de separação definitivo, se impõe um pré-processamento para diminuir a carga de impurezas grosseiras. Entre as maiores impurezas encontram-se os ácidos graxos que perfazem 65% do peso total do DDOS. A fração de ácidos graxos livres perfaz 37% do total do DDOS apresentando boas perspectivas para sua eliminação já que estes compostos são mais polares que os ésteres. No entanto a eliminação de todos os ácidos graxos livres causaria apenas um acréscimo de concentração de tocoferóis desde 8,5% para 13,5%, sempre que não fosse extraído tocoferol no solvente.

A Figura 8 mostra como aumentaria a concentração teórica de tocoferóis se fossem eliminados nos solventes os diversos grupos de substâncias presentes no DDOS.

A curva ideal da variação da concentração versus o teor de sólidos eliminados, foi obtida supondo que se extrair por exemplo

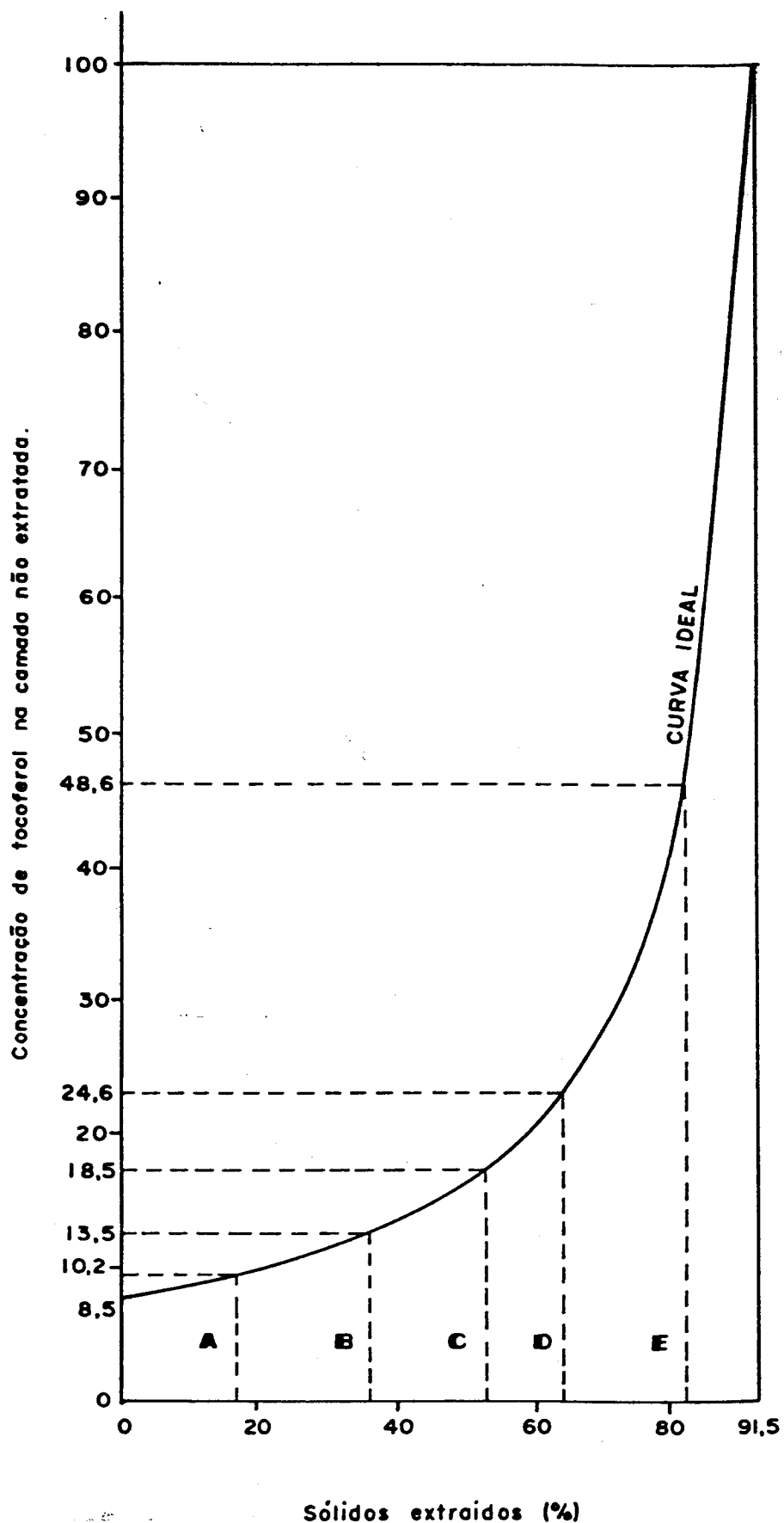


FIGURA 8. Concentração teórica de tocoferóis que resultaria de extrair os esteróis totais (A), os ácidos graxos livres (B), a soma de esteróis e ácidos graxos livres (C), todos os ácidos graxos (D) e os esteróis e ácidos graxos totais (E).

20 g de sólidos de 100 g de DDOS, os 80 g não extraídos acumulam os 8,5 g de tocoferóis da amostra aumentando-se a concentração para 10,63% $(8,5/80,0) \times 100$. Da mesma maneira foram feitos cálculos para 40, 60 e 80% de remoção, dando valores de 14,17; 21,25 e 42,5% de tocoferóis. Supondo que fossem removidos todos os materiais acompanhantes ficariam os 8,5 g de tocoferóis que teriam uma concentração de 100%. Este ocorrerá quando sejam eliminados 91,5 g do DDOS original.

Na percepção desta situação, pode se deduzir que o uso de processos puramente extrativos não permitirá ir muito longe no aumento da concentração dos tocoferóis, além de que parte dos tocoferóis serão removidos com o solvente de forma inevitável afetando o rendimento. Portanto, os processos rápidos e baratos como as extrações e partições que se apresentam a continuação tem apenas o objetivo de preparar o extrato para processos mais sofisticados que não são abordados neste trabalho. A redução da carga de impurezas permitiria reduzir o tamanho das instalações para cristalização e/ou destilação com alto vácuo tornando-se um fator decisivo no custo final.

4.4.1. Extração de impurezas do DDOS com metanol

Os Quadros 18, 19, 20 e 21 mostram os resultados do tratamento de 5 g de DDOS com diferentes volumes de metanol em concentrações desde 80 até 95%. A observação desses resultados permite deduzir o seguinte:

Na extração de sólidos totais, o valor do RS(%), representando a percentagem de sólidos não dissolvidos na camada metanólica, aumenta com a hidratação do metanol e, para uma diluição específica, se reduz com a diminuição da relação DDOS/solvente.

O metanol 80% na relação 0,4 dissolve apenas 2,94% do DDOS (RS = 97,06); portanto, seria impossível obter um aumento subs

QUADRO 19. Rendimento de sólidos e tocoferóis após extração do DDOS com metanol 85% (p/v), em diferentes relações soluto/solvente - análises realizadas na camada não metanólica.

Parâmetros	DDOS/metanol 85%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	4,51	4,26	4,00	3,78	3,60
RS (%)	94,75	89,50	84,03	79,41	75,63
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,40	0,39	0,38	0,38	0,38
RT (%)	100,00	97,50	95,00	95,00	95,00
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,87	9,15	9,50	10,05	10,56
E	0,37	0,63	0,95	1,47	2,00

QUADRO 20. Rendimento de sólidos e tocoferóis após extração do DDOS com metanol 90% (p/v), em diferentes relações soluto/solvente - análises realizadas na camada não metanólica.

Parâmetros	DDOS/metanol 90%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80
SE (g)	4,27	3,63	3,36	2,92	2,74
RS (%)	88,96	75,63	70,00	60,83	57,08
TA (g)	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
TE (g)	0,38	0,34	0,31	0,28	0,26
RT (%)	92,68	82,93	75,61	68,29	63,41
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,90	9,37	9,28	9,59	9,49
E	0,37	0,72	0,59	0,74	0,63

QUADRO 21. Rendimento de sólidos e tocoferóis após extração do DDOS com metanol 95% (p/v), em diferentes relações soluto/solvente - análises realizadas na camada não metanólica.

Parâmetros	DDOS/metanol 95%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	2,33	1,85	1,48	1,59	1,55
RS (%)	48,95	38,87	31,09	33,40	32,56
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,16	0,07	0,03	0,04	0,04
RT (%)	40,00	17,50	7,50	10,00	10,00
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	6,87	3,78	2,02	2,51	2,58
E (*)	-0,65	-0,83	-0,49	-0,60	-0,59

(*) Os valores negativos da eficiência indica que a camada descartada era mais concentrada em tocoferóis que a camada analisada.

QUADRO 22. Seletividade relativa das extrações do DDOS com metanol hidratado em diferentes proporções.

Relação DDOS/solvente	Metanol			
	95 %	90 %	85 %	80 %
0,40	0,82	1,04	1,06	1,00
0,20	0,45	1,10	1,09	1,06
0,13	0,24	1,08	1,13	1,08
0,10	0,30	1,12	1,19	1,13
0,08	0,28	1,11	1,26	1,16

Pelos resultados mostrados no Quadro 22 se percebe que em termos de seletividade, melhor opção é o metanol 85% usado com as relações mais baixas. A eficiência das extrações com metanol apa-

rece na Figura 9.

O termo eficiência envolve a relação entre o acréscimo de concentração de tocoferóis e o rendimento de tocoferóis. Da Figura 9 resulta claro que o solvente mais eficiente é o metanol 85%; ainda de acordo com a Figura 9 a eficiência poderia aumentar usando relações DDOS/solvente abaixo de 0,08. O metanol acima de 90% apresenta eficiência negativa o que significa que extrai mais tocoferóis na camada metanólica.

4.4.2. Extração de impurezas do DDOS com acetona

Este solvente foi testado diluído com água para se obter concentrações de 95, 90, 85 e 80%. Quando usado acima de 85% dissolve praticamente toda a amostra; portanto, aqui são apresentados os resultados das concentrações 85 e 80% nos Quadros 23 e 24 respectivamente.

A simples inspeção dos dados revela que este solvente é inespecífico, aumentando ou diminuindo sua capacidade dissolvente de acordo com o teor de água adicionado e com a relação DDOS/solvente. A seletividade da acetona 85% e 80% aparecem no Quadro 25.

Valores de seletividade menores que 1,0 que aparecem na acetona 85% indicam que os tocoferóis estariam sendo extraídos na camada acetônica; porém a análise desta camada também não registrou aumentos importantes da concentração de tocoferóis pois tinha uma quantidade equivalente de sólidos totais.

A acetona 80% apresentou uma seletividade mínima que, contrário ao metanol, diminui quando a relação DDOS/solvente é menor. Poder-se-ia pensar que adicionando mais água o solvente aumentaria sua seletividade; porém, o poder dissolvente, já muito diminuído cairia para níveis impraticáveis.

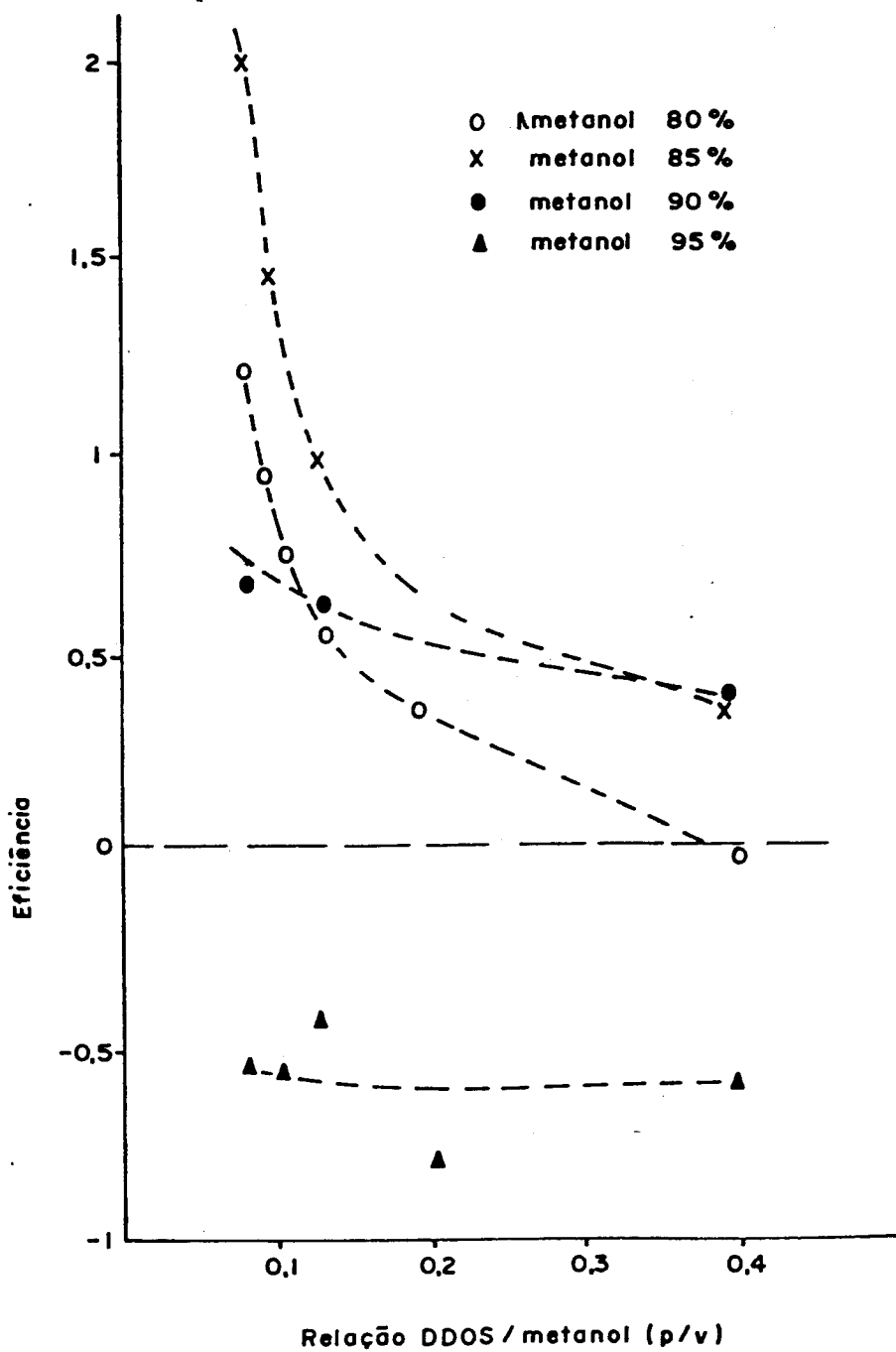


FIGURA 9. Eficiência da purificação de tocoferóis do DDOS com metanol desde 80 a 95% e diferentes relações soluto-solvente.

QUADRO 23. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após a extração do DDOS com acetona 85% em diferentes relações soluto/solvente - análises realizadas na camada não acetônica.

