

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ESTUDO DA REMOÇÃO DE FOSFATÍDEOS
DE ÓLEO DE SOJA
E SEU CONTROLE ANALÍTICO

Moacir Cardoso Elias
Engenheiro Agrônomo

Orientador:

Prof. Dr. Leopold Hartman

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

-1979-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À REGINA, MINHA MULHER

A MEUS PAIS

A MEUS IRMÃOS

AGRADECIMENTOS

Ao incansável Orientador, Dr. Leopold Hartman, amigo, dedicado e grande estimulador deste trabalho, um agradecimento especial.

À Universidade Federal de Pelotas, através da Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" e à Universidade Estadual de Campinas, através da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, pelas facilidades oferecidas;

Ao PICD/CAPES, pela bolsa concedida;

Ao Dr. Paulo Anna Bobio e sua equipe, pela gentil permissão de usar aparelhos de seu laboratório;

Aos colegas Leonor Almeida de Souza Soares, Pedro Luiz Antunes e Walter Esteves, pelo estímulo, apoio e sugestões apresentadas;

Ao Dr. Francisco Priesner, ao Prof. Ricardo Carneiro da Silva e respectivos familiares, pela hospitalidade, ajuda e apoio dispensados;

Aos colegas, amigos e a todos que colaboraram para a execução deste trabalho,

os agradecimentos sinceros do autor.

Í N D I C E

	página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1) Compostos de Fósforo em Grãos de Soja	06
2.2) Fosfatídeos em Óleo de Soja	08
2.3) Métodos de Degomagem	13
2.4) Determinação de Fósforo e Fosfatídeos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1) Materiais	22
3.2) Métodos	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1) Características das Amostras de Óleo de Soja	28
4.2) Degomagem	31
4.3) Degomagem e Neutralização	37
4.4) Determinação de Fósforo e Fosfatídeos	41
4.5) Fatores de Conversão de Fósforo em Fosfatídeos	45
4.6) Considerações Sobre o Método de Digestão Alcalina	46
5. CONCLUSÕES	47
6. BIBLIOGRAFIA	48

R E S U M O

Foram efetuadas degomagens de quatro amostras de óleo bruto comercial de soja, com soluções de reagentes neutros, básicos e ácidos, empregando-se 3% de cada solução (volume/peso do óleo), a 55-60° C, durante 30 minutos, seguidas por centrifugação. O emprego de solução aquosa de hidróxido de amônio em quantidade estequiométrica, seguido por neutralização dos ácidos graxos livres residuais com solução de hidróxido de sódio a 10%, reduziu o conteúdo de fósforo dos óleos a menos de 0,0004%, o que está em acordo com as exigências industriais.

As perdas totais de degomagem e de neutralização, resultantes desse tratamento, foram 2-2,5% menores do que pelo processo convencional, ou seja, degomagem com água e neutralização com hidróxido de sódio.

As determinações de fósforo nos óleos, brutos e depois de vários tratamentos, foram efetuadas por um método desenvolvido durante o presente trabalho, baseado na digestão alcalina da amostra, com o uso de cadinho de teflon.

S U M M A R Y

Four samples of commercial crude soyabean oil were degummed with solutions of neutral, basic and acid reagents, using 3% (v/weight of oil) of each solution with agitation during 30 min. at 55-60° C, followed by centrifugation. Aqueous solution of ammonium hydroxide employed in stoichiometric proportion, followed by neutralization of residual free fatty acids with 10% sodium hydroxide solution reduced the phosphorus content of the oils to less than 0,0004%, which is in accordance with industrial requirements.

The total degumming and neutralization losses resulting from the above mentioned treatment were 2-2,5% lower than those of the conventional process, i.e. degumming with water and neutralization with sodium hydroxide.

The determinations of phosphorus in crude and treated oils were effected according to a method developed during the present work and based on alkaline digestion of oil samples in teflon crucibles.

1. INTRODUÇÃO

A soja é um dos produtos agrícolas mais antigos que o homem conhece. Os primeiros dados escritos sobre esta leguminosa provém da China, do ano 2800 a.C.. A palavra soja é de origem chinesa: CHIANG-YTU, traduzida pelos japoneses para SO-YA. Dados sobre a produção de óleo são encontrados em desenhos babilônicos dessa época.

Embora os grãos de soja tenham sido conhecidos e usados na China e no Japão há milhares de anos, como alimento e para fins industriais, apenas a partir do final do século passado, a atenção do mundo ocidental tem realmente se voltado para ela como semente oleaginosa. Durante a primeira Guerra Mundial, o interesse pelo cultivo de soja no ocidente, em particular nos Estados Unidos, aumentou muito.

Paralelamente ao aumento da produção e da importância da soja disponível, foram obtidos desenvolvimentos nas técnicas de extração e de refinação, melhorando em muito a qualidade final do óleo comestível obtido.

No Brasil, o interesse pela cultura da soja iniciou-se no Rio Grande do Sul, mas até a década de 50 sua produção foi insignificante. A partir dos anos 60, a produção passou a aumentar aceleradamente, praticamente duplicando a cada dois anos. A cultura dessa oleaginosa, embora ainda mais concentrada no próprio Rio Grande do Sul e nos estados do sul do país, já se estende por grande parte do território nacional.

O óleo bruto de soja tem se destacado como um importante produto de exportação. No entanto, seus fosfatídeos e outros compostos conhecidos como "gomas" separam-se do óleo, causando dificuldades de operação e aumentando os custos de transporte. Frequentemente, o óleo extraído numa indústria é refinado em outras a grandes distâncias.

Devido aos fatos acima mencionados, os compradores exigem atualmente que o óleo seja previamente degomado. Isto não só se aplica à exportação, como também ao mercado interno e, atualmente, a maioria das indústrias extratoras dispõe de instalações para a degomagem do óleo bruto.

Durante as etapas de refinação do óleo para torná-lo comestível, tais como: Neutralização dos ácidos graxos livres, Secagem, Clarificação e Desodorização, as substâncias mucilaginosas, quando presentes, produzem efeitos prejudiciais. Assim:

(a) Quando da Neutralização, que usualmente é feita com adição de uma solução de hidróxido ou de carbonato de sódio, as substâncias mucilaginosas dificultam a separação da "borra" e exibem uma ação emulsificante, arrastando uma certa quantidade de óleo neutro. Isso provoca consideráveis perdas de refinação e desperdício de fósforo orgânico.

Além disso, sabões contendo "gomas" apresentam extrema dificuldade durante a acidulação subsequente, devido a formação de emulsão água-óleo-ácido.

(b) A presença de substâncias mucilaginosas pode impedir, quando da Secagem e da Clarificação, a remoção do sabão residual, dificultando essas operações.

(c) A temperatura elevada, durante o processo de Desodorização, causa a decomposição parcial dos materiais mucilaginosos, produzindo coloração, sabores e odores prejudiciais.

Assim, um grande número de trabalhos sobre processamento do óleo tem se voltado aos métodos de degomagem. Esses trabalhos tem visado eliminar os materiais mucilaginosos antes da desacidificação do óleo e, ao mesmo tempo, extrair os fosfatídeos como subprodutos valiosos.

A degomagem industrial do óleo de soja bruto é feita, normalmente, pela adição de 1,5 a 3,0% de água. Esta prática não remove totalmente os fosfatídeos, uma vez que, segundo alguns autores, eles se apresentam em duas categorias: os fosfatídeos hidratáveis e os não hidratáveis.

No presente trabalho se procurou comparar métodos de degomagem, tentando encontrar um que reduzisse o teor de fosfatídeos a níveis aceitáveis no óleo, não prejudicasse o valor dos fosfatídeos extraídos e diminuísse as perdas de refinação.

Para avaliar o sucesso de degomagem é necessário estimar as "gomas" no óleo bruto e em várias etapas de refinação. Estes métodos consistem em separar as "gomas" com reagentes apropriados ou determinar o conteúdo de fósforo elementar. A separação das "gomas" pode ser aplicada somente a óleo bruto, enquanto a determinação de fósforo pode ser feita em todas as etapas, por métodos gravimétricos, volumétricos ou colorimétricos, em escala micro e semi-micro.

Os métodos usuais são morosos e exigem muito trabalho, alguns deles inclusive apresentando riscos para o operador.

Considerando-se que o presente trabalho necessitava de centenas de estimações, procurou-se desenvolver um método de determinação de fósforo mais rápido, menos trabalhoso e, ao mesmo tempo, com precisão adequada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo dados de anuários estatísticos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1968 o Brasil produziu 654 476 toneladas de soja; em 1973, 5 011 614 toneladas e em 1975, 9 893 008 toneladas. Para a safra de 1978, a produção estimada foi de, aproximadamente, 12 500 000 toneladas.

Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, nesta ordem, são os maiores produtores nacionais. Até 1968, estes quatro estados juntos representavam cerca de 99% da produção total brasileira, passando para aproximadamente 95% em 1973 e mantendo essa proporção em 1975.

A descentralização da produção é notada principalmente se verificando que em 1968 o Rio Grande do Sul produziu aproximadamente 66% do total brasileiro, passando para 57% em 1973 e 47% em 1975. Essa variação se deveu, principalmente, ao aumento na produção dos outros três estados já referidos e ao cultivo em outras regiões. Atualmente a cultura desta oleaginosa se estende por quase todo o território nacional.