Parâmetros	DDOS/acetona 85%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	2,79	1,84	1,55	1,22	0,97
RS (%)	52,31	38,66	32,56	25,63	20,38
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,15	0,07	0,05	0,04	0,03
RT (%)	37,50	17,50	12,50	10,00	7,50
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	6,02	3,80	3,22	3,28	3,09
E (*)	-0,93	-0,82	-0,66	-0,52	0,41

(*) Valores negativos da eficiência significa que a fração descartada tem maior concentração de tocoferóis que a fração analisada.

QUADRO 24. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após a extração do DDOS com acetona 80% em diferentes relações soluto/solvente - análises realizada na camada não acetônica.

Parâmetros	DDOS/acetona 80%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	4,66	4,06	3,13	2,23	2,34
RS (%)	97,90	85,29	65,76	46,85	49,16
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,40	0,35	0,27	0,19	0,18
RT (%)	100,00	87,50	67,50	47,50	45,00
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,58	8,62	8,62	8,52	7,69
E	0,08	0,11	0,08	0,0	-0,36

QUADRO 25. Seletividade relativa da acetona durante a extração do DDOS em diferentes relações DDOS/solvente.

DDOS/solvente	acetona 85%	acetona 80%
0,40	0,72	1,02
0,20	0,45	1,03
0,13	0,38	1,03
0,10	0,39	1,01
0,08	0,36	0,92

A extração com acetona 85% apresentou valores negativos de eficiência enquanto que com acetona 80% apresentou valores positivos em torno de zero.

4.4.3. Extração de impurezas do DDOS com etanol

O etanol foi usado nas concentrações de 90, 85 e 80%, pois acima de 90% dissolve toda a amostra e abaixo de 80% não dissolve praticamente nada.

Nos Quadros 26, 27 e 28, respectivamente se mostram a performance destes solventes usados nas relações padronizadas de 0,40; 0,20; 0,13; 0,10 e 0,08.

De um modo geral a seletividade do etanol foi inferior a do metanol e apresentou um comportamento errático nos solventes com 10 e 15% de água; porém, no etanol 80% o comportamento se assemelha com o do metanol 85% como pode ser notado no Quadro 29.

A julgar pelos resultados mostrados no Quadro 29, o etanol poderia ter sido diluído para 75% com o qual seria enfatizada a seletividade que se insinuava no etanol 80%; porém, a maior diluição poderia prejudicar o grau de extração com a mesma relação 0,40 embora a partir de uma relação 0,20 haveria uma remoção de

QUADRO 26. Rendimentos de tocoferóis e sólidos totais após extração do DDOS com etanol 90% (p/v) em diferentes relações soluto/solvente - análises realizadas na camada não etanólica.

Parâmetros	DDOS/etanol 90%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	0,79	0,67	0,61	0,52	0,49
RS (%)	16,60	9,87	12,82	10,92	10,29
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05
RT (%)	20,00	17,50	15,00	10,00	12,50
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	10,13	10,44	9,83	9,61	10,20
E	0,33	0,34	0,20	0,11	0,21

QUADRO 27. Rendimentos de tocoferóis e sólidos totais após extração do DDOS com etanol 85% (p/v) em diferentes relações soluto/solvente - análises realizadas na camada não etanólica.

Parâmetros	DDOS/etanol 85%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	1,85	1,80	1,60	1,47	1,41
RS (%)	38,87	37,82	33,61	30,88	29,62
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,18	0,17	0,14	0,13	0,09
RT (%)	45,00	42,50	35,00	32,50	22,50
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	9,73	9,44	8,75	8,84	6,38
E	0,55	0,40	0,09	0,11	-0,48

QUADRO 28. Rendimentos de tocoferóis e sólidos totais após extração do DDOS com etanol 80% (p/v) em diferentes relações soluto/solvente - análises realizadas na camada não etanólica.

Parâmetros	DDOS/etanol 80%				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	3,87	2,79	2,30	1,64	1,47
RS (%)	81,30	58,61	48,32	34,45	30,88
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,34	0,26	0,22	0,16	0,14
RT (%)	85,00	65,00	55,00	40,00	35,00
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,78	9,32	9,57	9,76	9,52
E	0,24	0,53	0,59	0,50	0,36

QUADRO 29. Seletividade relativa do etanol durante a extração do DDOS em diferentes relações de DDOS/solvente.

Relação DDOS/solvente	Etanol		
	90%	85%	80%
0,40	1,20	1,16	1,05
0,20	1,77	1,12	1,11
0,13	1,17	1,04	1,14
0,10	0,92	1,05	1,16
0,08	1,21	0,76	1,13

sólidos ao redor de 50%.

A Figura 10 mostra que a eficiência do etanol foi mais baixa que a do metanol pois nem sequer atingiu o valor de 1,0 enquanto que com o metanol obteve-se valores entre 1,0 e 2,0. A eficiência, assim como a seletividade do etanol parecem estar influenciadas pelo grau de hidratação do solvente.

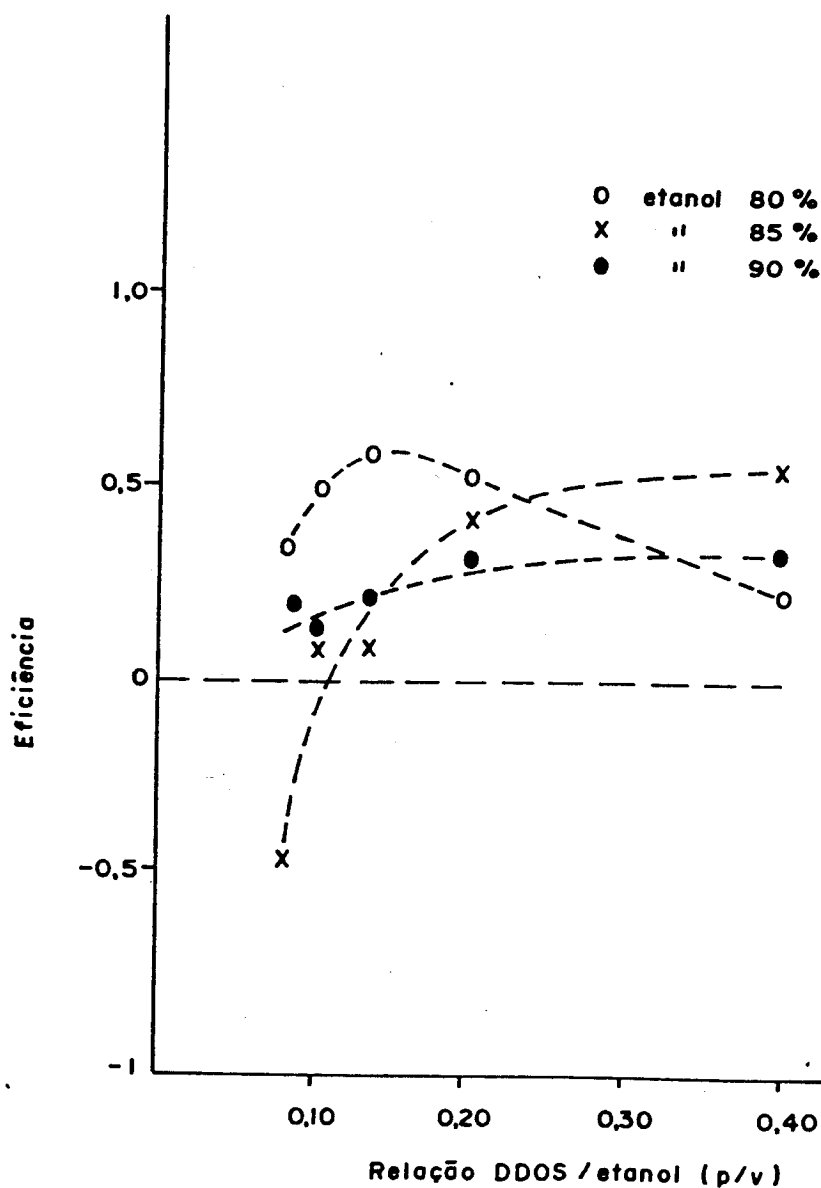


FIGURA 10. Eficiência da purificação dos tocoferóis do DDOS por extração com etanol 80, 85 e 90% em diferentes relações soluto/solvente.

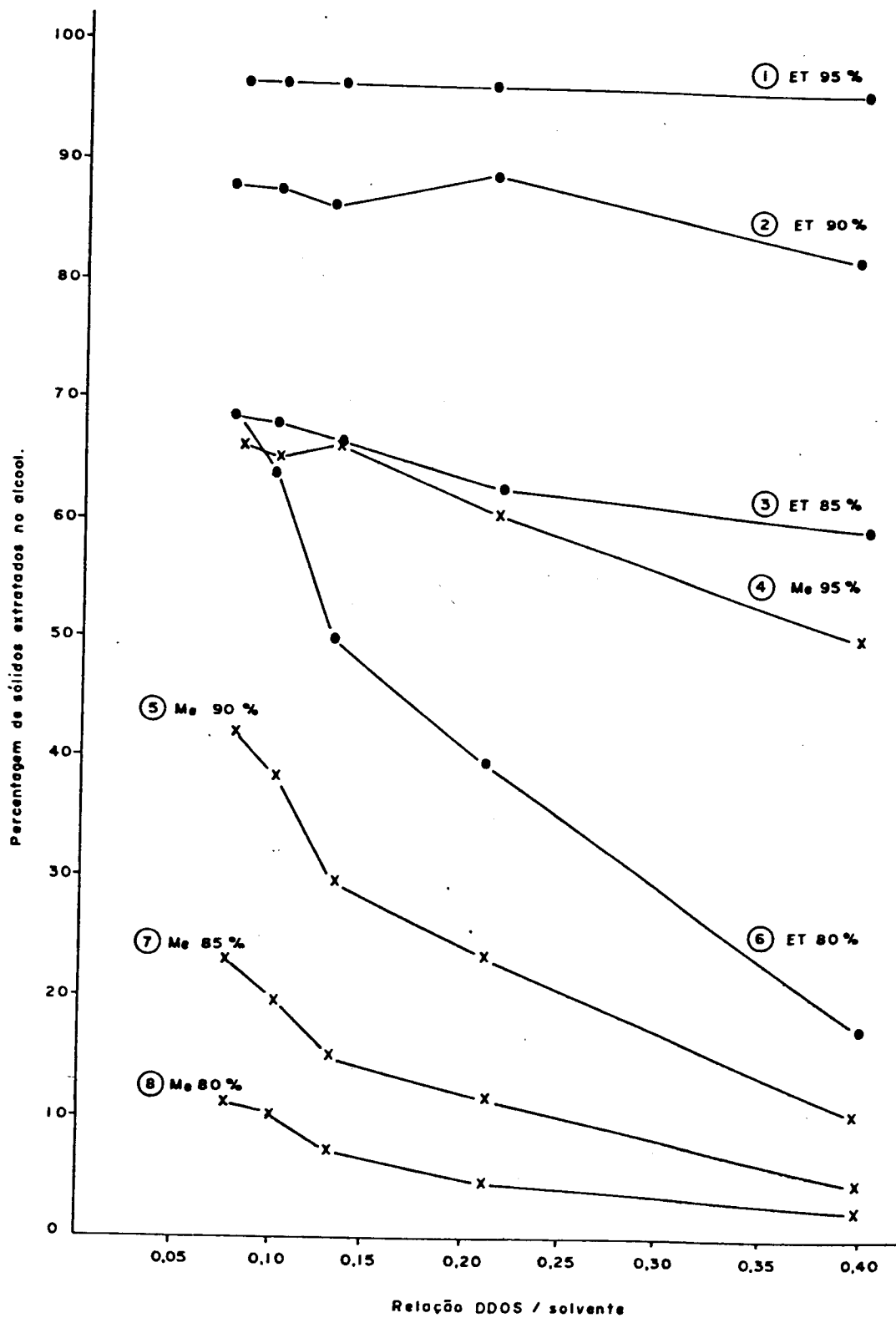


FIGURA 11. Solubilidade do DDOS em etanol e metanol hidratados a diferentes percentagens e usados em relações DDOS/solvente desde 0,4 até 0,08.

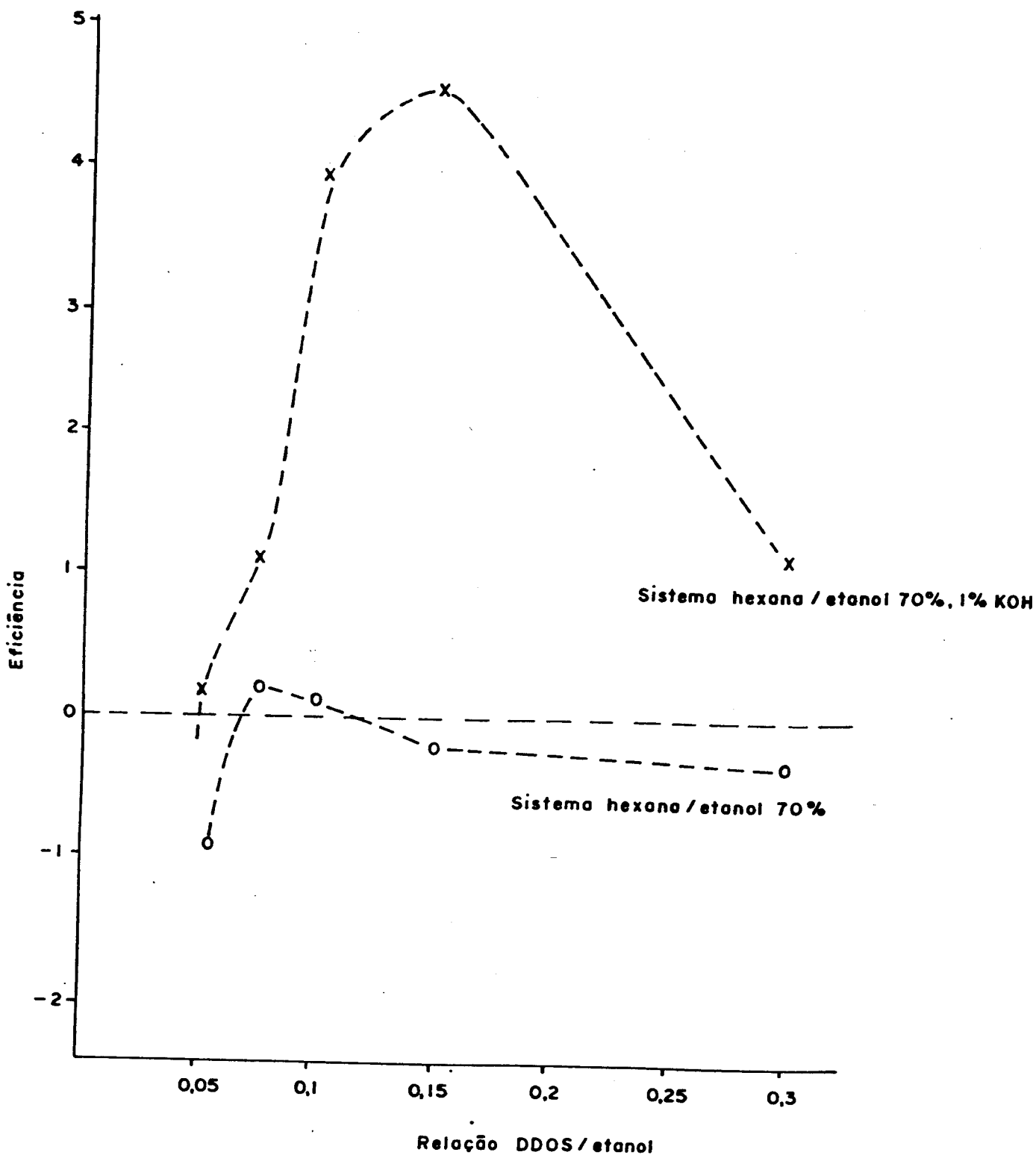


FIGURA 12. Comparação da eficiência de extração de tocoferóis do DDOS em sistemas de hexano e etanol 70% com e sem adição de KOH.