Em virtude dessas produções, a soja passou, nos últimos anos, a ser importante produto de exportação, juntamente com seus derivados principais, óleo bruto, óleo refinado, farelo e torta.

Atualmente o Brasil ocupa o segundo lugar mundial na produção e exportação de soja e seus subprodutos, depois dos Estados Unidos.

A soja em grãos contém cerca de 20% de óleo de boa qualidade, podendo-se até dizer excelente sob o ponto de vista de ácidos graxos essenciais e poliinsaturados. Seu óleo bruto apresenta, além de triglicerídeos, ácidos graxos livres, matéria insignificável e mucilagens, uma quantidade de 1-3% de fosfatídeos (074,083,102,122), cuja remoção foi um dos principais objetos do presente trabalho.

O óleo bruto de soja tem se destacado como importante produto de exportação, no entanto, seus fosfatídeos e outros compostos conhecidos como "gomas" separam do óleo, causando dificuldades de operação e aumentando os custos de transporte (075).

Frequentemente, o óleo extraído numa indústria é refinado em outras, a grandes distâncias. Devido a esses fatos, os compradores exigem atualmente que o óleo seja previamente degomado. Isto não só se aplica à exportação, como também ao mercado interno e, atualmente, a maioria das indústrias extratoras dispõe de instalações para a degomagem do óleo bruto.

2.1) Compostos de Fósforo em Grãos de Soja

Para entender a presença de fosfatídeos em óleo de soja, uma breve exposição sobre a ocorrência de compostos de fósforo nos grãos desta leguminosa parece indicada:

Geralmente se assume que o fósforo em plantas está constantemente presente na forma de fosfatos como ácidos nucleicos; ésteres não nitrogenados do ácido fosfórico, como fitina, ácido hexosefosfórico e ácido glicerofosfórico; fosfato inorgânico e fosfatídeos.

Earle & Milner (035) determinaram a distribuição do fósforo na soja entre esses grupos e chegaram aos seguintes valores:

fitina	75%
fosfatídeos	13%
fosfatos inorgânicos e outros	12%.

Os lipídeos da célula vegetal ocorrem em forma de pequenas gotas suspensas no citoplasma. Uma certa quantidade de fosfatídeos ocorre em conexão com essas gotículas, ou como uma linha de fosfatídeos ao redor da gota, na forma de gotículas separadas dos lipídeos. Assume-se que outros fosfatídeos estão localizados na membrana plasmática, na qual, juntamente com o colesterol, toma parte importante a regulação da difusão através da parede celular.

Uma certa quantidade de fosfatídeos ocorre em combinação com os carboidratos. Winterstein & Hiestand (148) determinaram o conteúdo de carboidratos de soja e encontraram cerca de 25% de polissacarídeos, os quais por hidrólise se convertem em glicose, galactose, pentose e metilpentose. Os fosfatídeos de soja podem formar complexos com esses carboidratos.

Além dos complexos açúcares-fosfatídeos já mencionados, há provavelmente outros complexos em cuja composição participam os fosfatídeos, como as lipoproteínas. Estes complexos ocorrem extensivamente nas plantas e se assume que ocorram em soja (053, 064).

Parte do fósforo que ocorre na soja está presente na forma de nucleoproteínas e ácidos nucleicos (015), que são encontrados principalmente no núcleo celular e, em menor quantidade, no citoplasma.

plasma.

O fósforo está presente no citoplasma em forma de fosfato inorgânico, o qual, junto ao ácido carbônico, constitui o mais importante sistema tampão na célula vegetal.

Outros compostos de fósforo que ocorrem nas células vegetais, particularmente no citoplasma, são os ácidos glicerofosfórico, hexosefosfórico e inositolmonofosfórico.

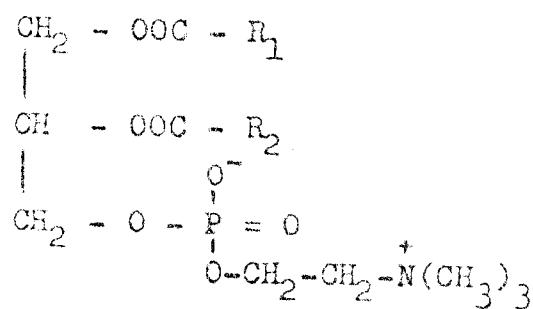
A soja, então, contém um certo número de compostos de fósforo, sendo de se esperar que alguns deles estejam presentes no óleo.

2.2) Fosfatídeos em Óleo de Soja

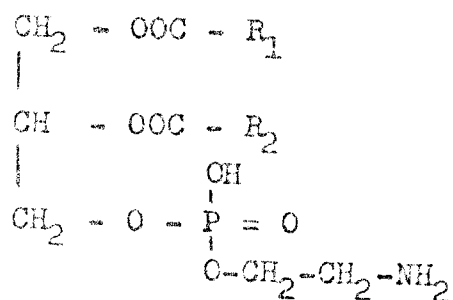
2.2.1) Nomenclatura e Composição dos Fosfatídeos

Até o começo deste século, os fosfatídeos eram considerados como consistindo de duas substâncias, cuja separação dependia de suas diferentes solubilidades no etanol. A parte solúvel era conhecida como lecitina e a insolúvel, como cefalina.