A Figura 11 mostra que a solubilidade do DDOS em etanol acima de 85% (curvas 1, 2 e 3), é pouco influenciada pela relação DDOS/solvente enquanto que com o metanol (curvas 5, 7 e 8) qualquer mudança nesta relação afeta grandemente a solubilidade. No etanol 80% (curva 6) percebe-se uma maior dependência do poder dissolvente com a relação DDOS/solvente.

4.4.4. Extração de tocoferóis do DDOS por partição líquido-líquido entre hexano e etanol alcalino.

No decorrer das pesquisas com álcoois hidratados pensou-se que se a fração insolúvel estivesse dissolvida num solvente não miscível com os álcoois, a seletividade poderia ser aumentada. Para tanto, o DDOS foi dissolvido previamente em hexano e logo submetido a separação (partição) líquido-líquido com os álcoois hidratados. Os testes preliminares mostraram que a inclusão do hexano não contribuía para aumentar a seletividade; pelo contrário, com os álcoois mais diluídos a eficiência era menor.

Visto que um dos propósitos das extrações era eliminar os ácidos graxos livres, pensou-se que a adição de uma base na fase alcoólica poderia contribuir para deslocar os ácidos para esta fase. Os ensaios com etanol contendo 5% de KOH melhoraram a eficiência; porém, notou-se que os sabões produzidos formaram emulsões, carregando para a fase alcoólica muitos sólidos. A diminuição do KOH para 1%, permitiu uma separação limpa e rápida das camadas.

A inclusão de 1% de KOH causa um aumento notável da seletividade e da eficiência do sistema hexano/etanol como pode ser observado no Quadro 30 e na Figura 12.

A inspeção do Quadro 30 e da Figura 12 permite comprovar que a eficiência e a seletividade são aumentadas notadamente com a inclusão do KOH. Vale lembrar que valores de eficiência em torno de 4,0 não tinham sido alcançados nos ensaios por extração simples.

QUADRO 30. Comparação entre a extração de tocoferóis do DDOS em um sistema de hexano/etanol, 1% KOH (OH) e no mesmo sistema sem álcali (N).

Parâmetros	Relação DDOS/etanol (p/v)											
	0,30		0,15		0,10		0,075		0,060			
	OH	N	OH	N	OH	N	OH	N	OH	N	OH	N
SA (g)	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77
SE (g)	3,21	3,56	3,21	3,50	3,21	3,48	3,21	3,45	3,21	3,21	3,21	3,42
RS (%)	85,15	94,43	59,42	92,94	48,81	92,31	45,89	91,51	45,09	45,09	90,72	90,72
TA (g)	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
TE (g)	0,31	0,29	0,30	0,29	0,25	0,30	0,18	0,30	0,15	0,15	0,25	0,25
RT (%)	96,88	90,63	93,75	90,62	78,13	93,75	56,25	93,75	46,88	46,88	73,13	73,13
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	9,66	8,15	13,13	8,29	13,59	8,62	10,40	8,70	8,82	8,82	7,31	7,31
E	1,12	-0,32	4,58	-0,19	3,98	0,11	1,07	0,19	0,15	0,15	-0,93	-0,93
Seletividade	1,14	0,96	1,58	0,98	1,60	1,02	1,23	1,02	1,04	1,04	0,81	0,81

Os Quadros 31 a 37 apresentam os resultados das partições dos sistemas hexano/etanol com 1% de KOH, para concentração de etanol desde 50 até 80%.

QUADRO 31. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após partição de 4,76 g de DDOS entre hexano e etanol 80% com 1,0% de KOH.

Parâmetros	DDOS/etanol 80% (p/v)				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	3,57	1,80	1,80	1,46	1,00
RS (%)	75,50	37,82	37,82	30,67	21,00
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,30	0,19	0,21	0,15	0,09
RT (%)	75,00	47,50	52,50	37,50	22,50
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,40	10,56	11,67	10,27	9,00
E	-0,08	0,98	1,66	0,66	0,11

QUADRO 32. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após partição de 4,76 g de DDOS entre hexano e etanol 75% com 1,0% de KOH.

Parâmetros	DDOS/etanol 75% (p/v)				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	4,49	3,19	2,54	2,17	1,96
RS (%)	94,33	66,89	53,32	45,64	41,11
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,36	0,34	0,30	0,26	0,17
RT (%)	90,00	85,00	75,00	65,00	42,50
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,02	10,66	11,81	11,98	8,70
E	-0,43	1,84	2,48	2,26	0,085

QUADRO 33. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após partição do DDOS entre hexano e etanol 70% com 1,0% de KOH.

Parâmetros	DDOS/etanol 70% (p/v)				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88
SE (g)	4,45	3,34	2,76	2,39	2,21
RS (%)	91,19	68,44	56,56	48,77	45,29
TA (g)	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
TE (g)	0,38	0,37	0,35	0,31	0,24
RT (%)	90,48	88,10	83,34	78,81	57,14
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,53	11,08	12,68	12,97	10,86
E	0,027	2,78	3,48	3,30	1,35

QUADRO 34. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após partição do DDOS entre hexano e etanol 65% com 1,0% de KOH.

Parâmetros	DDOS/etanol 65% (p/v)				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	4,55	3,29	2,88	2,54	2,60
RS (%)	95,58	69,12	60,50	53,36	54,62
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,36	0,35	0,37	0,32	0,28
RT (%)	90,00	87,50	92,50	80,00	70,00
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	7,91	10,64	12,85	12,60	10,77
E	-0,53	1,88	4,02	3,28	1,59

A avaliação do comportamento da partição com etanol alcalino, desde 80 até 50%, apresentada nos Quadros 31 a 37, permite analisar os aspectos mais relevantes desta série de experimentos:

a) Comportamento dos sólidos totais: Na Figura 13 são apresenta-

QUADRO 35. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após partição do DDOS entre hexano e etanol 60% com 1,0% KOH.

Parâmetros	DDOS/etanol 60% (p/v)				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	4,40	3,11	2,61	2,28	2,24
RS (%)	92,43	65,34	54,83	47,90	47,06
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,38	0,37	0,35	0,31	0,27
RT (%)	95,00	92,50	87,50	77,50	67,50
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,64	11,90	13,41	13,60	12,05
E	0,13	3,15	4,30	3,95	2,40

QUADRO 36. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após partição do DDOS entre hexano e etanol 55% com 1,0% de KOH.

Parâmetros	DDOS/etanol 55% (p/v)				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	4,62	3,17	2,47	2,27	2,26
RS (%)	97,06	66,60	51,89	47,69	47,48
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,40	0,37	0,35	0,32	0,29
RT (%)	100,00	92,50	87,50	80,00	72,50
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,66	11,67	14,17	14,10	12,83
E	0,16	2,93	4,96	4,48	3,14

QUADRO 37. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais após partição do DDOS entre hexano e etanol 50% com 1,0% de KOH.

Parâmetros	DDOS/etanol 50% (p/v)				
	0,40	0,20	0,13	0,10	0,08
SA (g)	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
SE (g)	4,46	3,26	2,48	2,28	2,27
RS (%)	93,69	68,48	52,10	47,90	47,69
TA (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
TE (g)	0,39	0,39	0,36	0,32	0,28
RT (%)	97,50	97,50	90,00	80,00	70,00
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,74	11,96	14,52	14,04	12,83
E	0,23	3,37	5,42	4,43	2,68

das as curvas da evolução dos sólidos totais com respeito à relação DDOS/solvente. Percebe-se que, as soluções etanólicas de 50, 60 e 70% se comportam de maneira semelhante. Esta situação revela que a solubilidade não está na dependência da concentração etanólica, senão da presença de outro elemento, no caso o KOH, que uniformiza a capacidade extratora das soluções etanólicas. Com etanol 80% a solubilidade do DDOS é maior e conseqüentemente mais inespecífica. Neste caso, provavelmente pela menor porcentagem de água, a basicidade do sistema é menor pois o KOH precisa-se dissociar para desenvolver sua capacidade básica. Tal condição existe nas soluções mais diluídas. Aparentemente a concentração do etanol deve-se encontrar abaixo de 75%: a partir desta diluição; o efeito solubilidade é mais ou menos semelhante. Certamente poder-se-ia trabalhar com etanol 40 ou 30%, porém, as propriedades emulsificantes dos sabões terão cada vez maior importância para numa situação limite, impossibilitar a separação das camadas, caso que ocorreu com KOH 1,0% em água em ensaios preliminares.

b) Comportamento da seletividade: Na Figura 14 se encontram graficadas as curvas de seletividade para as diversas relações DDOS/solvente. Verifica-se que a seletividade aumenta com o aumen

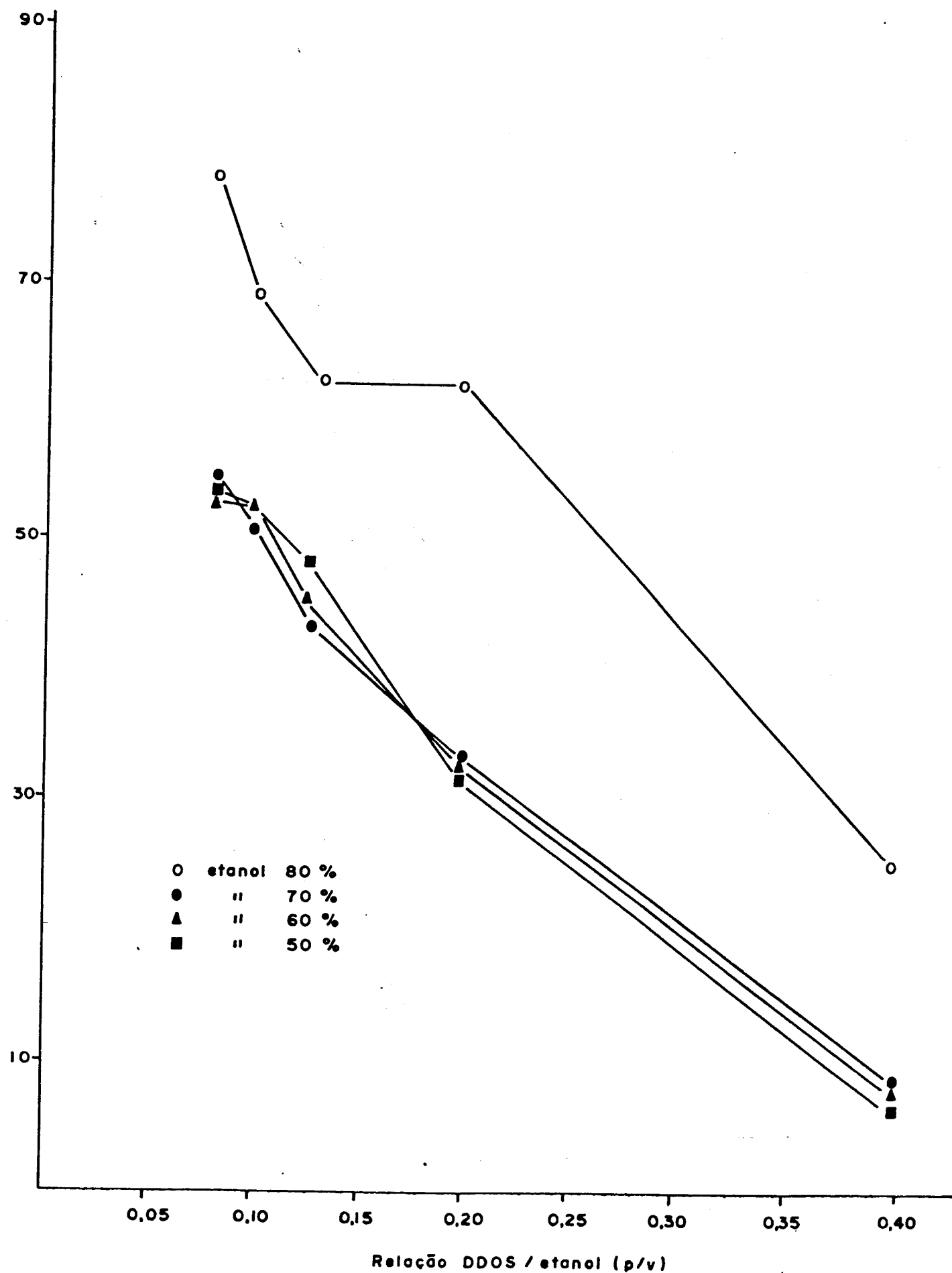


FIGURA 13. Comportamento do etanol alcalino (1,0% KOH) hidratado a diferentes percentagens na extração de sólidos totais do DDOS no sistema hexano/etanol.

to da hidratação do álcool apresentando valores máximos para o etanol 50% na relação entre 0,10 a 0,15. Isto significa que haveria que usar uma parte de DDOS para 13 de etanol.

É interessante salientar que o etanol 80%, mesmo extratando percentagens maiores de sólidos, apresenta uma seletividade mais baixa que os álcoois mais diluídos.

c) Comportamento da eficiência: As curvas de eficiência que aparecem na Figura 15 acompanham o comportamento da seletividade (Figura 14). Com etanol 50% e 1,0% de KOH a eficiência atinge um valor de 5 para a relação de 0,13 (Figura 16). Neste ponto a concentração de tocoferóis foi de 14,52% que representa um aumento de 70,8% da concentração inicial (8,5%).

O valor de 14,52% mesmo sendo um dos maiores obtido com a série de álcoois, pode parecer baixa. No entanto, deve ser lembrado que para passar da concentração inicial (8,5%) para o dobro (17,0 %) é necessário remover 50% dos sólidos (sem perder nada dos tocoferóis), deste modo os valores obtidos com etanol alcalino entre 50 e 60% não estão tão longe dos valores teóricos para igual remoção de sólidos, como pode ser visualizado na Figura 17.

Nesta figura a curva ideal (teórica) representa a variação de concentração dos tocoferóis do resíduo, após extrair percentagens crescentes de sólidos do DDOS (sem extrair nada dos tocoferóis). As curvas experimentais acompanham de perto a curva ideal, pelo menos até que a extração de sólidos atinge 50%. A partir dali as extrações experimentais caem rapidamente indicando que os sistemas de solvente não tem mais capacidade de extração das impurezas que ainda permanecem com os tocoferóis. Nesta situação não adiantaria seguir diminuindo a relação DDOS/solvente pois já com a última relação testada (0,08), nota-se uma queda de eficiência e de seletividade com qualquer uma das concentrações de etanol.

Parece razoável pensar que os ácidos graxos livres que exis-

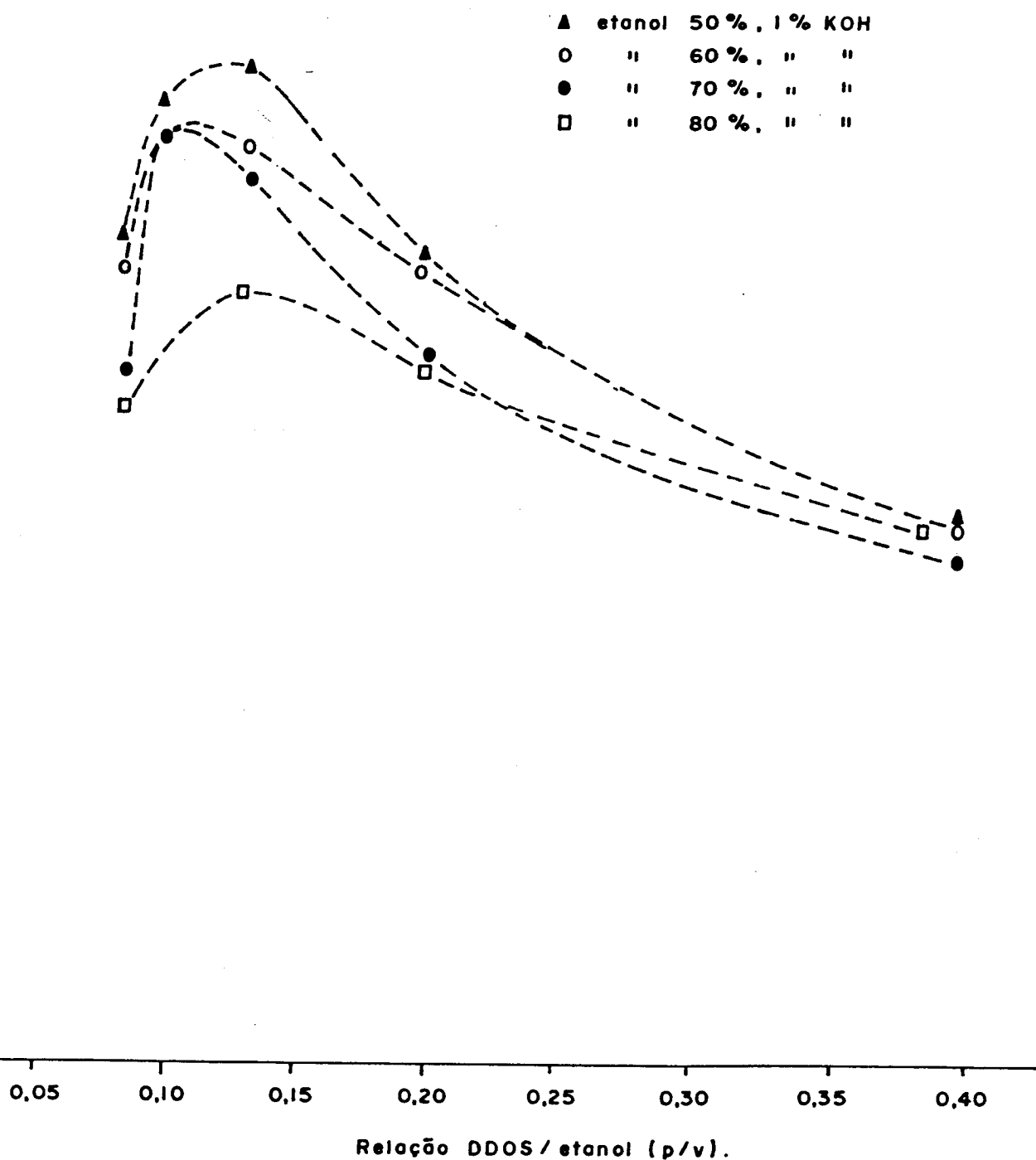


FIGURA 14. Comparação da seletividade de purificação do DDOS nos sistemas hexano/etanol alcalino para concentrações de etanol desde 50 a 80%.

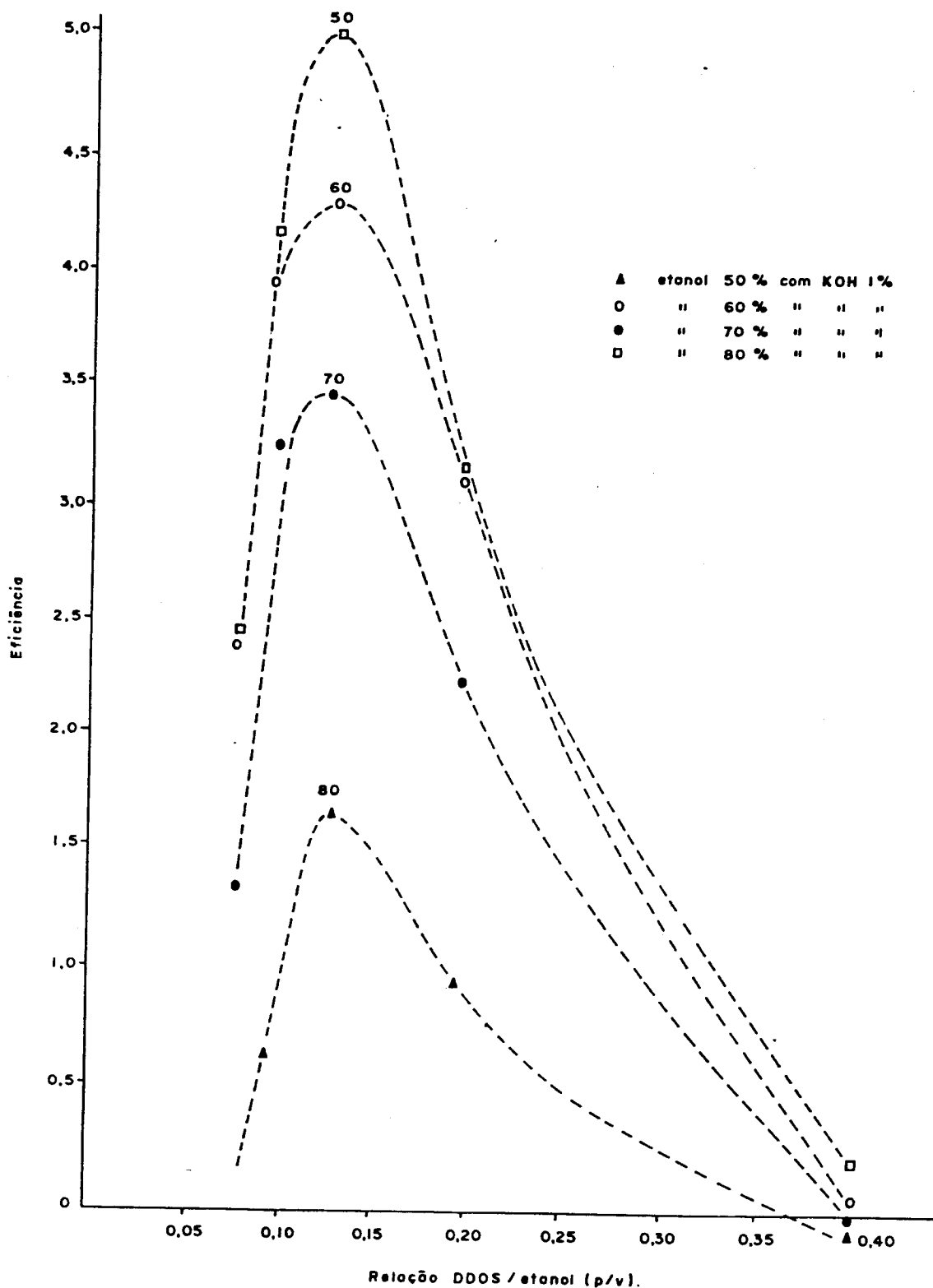


FIGURA 15. Comparação da eficiência de purificação de tocoferóis do DDOS nos sistemas hexano/etanol alcalino para concentrações de etanol desde 50 a 80%.

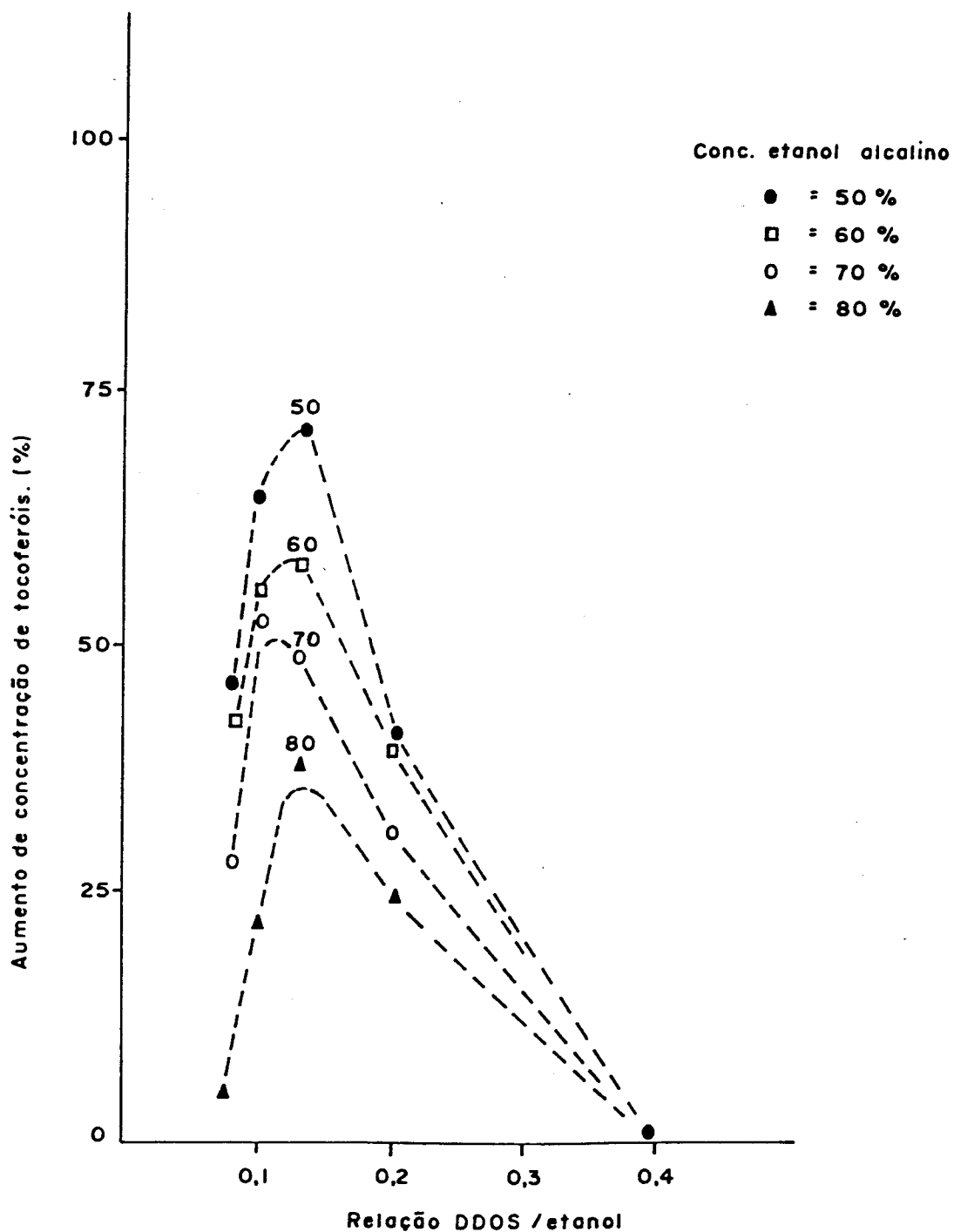


FIGURA 16. Comparação entre o aumento de concentração de tocoferóis obtidos com os sistemas de partição de hexano/etanol alcalino, variando a concentração desde 50 a 80%.

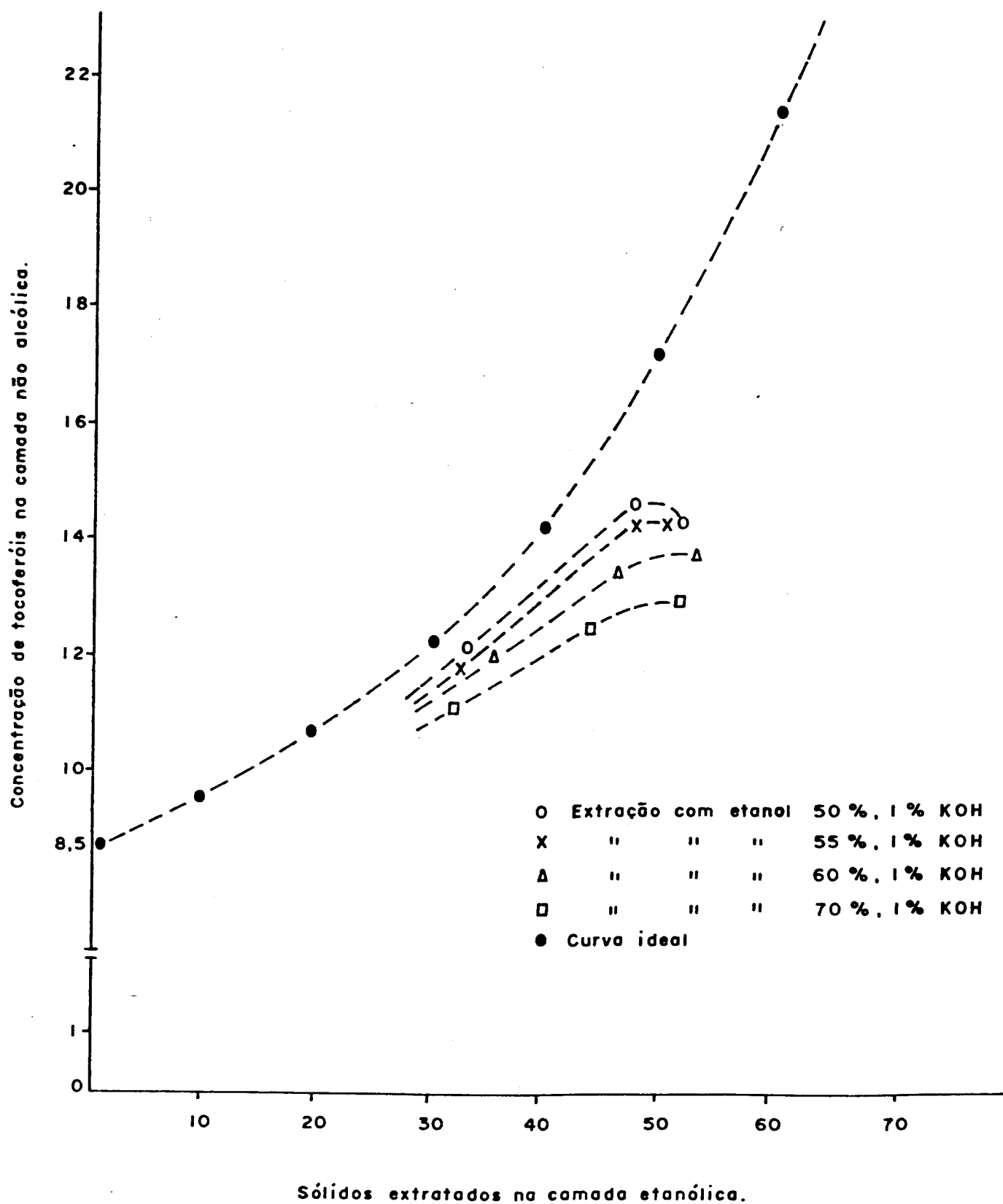


FIGURA 17. Comparação entre as percentagens de tocoferóis obtidos na camada hexânica após extração do DDOS com etanol 50, 55, e 70% e os valores ideais correspondentes aos mesmos teores de sólidos removidos.

tem em 36% no DDOS estejam incluídos na fração removida com alta eficiência. Outras substâncias não ácidas também podem ser carregadas no etanol alcalino provavelmente não por efeito da solubilização, senão por serem emulsificadas pelos sabões de ácidos graxos.

4.4.4.1. Caracterização do extrato obtido nas condições de eficiência máxima nos ensaios com 4,76 g de DDOS iniciais para diferentes relações hexano:etanol.

No Quadro 38 se apresentam os resultados da composição do extrato obtido pela relação 0,13; etanol 55% com 1,0% de KOH.

Na Figura 18 inclui-se a separação dos tocoferóis individuais, deste extrato por cromatografia de alta eficiência. Esta figura é útil para demonstrar as modificações da composição causada pela partição.

QUADRO 38. Comparação da composição do extrato, obtido nas condições de máxima eficiência nos ensaios usando 4,76g de DDOS na partição com etanol 55% e KOH, com a composição do DDOS original.

Componentes (%)	Extrato		DDOS	
Tocoferóis totais	13,51		8,50	
Esteróis totais	27,17		14,85	
Hidrocarbonetos	12,18		4,40	
Ácidos graxos livres	7,86		37,60	
"alfa"-tocoferol	16,54	(a)	15,90	(a)
beta + gama + delta-tocof.	83,45	(a)	84,10	(a)
alfa-tocoferol	15,83	(b)	13,40	(b)
beta + gama + delta-tocof.	83,07	(b)		

(a) Determinados mediante separação por cromatografia em camada delgada e quantificados por espectrofotometria visível.

Porcentagens relativas ao teor de tocoferóis totais.

- (b) Determinados por cromatografia líquida de elevada eficiência (CLAE). Porcentagens relativas ao teor de tocoferóis totais.

Observa-se que as mudanças mais drásticas ocorrem no teor de ácidos graxos livres os que diminuíram em 79,1%, enquanto que os hidrocarbonetos aumentaram em 177%, os esteróis em 82,9% e os tocoferóis em 58,9% dos teores iniciais.

O aumento dos tocoferóis não foi uniforme, como pode ser comprovada na Figura 18. Verifica-se um notável acréscimo da forma "alfa", sendo esta a de maior importância biológica.

O perfil cromatográfico dos tocoferóis não apresentou interferentes como os mencionados por outros autores (FEETER, 1974; AMES, 1972), o que indica que a separação cromatográfica por CLAE foi muito seletiva além de apresentar uma elevada eficiência ($N = 423$ pratos teóricos para um padrão de alfa-tocoferol) e boa resolução ($R = 1,08$ entre padrões alfa e beta-tocoferol).

4.4.4.2. Influência da relação entre hexano e etanol

Uma das finalidades do preparo de soluções "base" (50%, 33,5% e 25%) de DDOS em hexano foi produzir na mistura com etanol, mudanças da relação hexano/etanol, além de permitir certamente, as mudanças da relação DDOS/etanol que até aqui tem sido comentada. Desta maneira o preparo de uma solução base permitia obter combinações variadas entre os parâmetros críticos da extração.

Os Quadros 39 a 44 correspondem a experimentos em que uma quantidade fixa de DDOS (3,77 e 7,23g respectivamente) foi submetida a partição com diferentes relações de hexano/etanol, sendo que o etanol alcalino foi por sua vez adicionado em 3 concentrações: 70, 55 e 50%. Os dados dos Quadros 39 a 44 aparecem graficados na Figura 19 e com os dados dos Quadros 33, 36, 37 e 39 foi desenha-

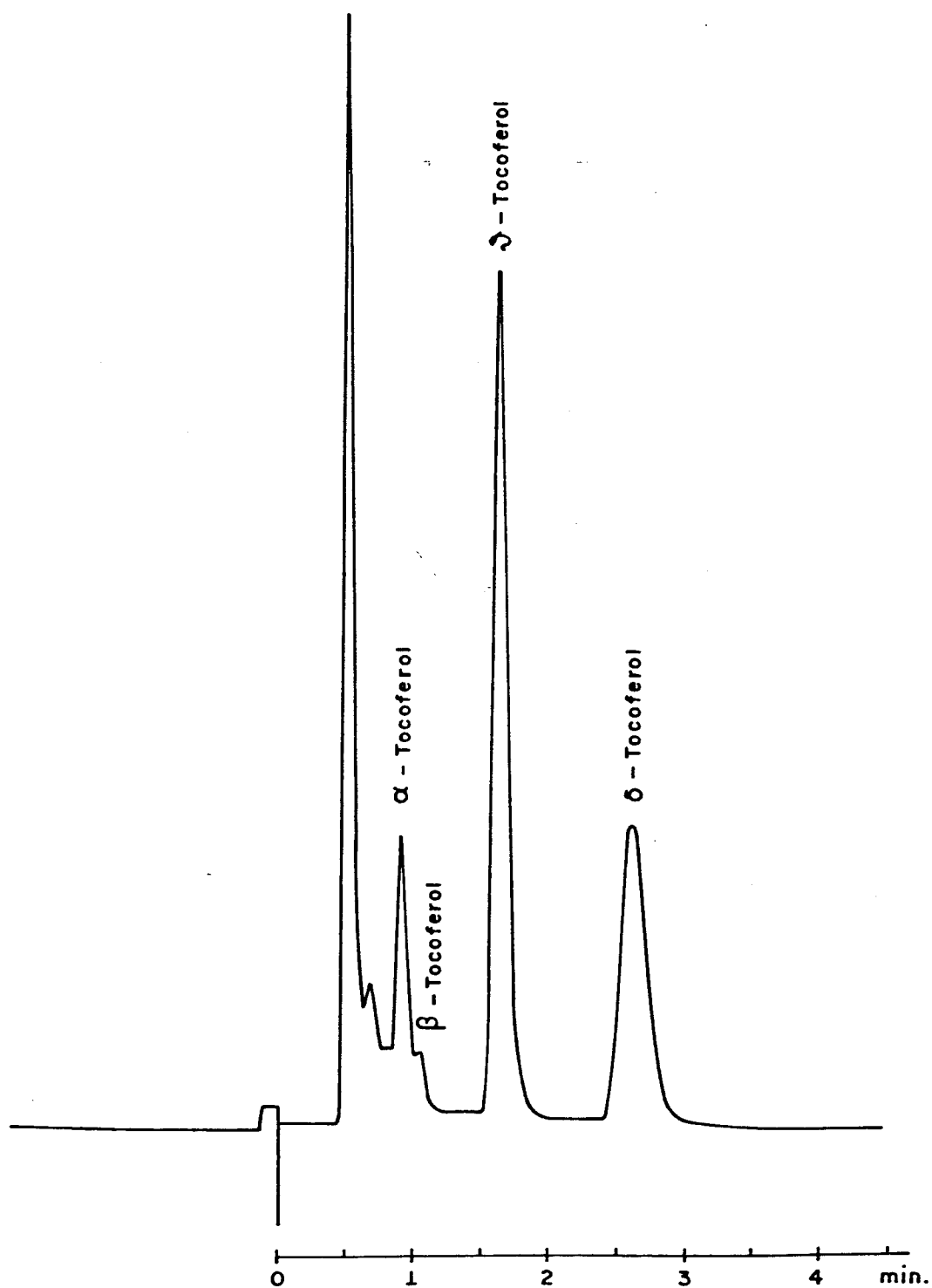


FIGURA 18. Cromatograma dos tocoferóis do extrato obtido na parti_
ção do DDOS entre hexano e etanol 55% com 1% de KOH,
na relação 0,13.

da a Figura 20.

QUADRO 39. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais na separação de 3,77 g de DDOS em sistema de hexano e 70% etanol al calino.

Parâmetros	Relação hexano/etanol 70%				
	0,871	0,436	0,29	0,218	0,174
SA (g)	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77
SE (g)	3,29	2,24	1,84	1,73	1,70
RS (%)	85,15	59,42	48,81	45,89	45,09
TA (g)	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
TE (g)	0,31	0,30	0,25	0,18	0,15
RT (%)	96,88	93,75	78,13	56,25	46,88
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	9,66	13,39	13,59	10,40	8,82
E	1,12	4,58	3,98	1,07	0,15

QUADRO 40. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais na separação de 3,77 g de DDOS em sistema de hexano e 55% etanol al calino.

Parâmetros	Relação hexano/etanol 55%				
	0,871	0,436	0,29	0,218	0,174
SA (g)	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77
SE (g)	3,16	2,22	1,85	1,85	1,80
RS (%)	83,82	58,59	49,07	49,07	47,77
TA (g)	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
TE (g)	0,31	0,31	0,26	0,23	0,21
RT (%)	96,88	96,88	81,25	71,88	65,63
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	9,81	13,96	14,05	12,43	11,67
E	1,27	5,29	4,51	2,83	2,08

QUADRO 41. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais na separação de 3,77 g de DDOS em sistema de hexano e 50% etanol alcalino.

Parâmetros	Relação hexano/etanol 50%				
	0,871	0,436	0,29	0,218	0,174
SA (g)	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77
SE (g)	3,08	2,10	1,83	1,81	1,78
RS (%)	81,70	55,70	48,54	48,01	47,21
TA (g)	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
TE (g)	0,30	0,28	0,28	0,24	0,22
RT (%)	93,75	87,50	87,50	75,00	68,75
CTA (%)	8,50	8,50	8,60	8,50	8,50
CTE (%)	9,74	13,33	15,30	13,26	12,36
E	1,16	5,52	5,95	3,57	2,65

QUADRO 42. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais na separação de 7,42 e 7,23 g de DDOS em sistema de hexano e 70 % etanol alcalino.

Parâmetros	Relação hexano/etanol 70%				
	0,54	0,27	0,18	0,14	0,11
SA (g)	7,42	7,42	7,42	7,42	7,42
SE (g)	7,03	4,91	3,96	3,31	3,07
RS (%)	94,47	66,17	53,37	44,61	41,37
TA (g)	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63
TE (g)	0,63	0,55	0,51	0,46	0,45
RT (%)	100,00	87,30	80,95	73,02	71,43
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,96	11,20	12,88	13,90	14,66
E	0,46	2,36	3,55	3,94	4,40

QUADRO 43. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais na separação de 7,42 e 7,23 g de DDOS em sistema de hexano e 55 % etanol alcalino.

Parâmetros	Relação hexano/etanol 55%				
	0,54	0,27	0,18	0,14	0,11
SA (g)	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23
SE (g)	6,69	5,29	4,00	3,26	2,75
RS (%)	92,53	73,17	55,33	45,09	38,04
TA (g)	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
TE (g)	0,60	0,60	0,49	0,44	0,40
RT (%)	96,77	96,77	79,03	70,97	64,52
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,97	11,34	12,25	13,50	14,54
E	0,45	2,75	2,96	3,55	3,90

QUADRO 44. Rendimento de tocoferóis e sólidos totais na separação de 7,42 e 7,23 g de DDOS em sistema de hexano e 50 % etanol alcalino.

Parâmetros	Relação hexano/etanol 50%				
	0,54	0,27	0,18	0,14	0,11
SA (g)	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23
SE (g)	7,01	5,54	4,04	3,44	3,01
RS (%)	96,96	76,63	55,88	47,58	41,63
TA (g)	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
TE (g)	0,63	0,62	0,51	0,47	0,43
RT (%)	101,60	100,00	80,26	75,81	69,35
CTA (%)	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50
CTE (%)	8,99	11,19	12,62	13,66	14,29
E	0,50	2,69	3,39	3,91	4,02

Na Figura 19 se observa que para quantidades altas de DDOS (7,23 g), a eficiência de purificação de tocoferóis aumenta progressivamente com a diminuição do hexano no sistema. A diminuição não parece ser afetada pela concentração do etanol alcalino já que as 3 curvas tendem à superposição a julgar pela pendente das curvas, enquanto o hexano fosse "zero" (puro etanol alcalino) a eficiência teria o valor máximo para este conjunto de condições. No entanto, sabemos que a extração apenas com etanol alcalino produz baixa eficiência. Provavelmente deve haver uma queda da eficiência entre as relações hexano/etanol (H/E) de 0,00 a 0,10, já que o último ponto destas curvas foi 0,11.

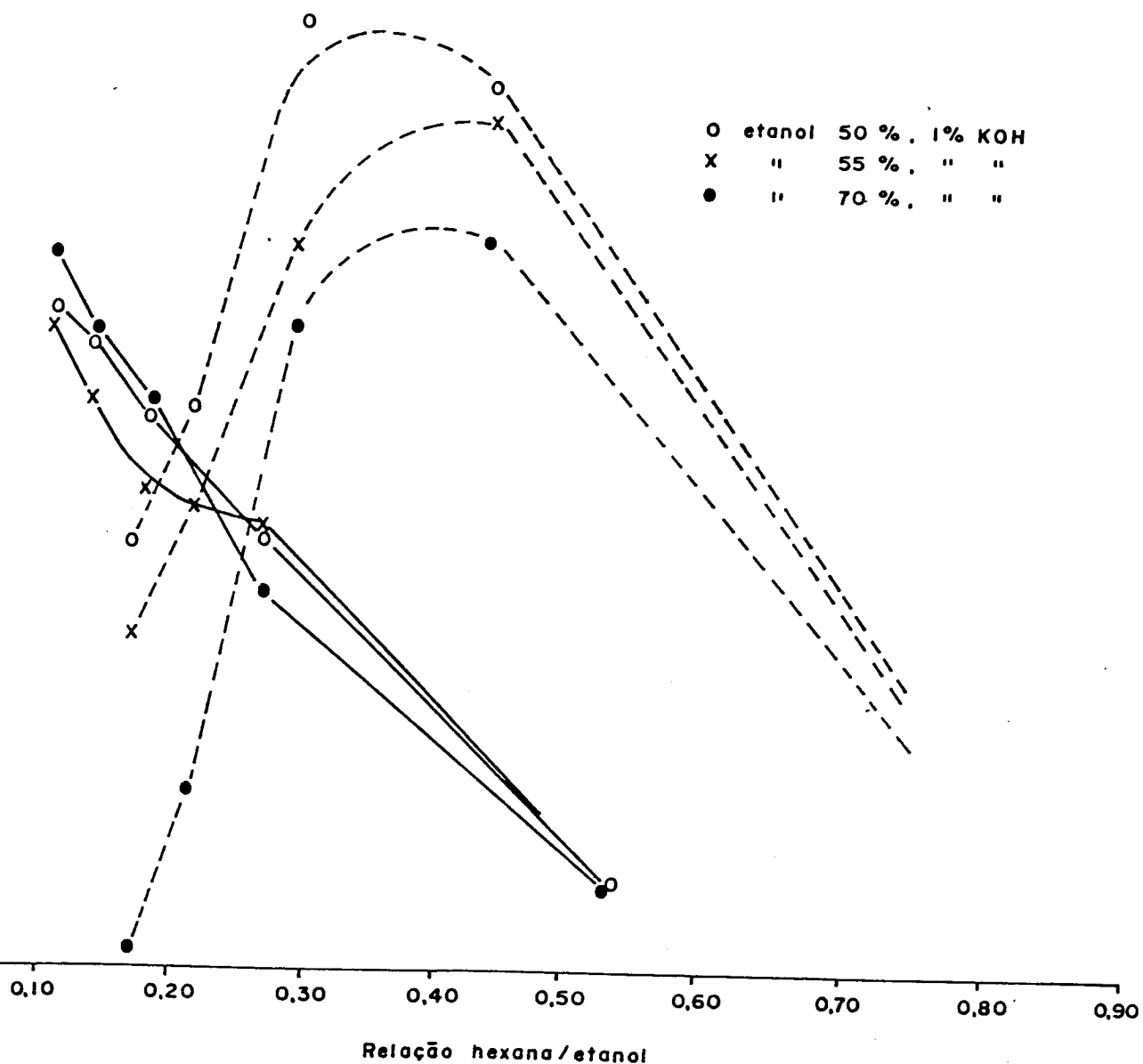
A eficiência com 3,77 g de DDOS é maior, especialmente para as relações entre 0,15 e 0,45 com etanol 50% ou 55%. O mais importante é que estas curvas apresentam uma região de relação hexano/etanol (H/E) que produz máxima eficiência. Portanto, definem as condições adequadas de forma mais nítida.

A Figura 20 mostra dois conjuntos de curvas para quantidades relativamente próximas de DDOS inicial (3,77 g e 4,76 g). Percebe-se claramente que um aumento apenas de 26,2% de DDOS desloca a região de eficiência máxima em 0,176 unidades. O deslocamento parece ser pouco influenciado pela concentração do álcool.

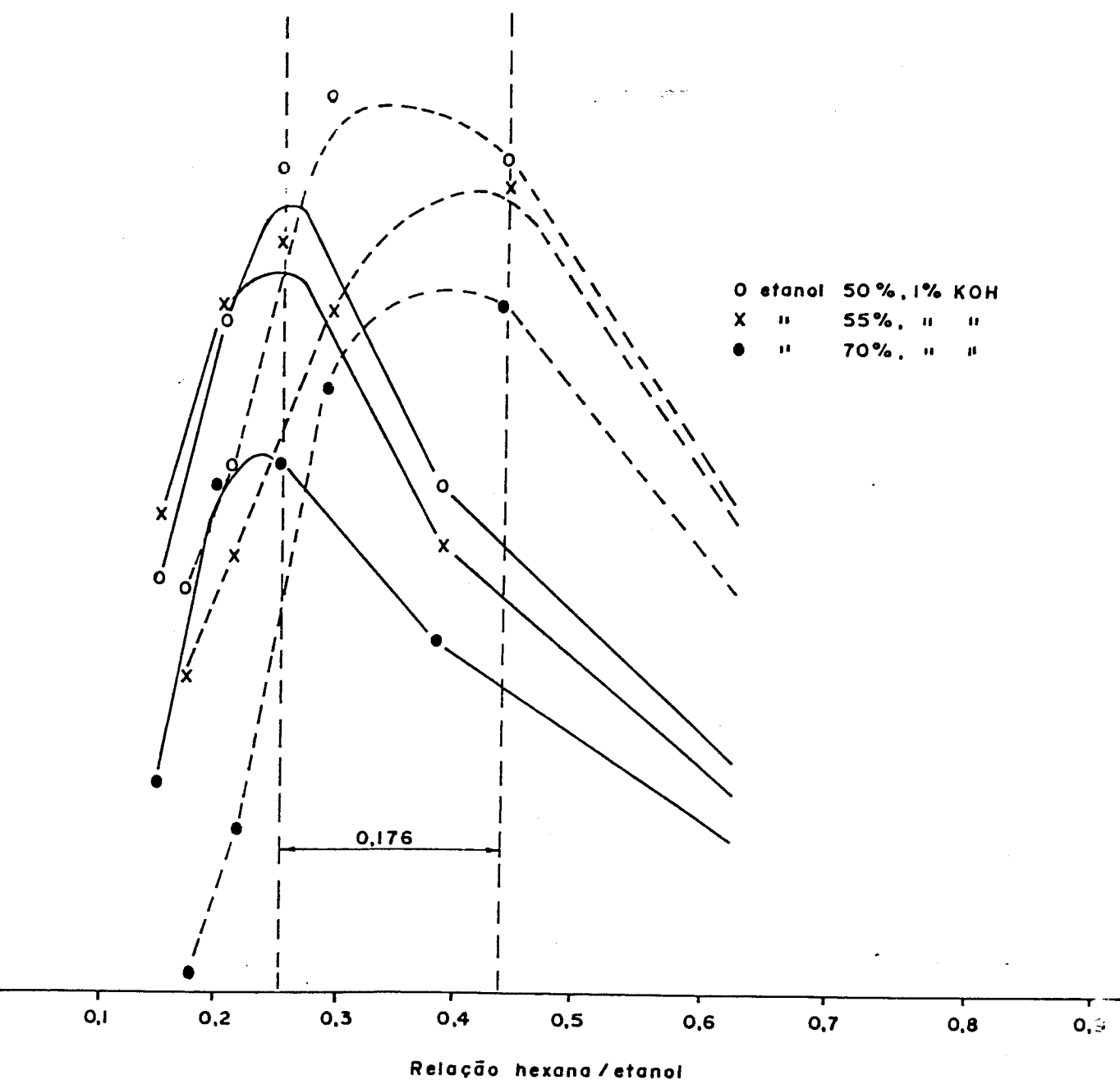
No Quadro 45 aparece a composição do extrato obtido nas condições ótimas do experimento com 3,77 g de DDOS.

Os dados do Quadro 45 revelam que, de um modo geral, foi mais eficiente esta série de experimentos do que nos anteriores. Assim sendo, os ácidos graxos diminuíram 97,70% enquanto aumentaram os hidrocarbonetos em 135%, os esteróis em 92,05% e os tocoferóis em 84,04% dos teores originais do DDOS.

Semelhante ao experimento anterior, o alfa-tocoferol teve o maior acréscimo entre todos os tocoferóis como se pode verificar na Figura 21 em que se mostra o perfil de tocoferóis do extrato



URA 19. Influência da relação hexano/etanol na eficiência de purificação de tocoferóis em 3,77 g (---) e 7,23g(—) de DDOS submetidos a extração.



RA 20. Influência da relação hexano/etanol na eficiência de purificação de tocoferóis para 3,77 g (---) e 4,76 g (—) de DDOS submetidos a extração.

QUADRO 45. Comparação da composição do extrato, obtido nas condições de máxima eficiência em experimentos usando 3,77g de DDOS na partição com etanol 50% com KOH, com a composição do DDOS original.

Componentes (%)	Extrato		DDOS	
Tocoferóis totais	15,46		8,50	
Esteróis totais	28,52		14,85	
Hidrocarbonetos	10,52		4,40	
Ácidos graxos	0,86		37,60	
alfa-tocoferol	21,07	(a)	15,90	(a)
beta + gama + delta-tocof.	78,92	(a)	84,10	(a)
alfa-tocoferol	20,89	(b)	13,40	(b)
beta + gama + delta-tocof.	79,11	(b)	86,60	(b)

- (a) Determinados mediante separação por cromatografia em camada delgada e quantificados por espectrofotometria visível. Porcentagens relativas ao teor de tocoferóis totais.
- (b) Determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Porcentagens relativas ao teor de tocoferóis totais.

obtido no experimento com a partição com etanol 50%.

O cromatograma da Figura 21 não apresenta os interferentes reportados por outros autores (FEETER, 1974; AMES, 1972), indicando que a técnica usada (CLAE) é muito útil para a separação e quantificação de tocoferóis.

Resumindo, podemos dizer que a eficiência máxima para 3,77 g de DDOS é atingida com a relação 0,436 de hexano/etanol; para 4,76 g de DDOS a máxima eficiência se atinge com a relação 0,26 de hexano/etanol enquanto que para 7,23 g de DDOS a mesma é atingida com a relação hexano/etanol 0,11.

Finalmente convém salientar que a partição líquido-líquido

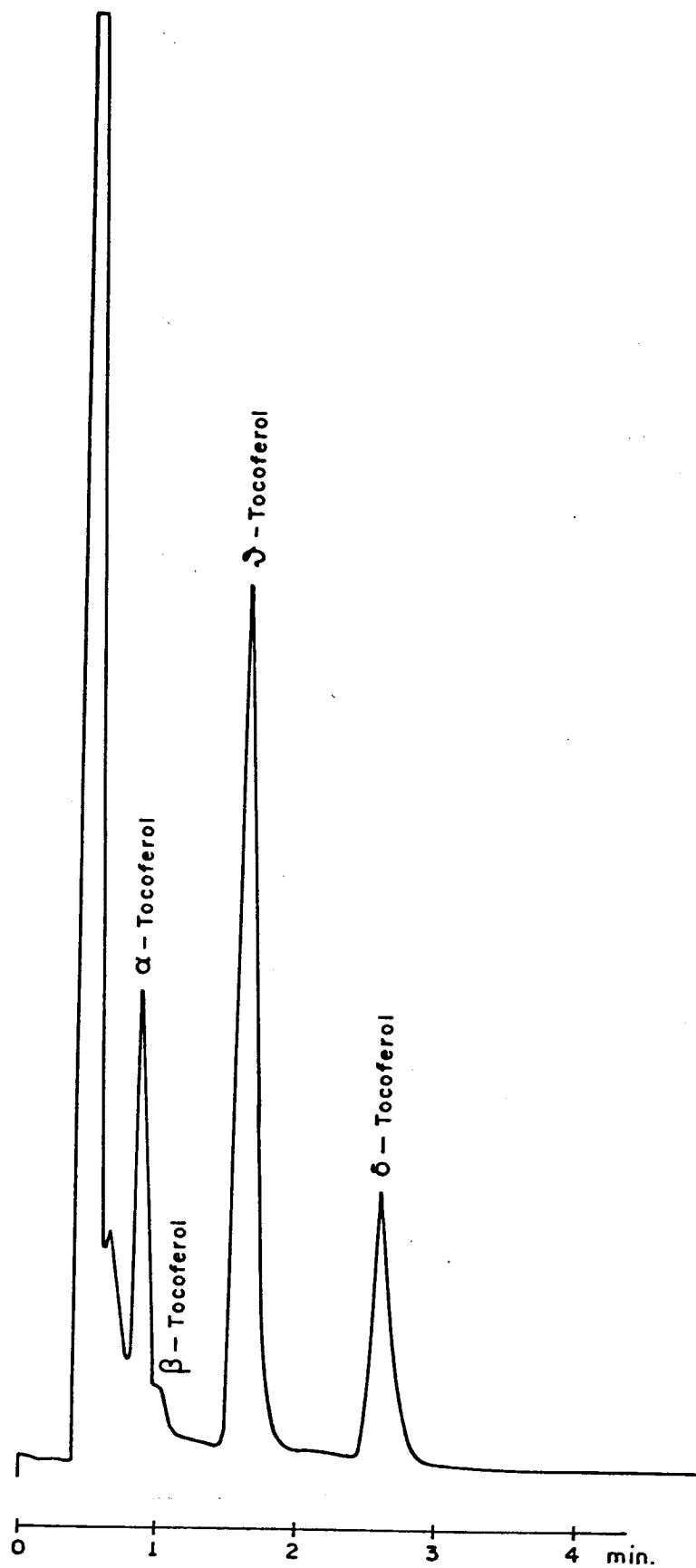


FIGURA 21. Cromatograma dos tocoferóis do extrato obtido na parti_{ção} do DDOS entre hexano e etanol 50% com 1% de KOH, na relação 0,13.

do DDOS entre hexano e etanol 50%, com 1,0% de KOH, é uma operação simples e rápida realizada a temperatura ambiente e portanto pouco deteriorante dos tocoferóis que cumpre com o objetivo de de pré-purificar a matéria bruta,removendo aproximadamente 50 % dos sólidos não tocoferóis.

De acordo com os Quadros 38 a 45, os materiais removidos são principalmente os ácidos graxos, que quase desaparecem no ensaio com 3,77 g de DDOS submetidos a partição.

O extrato pré-purificado em hexano, deve ser neutralizado rapidamente e daí ser processado por resfriamento (cristalização), destilação com vácuo ou outras opções tecnológicas que serão estudadas no futuro.

5. CONCLUSÕES

1. O destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS), usado como matéria prima nesta pesquisa, é um material heterogêneo com propriedades particulares das quais as mais salientes são: seu alto teor em ácidos graxos e sua composição da matéria insaponificável.
2. A composição de ácidos graxos do DDOS revela um alto teor em ácido palmítico, na sua forma livre, enquanto que, o ácido linoléico se encontra principalmente na sua forma esterificada.
3. Dentre os esteróis presentes na matéria insaponificável do DDOS, o beta-sitosterol representa 54,7% o que equivale a 9,13% com relação ao DDOS original.
4. Os tocoferóis totais perfazem em torno de 10% do DDOS, dos quais o gama-tocoferol se encontra em maior concentração. O alfa-tocoferol (vitamina E) corresponde a 13,4% dos tocoferóis totais, o que torna o DDOS uma fonte de alto potencial para a obtenção de antioxidantes e vitamina E.
5. A solução de 85% de metanol apresentou alguma seletividade na eliminação das impurezas do DDOS quando usado na relação 0,08 DDOS/solvente, com o que a concentração de tocoferóis aumentou de 8,5 para 10,56%.
6. A acetona apresenta baixa seletividade e se comporta de forma inversa ao metanol assim, a seletividade melhora quando se aumenta a quantidade ou a relação DDOS/solvente.
7. De um modo geral, a seletividade do etanol foi inferior a do metanol, sendo que sua eficiência, e seletividade estão influenciados pelo grau de hidratação do solvente.
8. A introdução de um solvente orgânico, como hexano, no sistema

de etanol aquoso não contribui para aumentar a seletividade: porém, alcalizando levemente este sistema a seletividade e a eficiência aumentam notavelmente.

9. Em condições de máxima eficiência, usando etanol aquoso alcalino, se obteve um aumento da concentração de 84,04% dos tocoferóis em relação a matéria prima original.
10. A partição líquido-líquido demonstrou ser uma operação simples, rápida e pouco deteriorante dos tocoferóis; pelo que, deve ser considerada para purificar o DDOS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. et alii. A gas chromatography method for determination of tocopherols in food. J. Jap. Soc. Food Nutr., 27(7)329, 1974.
- AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY - AOCS. Official and Tentative Methods. 3 ed. Illinois. 1978.
- AMES, S. R. Industrial preparations and production, estimation in foods and food supplements, occurrence in foods. In: SEBREL, W. H. Jr. & HARRIS. R.S., ed. The vitamins. 2 ed. New York, Academic Press, 1972. V.5, p.225 - 33.
- ANON. A expansão Agrícola: Desafio de toda sociedade. VEJA, 26:169 - 76, Nov. 1986.
- ANON. Tocopherols as antioxidants. Tecnologie Alimentari. 4(10):24 - 25, 1981.
- ASKINAZI, A. et alii. Effect of bleaching temperature of effectiveness of deodorization of soybean oil. Maslozhiravaya Promy., Nº 7: 29-32, 1982.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official Methods of Analysis. 13 ed. Washington. 1980.
- ATUMA, S. & LINDQUIST, J. Voltametric determination of tocopherols by use of newly developed carbon paste electrode. Analyst, 98 (1173):886 - 94, 1974.
- AUGUSTO-RUIZ, W. Proteólise do Resíduo do extrato Hidrossolúvel da Soja. Campinas, FEA-UNICAMP. 1985. (Tese Doutorado).
- BARATTA, L. E. S. & CONTRERAS G., E. Determinação de vitamina E e tocoferóis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência(HPLC). In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CROMATOGRAFIA, 5. Rio de Ja-

- neiro. Anais... Rio de Janeiro, 1986.
- BARATTA, L. E. S. & CONTRERAS G., E. Recuperação da vitamina E dos resíduos da indústria de óleos vegetais. Campinas, Fund.de Desenv. da UNICAMP, 1984. (Relatório Técnico: 1).
- BARNES, P. HPLC for vitamin E food flavorings ingredients. Pack.& Process. 2(4):19, 1980.
- BARTOS, J. & PEREZ, M. Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Steroids. Orlando. Academic Press, 1976. p.60 - 82.
- BAUERNFEIND, J. Tocopherols in foods. In: MACHLINE, L. J. ed. Vitamin E. New York, Marcel Dekker. 1980. p.99 - 167.
- BAUERNFEIND, J. The Tocopherol content of Food and Influencing Factors. C. R. C. Critical Review in Food Science and Nutrition, 8(4):337 - 82, 1977.
- BAUERNFEIND, J. & CORT, W. M. Encyclopedia of Food Technology. Wesport, AVI, 1975. p.891 - 9.
- BECKER, A. Separation of sterols and tocopherols from natural oils and fats. Patent Fr.2.182.299(Cl.c11b,co7cd). Chem. Abst. 81.137837v, 1974.
- BLUMBERG, R. et alii. Industrial inorganic process. In: HANSON, C., ed. Recent Advances in Liquid-Liquid Extration. 2ed.Oxford, Pergamon Press. 1975. p.108 - 9.
- BOATELLA, R., J. Tocopherol analysis of vegetable oils by GLC.An. Bromatolog. 23(3):287 - 96, 1975.
- BRO-RASMUNSEN, F. & HJARDE, W. Determination of tocopherol by chromatography on secondary magnesium phosphate.Acta Chem.Scand. 11(1):34 - 43, 1957.

- BROOKS, R. I. & CSALLANY, A. Effects of air, ozone, and nitrogen dioxide exposure on the oxidation of corn and soybean lipids. J. Agric. Food Chem., 26(5):1203, 1978.
- BUNNELL, R. H. Modern procedures for analysis of tocopherols. Lipids, 6(4):245 - 53, 1971.
- BUNNELL, R. H. Vitamin E assay by chemical methods. In: GYORGY, P. & PEARSON, W. N., ed. The Vitamins. 2 ed. Orlando, Academic Press, 1967. v. 6. p.261 - 316.
- BUSHNELL, M. W. D. Column chromatography in the determination of tocopherols: Florisil, silicic acid, and secondary magnesium phosphate. J. Chromat., 27:96 - 103, 1967.
- CACEX - BANCO DO BRASIL S.A. Exportação. Análise Estatística Comparativa. Jan./Set. 1986a.
- CACEX - BANCO DO BRASIL S.A. Informação Semanal. 21(1014):1 - 20, dez. 1986b.
- CACEX - BANCO DO BRASIL S.A. Exportação Análise Estatística Comparativa. Jan./Nov. 1984a.
- CACEX - BANCO DO BRASIL S.A. Importação. Ano 13, t.2. 1984b.
- CAMPSOL, P. et alii. Variation in tocopherols contents of oils during oxidation. An. Bromat. 28(2):199 - 209, 1976.
- CARPENTER Jr., A. P. Determination of tocopherols in vegetable oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., 56(7):668 - 71, 1979.
- CARPENTER, D. L. et alii. Lipid composition of selected vegetable oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., 53(12):713 - 18, 1976.
- CARVALHO, F. C. de et alii. Concentração de capacidade de proces

- samento industrial de soja em grão no Brasil. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA EMBRAPA, 3. Anais... Campinas, 1984. p.1 - 19.
- CASAGRANDE, S. & FRIZZERA, G. Rapid method for determination of vitamin E in vegetable oils. Riv. Soc. Ital. Sci. Alim., 7(5) 369, 1978.
- CAVINS, J.F. & INGLETT, G.E. High-resolution liquid chromatography of vitamin E isomers. Cereal Chem., 51(9/10):605 - 9, 1974.
- CHOW, C. & DRAPER, M. Oxidative stability and antioxidant activity of the tocopherol in corn and soybean oils. Inst. J. Vit. Nutr. Res., 44(3):396, 1974.
- CHOW, C. et alii. Method for assay of free and esterified tocopherols. Anal. Biochem., 32(1):81 - 90, 1969.
- CHRISTENSEN, P. L. Solvent extraction: Recent developments. J. Amer. Oil Chem. Soc., 60(2):214 - 15, 1983.
- CILLARO, J. et alii. α -tocopherol pro-oxidant effect in aqueous media: increased autoxidation rate of linoleic acid. J. Amer. Oil Chem. Soc., 57(8):252 - 55, 1980.
- COLEBY, J. Industrial organic process. In: HANSON, C., ed. Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction. 2 ed. Oxford, Pergamon Press. 1975. p.137.
- CONTE, L. S. et alii. Messa a punto di un metodo di estrazione e dosaggio dei tocoferoli dalle sostanze grasse. La Rivist. Ital. delle Sostanze Grasse, 56(5):183 - 6, 1979.
- CONTRERAS, G., E. Estudos sobre determinação de tocoferóis (vit. E) em alimentos e perspectivas para sua recuperação de resíduos do refino de óleo de soja. REUNIÃO DO CIBRAN, 5. Campinas. 1984. p.73 - 7.

- CONTRERAS,G., E. & STRONG,F.C. Determination of total tocopherols in grains, grain products, and comercial oils,with only slight saponification, and by a new reaction with cupric. ion. J. Agric. Food Chem., 30(6):1109 - 12, 1982a.
- CONTRERAS,G., E. & STRONG,F.C. Determination os tocopherols (vit. E) by reduction of cupric ion. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 65(5)-:1215 - 21, 1982b.
- CONTRERAS,G., E. et alii. Fatty acid and vitamin E content of Nutrimaiz, a sugary/opaque-2 cõrn cultivar. J. Agric. Food Chem., 30(6):1113 - 17, 1982.
- CONTRERAS G., E. Determinação de tocoferóis e tocotrienóis em extratos lipídicos por redução com íons cúpricos. Campinas, FEA-UNICAMP, 1980. (Tese Doutorado).
- CORT, W. M. et alii. Stability of alfa- and gama-tocopherols: Fe³⁺ and Cu²⁺ interactions. J. Food Sci. 43(3):797 - 8. 1978.
- CORT., W. M. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. J.Amer. Oil Chem. Soc., 51(7):321 - 5, 1974.
- CORTESI, N. & FEDELI, E. Further research on the HPLC analysis of unsaponifiable of edible vegetable oils. Suggestion of a method for tocopherol determination. La Riv. Ital. delle Sost. Grasse, 57(1):16 - 9, 1980.
- DEAN, J. A. Liquid-liquid extractions. In: Van NOSTRAND., ed. Chemical Separations Methods. 1 ed. New York, 1969. p.18 - 59.
- DESAI, I. Assay methods. In: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E. New York, Marcel Decker, 1980. p.67 - 98.
- DOBOSZYNSKKA, B. & KACZMAREK, D. Use of TLC and UV

- spectrophotometry for determination of vitamin E. Bromat. Chim. Toksyk., 5(2)121, 1972.
- DUDROW, F. A. Deodorization of edible oils. J. Amer. Oils Chem. Soc., 60(2):272 - 4, 1983.
- EMMERIE, A. & ENGEL, C. Colorimetric determination of tocopherol (vitamin E). Rev. Trav. Chim., 57:1351 - 5, 1938.
- ERICKSON, D. R. Soybean oil: up date on number one. J. Amer. OIL Chem. Soc., 60(2):351 - 6, 1983.
- EVANS, C. D. et alii. Soybean unsaponifiables: hidrocarbons form deodorizer condensates. J. Amer. Oil Chem. Soc., 41(6):406-11, 1964.
- FEDELE, E. & GASPAROLI, A. Composition of commercial deodorant distillates. Riv. Ital. delle Sost. Grasse, 54(12):494 - 501. 1977.
- FEDELE, E. et alii. Determinations of tocopherols in vegetable oils. La Riv. delle Sost. Grasse, 48(11):565 - 9, 1971.
- FEDELE, E. et alii. Triterpene alcohols and sterols of vegetable oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., 43(1/6):254 - 6, 1966.
- FEETER, D. K. Determination of tocopherols, sterols, and steryl esters in vegetable oil distillates and residues. J. Amer. Oil Chem. Soc., 51(4):184 - 7, 1974.
- FREISER, H. Solvent extraction. In: KAGER, B. L. et alii, ed. An. Introduction to Separation Science. 2 ed. New York, John Wiley & Sons. 1973. p.242 - 50.
- FUKUSAWA, K. et alii. Antioxidant activities of tocopherols on iron-(2+)-ascorbato induced lipid peroxidation in lecithin

liposomes. Lipids, 17(7):511 - 3, 1982.

GAVIN, A. M. Deodorization and finished oil handling. J. Amer. Oil Chem. Soc., 58(3):175 - 84, 1981.

GAVIN, A. M. Edible oil deodorization. J. Amer. Oil Chem. Soc., 55(11):783 - 91, 1978.

GERTIG, H. & DUDA, G. Evaluation of results of tocopherols determination in vegetable oils. Bromat Chim. Toksyk., 11 (2) 210, 1978.

GILBERT, W. J. & TANDY, D. C. Odor control in edible oil processing. J. Amer. Oil Chem. Soc., 56(10):654A - BA., 1979.

GLAVINN, A. & HOLMER, G. Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl. J. Amer. Oil Chem. Soc., 44:539 - 42, 1967.

GOVIND, R., M. K. & PERKINS, E. G. Identification and estimation of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils using gas-chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 20(2): 240 - 5, 1972.

GRAY, J. et alii. Inhibition of N-nitrosamines in bacon. Food Tech., 36(6):39 - 45, 1982.

GUTFINGER, T. & LETAN, A. Tocopherols in several vegetables oils. Riv. Ital. delle Sost. Grasse, 52(6):191 - 4, 1975.

GUTFINGER, T. & LETAN, A. Studies of unsaponifiables in several vegetables oils. Lipids, 9(9):658 - 63, 1974a.

GUTFINGER, T. & LETAN, A. Quantitative changes in some unsaponifiable components of soya bean oil due to refining. J. Sci. Food Agric., 25:1143 - 7, 1974b.

- HAFEZ, Y. S. Nutrient composition of different varieties and strains of soybean. Nutr. Reports Intern., 28(6):283 - 7, 1983.
- HANSON, C. Solvent extraction: The current position. In: HANSON, C. , ed. Liquid=Liquid Extraction. 2 ed. Oxford. Pergamon Press. 1975. p.1 - 13.
- HARA, K. et alii. Extraction rate of tocopherols using various solvents. J. Jap. Soc. Food Nutr., 29(4)235, 1976.
- HARRIS, R. S. Nomenclature and formules of tocopherols. In: SEBREL, Jr. ed. The vitamins, New York, Academic Press, V. 5, 1972, p: 166 - 7.
- HERTING, D. C. & DRURY, E. J. E. Alfa-tocopherol content of cereal grains and processed cereal. J. Agric. Food Chem., 17(4): 785 - 90, 1969.
- HOFFMANN, R. L. et alii. Soybean unsaponifiables: chromatographic investigation of shell drain condensate from a commercial deodorizer. J. Amer. Oil Chem. Soc., 41(6):116 - 9, 1964.
- HOFFMANN, R. L. et alii. Soybean unsaponifiables: chromatographic separations and characterization. J. Amer. Oil Chem. Soc., 39:323 - 7, 1962.
- HONNOLD, D. et alii. An automated method for determining tocopherol in deodorized soybean oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., 46(6):339 - 40, 1969.
- HORAN, F. E. Soy protein products and their production. J. Amer. Oil Chem. Soc., 51(1):67A - 73A, 1974.
- HUNTER, J. E. Nutritional consequences of processing soybean oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., 58(3):283 - 7, 1981.

- ITOH, T. et alii. Sterol composition of 19 vegetable oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., 50(4):122 - 5, 1973.
- JAWAD, I. et alii. The physical refining of edible oils. Lebensmittel Wissenschaft Tech., 17(5):289, 1983.
- JAWAD, I. et alii. Quality characteristics of physically refined soybean oil. Food Technology, 18(3):353, 1983.
- JOHNSON, L. A. & LUSAS, E. W. Comparison of alternative solvents for oils extraction. J. Amer. Oil Chem. Soc., 60(2):229 - 41. 1983.
- JOHNSON, F. C. & PYE, J. A. The antioxidant vitamins. C. R. C. Critical Review in Food Sci. and Nutrition, 11(3):217, 1979.
- KANEMATSU, H. et alii. Comparison of tocopherol contents in crude and refined edible vegetable oils and fats by HPLC. J. Jap. Oil. Chem. Soc., 32(2):122, 1983.
- KASPAREK, S. Chemistry of tocopherols and tocotrienols, In: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E. New York, Marcel Dekker. 1980. p.7 - 65.
- KATO, A. et alii. Esterified tocopherols and tocotrienols in rice bran oil, soybean oil and sesame oil. J. Japan. Oil Chem. Soc., 30(8):515 - 6, 1981.
- KAWASHIMA, K. et alii Synergistic ternary antioxidant compositions comprising tocopherols partial hydrolyzate of gelatin and organic acid. Agric. Biol. Chem., 43(4):827, 1979.
- KE, P. J. & WOYEWODA, A. D. A titrimetric method for determination of free fatty acids in tissues and lipids with ternary solvents and m-cresol purple indicator. Anal. Chem. Acta, 99: 387 - 91. 1978.
- KEHSE, M. Lavage des éluats et récupération des distillats in

- desodorisation. Rev. Frç. des Crops Gras, 23(9):493 - 6, 1976.
- KHAFIZOV, R. et alii. Study of soybean tocopherols. Prik. Biok. Mikrob., 7(4)394, 1971.
- KHAFIZOV, R. et alii. Modification of tocopherols in soybean oil treatment. Tr. Khab. Politekh. Inst., № 12:110, 1968.
- KIM, S.K. & RHEE, J.S. Isolation and purification of tocopherols and sterols from distillates of soy oil deodorization. Korean J. Food Sci. Technol., 14(2):174 - 8, 1982.
- KIM, J.S. Studies on the utilization of deodorized condensates from vegetables oils. J. Korean Chem. Soc., 18(4)294, 1974.
- KING, R. Direct addition of tocopherols to milk for control of oxidized flavour. J. Dairy Sci., 51(10):1705 - 1707, 1968.
- KLYUCHKIN, V. & SAFRONOVA, N. Changes in contents of biologically valuable substances during heat processing of soybean. Nanch. Issled. Inst. Zhirov., 29:71, 1972.
- KOCHHAR, S. P. Influence of processing on sterol of edible oils. Prog. Lip. Res., 22(3):161 - 188, 1983.
- KOMODA, M. & HARADA, I. A dimeric oxidation product of tocopherol in soybean oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., 46(1):18 - 22, 1969.
- KOMODA, M. et alii. Intracellular distribution of tocopherol in soybean cotyledons. Cereal Chem., 45(6):581 - 8, 1968.
- KOYAMA, H. et alii. A micromethod for the determination of tocopherols in vegetable oils using HPLC. Meijo Daigaku Nogaku bu Gakujutsu Hokoku, 18:25, 1982.
- LANDERS, R. E. & RATHMANN, D. M. Vegetable oils: effects of

processing, storage and use on nutritional values. J. Amer.Oil Chem. Soc., 58(3):255 - 9, 1981.

LARS, J. & NILSSON, G. Oxidation of tocopherols. Procc. Scand. Symp. Lipids, 9th:352 - 5, 1977.

LEHMANN, J. & SLOVER, H. T. Relative autoxidative and photolytic stabilities of tocopherols and tocotrienols. Lipids, 11(12):853 - 857, 1976.

LERCKER, G. et alii. High resolution gas chromatography in the study of the unsaponifiable fraction of vegetable oil. Riv. Ital. delle Sostanze Grasse, 58(7):324 - 30, 1981.

LIEBING, Von H. et alii. Waste water cleaning of deso-plants by 2-steps mixed fatty acid condensation and winning of fraction enriched by tocopherol. Fette. Seifen. Anstrichmittel, 85(7): 289 - 92, 1983.

LIENER, I. E. Nutritional value of food protein products In: SMITH, A. K. & CIRCLE, S. J., ed. Soybean Chemistry and Technology. Westport, AVI. 1978. v.1. p.203 - 77.

LOSI, G. & PIRETTI, M. V. Determination of tocopherols in vegetable oils and its applications to the genuineness control. La Riv. Ital. delle Sostanze Grasse, 47(10):493 - 8. 1970.

LOURY, M. Une methode gènèrale permettant la transformation rapide des corps gras en esteres methyliques. Rev. Franç. des Crops Gras., 14:383 - 9, 1967.

MANZ, U. & PHILIPP, K. A method for the routine determination of tocopherols in animal feed and human foodstuffs with the aid of HPLC. Mitt. Gebiete Lebens. Hygiene, 70(4):476, 1979.

MANZ, U. et alii. Quantitative determination of α -tocopherol in

foods and feeds and in vitamin premixes and concentrates. Internat. J. Vit. e Nutr. Res., 51(4)342, 1981.

MARIANI, C. & FEDELI, E. Rapid methods for the analysis of vegetable oils: Note 1: Simultaneous determination of sterols and tocopherols. La Riv. Ital. delle Sost. Grasse, 59(11):557-65, 1982.

MATTIL, K. F. Deodorization, In: SWERN, D., ed. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 3 ed. New York, Wiley Interscience Pub. 1964. p.898 - 930.

McBRIDE, H. & EVANS, D. Rapid voltametric method for the estimation of tocopherol and antioxidants in oils and fats. Anal. Chem., 45(3):446 - 9, 1973.

MERCADANTE, A. Z. e RODRIGUEZ-AMAYA, D. Avaliação da composição de ácidos graxos de óleos comestíveis. Bol. SBCTA, 20(1/2):29-40, 1986.

METCALFE, L. D. et alii. Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 45(3):514 - 5, 1966.

MILLER, J. M. Separation Methods in Chemical Analysis. 1 ed. New York, Wiley Interscience. 1975.

MIZOBUCHI, T. et alii. Study on the analysis of tocopherols by thin-layer chromatography. Joshi Eiyo Daigaku Kiyo, 6:13, 1975.

MORDRET, F. Les tocophérols des huiles végétales I. Rev. Franç. des Crops Gras., 17(7):467 - 73, 1970a.

MORDRET, F. Les tocophérols des huiles végétales II. Rev. Franç. des Crops Gras., 17(8/9):537 - 49, 1970b.

- MULLER-MULOT, W. Rapid method for the quantitative determination of individual tocopherols in oils and fats. J. Amer. Oil Chem. Soc., 53(12):732 - 6, 1976.
- NADIROV, N. et alii. Assay of tocopherols in vegetable oils by TLC. Prikladnaya Biok. Mikrob., 9(3)468, 1973.
- NAGAI, M. Antioxidant capability of MTC. New Food Ind. 24(8) 1-7, 1982.
- NAUDET, M. et alii. Distribution of sterols during deodorization of vegetable oils. Rev. Franç. Crops Gros, 20(1)27, 1973.
- NAUDET, M. & CECCHI, G. Sur la nature et la composition des produits éliminés au cours de la désodorisation II. Rev. Franç. des Crops Gras., 17(8/9):529 - 35, 1970.
- NAUDET, M. et alii. Sur la nature et la composition des produits éliminés au cours de la désodorisation I. Rev. Franç. des Crops Gras., 16:259 - 268, 1969.
- NELSON, J. P. et alii. Gas chromatographic determination of tocopherols and sterols in soya sludges and residues - an improved method. J. Amer. Oil Chem. Soc., 47(7/12):259 - 261, 1970.
- NELSON, J. P. & MILUN, A. J. Gas chromatographic determination of tocopherols and sterols in soya sludges and residues. J. Amer. Oil Chem. Soc., 45(12):848 - 51, 1968.
- NIEKERK, P. J. Van. The direct determination of free tocopherols in plant oils by liquid-liquid chromatography. Anal. Biochem., 52(2):533 - 7, 1973.
- NISSHIN OIL MILLS, Ltd. Tocopherols from soybean deodorization by-products. Patent Ja.82.16.876(cl.co7D311/72) Chem. Abs., 97. 24044W, 1980.

- NORRIS, F. A. Extraction of fats and oils. In: SWERN, D., ed. Bailey's Industrial Oils and Fats Products. New York, Interscience. 1964. p.637 - 792.
- PARRISH, D. B. Determination of vitamin E in foods - A review. C.R.C. Critical Review Food Sci. Nutr., 13(2):161 - 87, 1980.
- PATTON, S. et alii. n-Deca-2,4-dienal, its origin from linoleate and flavour significance in fats. J. Amer. Oil Chem. Soc., 36: 280 - 3, 1959.
- POKORNY, J. et alii. Stability on stabilization of tocopherols in deodorant condensates. Nahrung, 18(6/7):635, 1974.
- PRIESTLEY, D. A. et alii. Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging. Plant Physiolog., 66(4):715 - 9, 1980.
- PUDROW, F. Deodorization of edible oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., 60(2):272 - 4, 1983.
- RACKIS, J. J. Biologically active components, In: SMITH, A. K. & CIRCLE, S. J., ed. Soybeans Chemistry and Technology. Westport, AVI, v.1. 1978. p.158 - 202.
- RAWLINGS, H. W. et alii. The determination of tocopherol content during the commercial processing of soybean oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., 25:24 - 7, 1948.
- SANO, M. et alii. Antioxidant for lipid. Patent Ja. 78.106.710. Chem. Abs., 90:21088h, 1978.
- SCHUDEL, P. et alii. Chemistry of tocopherols, In: SEBRELL Jr., W. H. & HARRIS, R. S., ed. The Vitamins. 2 ed. New York, Acad. Press. v.5. 1972. p.168 - 217.

- SEINO, H. et alii. Studies on antioxidative compounds in the deodorizer sludge of soybean oil. J. Japan. Oil Chem.Soc., 20 (4):218, 1971.
- SHERWIN, E. R. Antioxidants for vegetable oils. J. Amer.Oil Chem. Soc., 53(6):430 --6, 1976.
- SKOOG, D. A. & WEST, D. M. Fundamentals of Analytical Chemistry. 2 ed., New York, H. Reinehart & Winston. 1969.
- SLOVER, H. T. et alii. Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc., 60 (8):1524 - 8, 1983.
- SLOVER, H. T. Tocopherols in foods and fats. Lipids, 6:291 - 6, 1971.
- SLOVER, H. T. et alii. Vitamin E in foods: determination of tocol and tocotrienols. J. Amer. Oil Chem. Soc., 46(8):417-20, 1969.
- SLOVER, H.T.et alii. Identification and estimation of tocopherols by gas-liquid chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc., 44:161-6, 1967.
- SMITH, A. K. & CIRCLE, S. J. Historical background chemical composition of seed, In: SMITH, A. K. & CIRCLE, S. J., ed. Soybeans Chemistry and Technology. Wesport, AVI. v.1. 1978.
- SOCIETE d'Alimentation et de Recherches Biologiques-SARB. Process for concentration of the unsaponifiable fraction of fatty substances. Patent Fr. 2.10.288. FSTA, 5:2N83, 1972.
- STAGE, H. Physical refining and deodorization of food oil I. Fette Seigen Anstrichmittel, 84(10):377 - 395, 1982.
- STIRTON, A. J. Fractionation of fatty acids, In: SWERN, D., ed.

- Bailey's Industrial Oil and Fat Products. New York, Interscience. 1964. p.1005 - 37.
- STURM, P. A. et alii. Quantitative determination of individual tocopherols by thin layer chromatographic separation. Anal. Chem., 38:1244 - 7, 1966.
- SWERN, D. Structure and composition of fats and oils, sources, utilization and classification of fats and oils, In: SWERN, D., ed., Bailey's Industrial Oil and Fat Products. New York, Interscience. 1964. p.3 - 53, 153 - 247.
- TAKAGI, Y. & KAI, Y. Tocopherol concentrates. Patent D.E 3.126.110 (cl. Co7D3.11/72). Chem. Abs., 96:199939y, 1980.
- TANAKA, N. Effect of dl- α -tocopherols on antibotulinal effectiveness of sodium nitrite in bacon. J. Food Sci., 47 (6):1797, 1982.
- TAGNEY, C. C. et alii. Separation of vitamin E isomers by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 172:513 -5, 1979.
- TATSUMI, S. et alii. Determination of tocopherols by thin-layer chromatography and densitometry. Eiyo to shokuryo, 34(5)465, 1981.
- TAYLOR, S. L. et alii. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. Lipids, 11(7):530 - 8, 1976.
- THOMPSON, J. N. et alii. Determination of vitamins E and K in foods and tissues using high performance liquid chromatography. Proc. Food Pharm. Symp. Assoc. Vit. Chem. 1978. p.84 - 102.
- TREYBAL, R. E. Liquid Extraction. 1 ed. New York, McGraw Hill Book Co. 1951. p.2 - 96.

- VITALI, G. Identification and dosage of the tocopherols in the vegetable oils. Industrie Alimentari, 11(2):69 - 74, 192.
- WHITTLE, K. J. & PENNOCK, J. F. The examination of tocopherols by two-dimensional thin-layer chromatography and subsequent colorimetric determination. Analyst, 92:423 - 30, 1967.
- WOLF, F. J. Solvent extraction, In: Methods in Organic Chemistry and Biochemistry. 2 ed. London, Academic Press.1971. p.8 - 99.
- YAMAUCHI, R. 7 MATSUSHITA, S. Determination of tocopherols in vegetable oils by thin-layer chromatography. J.Agric.Chem.Soc. Jap., 52(1)51, 1978.
- YUKI, E. et alii. Inhibition effect of lecitin on the termal oxidation of tocopherols. J. Jap. Oil Chem. Soc.27(7)425,1978.
- ZANDY, P. & McKAY, J. E. Determination of tocopherols in soybean oil using fractional crystallisation. J. Sci. Food Agric., 27 (9):843 - 8, 1976.
- ZEHNDER, C. T. Deodorization - 1975. J. Amer. Oil Chem. Soc., 53 (6):364 - 9, 1976.
- ZEMANOVIC, J. Deodorization of vegetable oils. Conference Proceed. Bratislava Czechoslovakia Slov. Chim., 1973.
- ZONTA, F. & STANCHER, B. High-performance liquid chromatography of tocopherols in oils and fats. La Riv. Ital. delle Sost., Grasse, 60(4):195 - 9, 1983.