Representando-se os radicais de ácidos graxos por OCR_1 e OCR_2 , tem-se as seguintes fórmulas:



lecitina

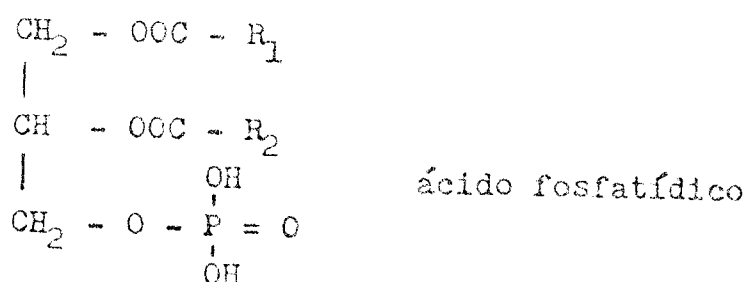


cefalina

Essas duas substâncias, no entanto, não se separam completamente pelo etanol (065,093).

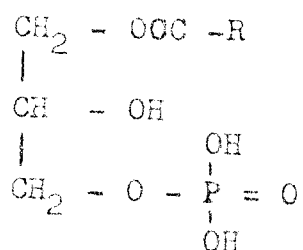
Visto que tanto a fração solúvel como a insolúvel consistem de vários grupos de substâncias, deve ser adotada uma terminologia apropriada, como a usada por Wittcoff (149), também seguida por Nielsen (101), para caracterizar os fosfatídeos.

De acordo com essa terminologia, a mesma a ser adotada neste trabalho, pela retirada do composto nitrogenado do fosfatídeo tem-se o ácido fosfatídico, cujo radical se denomina fosfatidil.



A denominação do fosfatídeo é feita pela junção do radical ao nome do composto nitrogenado. Assim, dependendo do composto que esterifica o grupo fosfórico do ácido fosfatídico, tem-se fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina e assim por diante.

Se um dos ácidos graxos for eliminado da molécula do fosfatídeo, o resultado será um lisofosfatídeo, cujo ácido correspondente será um ácido lisofosfatídico:



Toyama & Toyama (136) examinaram os fosfatídeos do óleo de soja e reportaram a presença de fosfatidilcolina, fosfatidileta-

nolamina, lisofosfatidilcolina, ácidos fosfatídicos e jecorina (provavelmente um carboidrato contendo fosfatidilcolina) nesse material.

Muitas controvérsias surgiram sobre a forma como os carboidratos ocorrem junto aos fosfatídeos.

Rewald (116,117) foi de opinião de que nenhum carboidrato ocorre em combinação química nos fosfatídeos de soja, uma vez que ele foi capaz de remover todos eles dos fosfatídeos utilizando meios físicos.

McKinney et alii (092) demonstraram que a parte dos açúcares nos fosfatídeos de soja está ligada à "lecitina" através de uma ligação glicosídica.

Scholfield et alii (121) demonstraram que os fosfatídeos e os açúcares ocorrem em ambas as formas, na soja, combinada e não combinada. Açúcares livres abrangem sacarose, estaquiose e rafinose. A maior parte do açúcar combinado pode ser encontrada na fração fosfoinositídeo. Outros açúcares combinados compreendem galactose, manose e arabinose.

De acordo com Hvolby (067) e Nielsen (101), existem no óleo dois grupos de fosfatídeos: aqueles que são removidos pela degomagem com água, denominados hidratáveis e aqueles que não são removidos pela degomagem com água e são denominados fosfatídeos não hidratáveis.

2.2.2) Fosfatídeos Hidratáveis

Tecnologicamente, fosfatídeos hidratáveis são aqueles que podem ser removidos do óleo bruto pela degomagem com água, for-

mando pela ação desta, em condições apropriadas, hidratos insolúveis no óleo, o que possibilita a separação.

Quimicamente, os fosfatídeos hidratáveis são aqueles em que um grupo fortemente polar, como uma base nitrogenada, esterifica um dos radicais ácidos do ácido fosfatídico. Como exemplos se tem fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (067).

Para Helme (062), uma adição de 3,5% de água ao óleo bruto é capaz de remover cerca de 88% dos fosfatídeos presentes. Um aumento na quantidade de água pode aumentar a quantidade de fósforo retirada, até um certo limite.

Desnuelle et alii (033) submeteram um óleo com fosfatídeos ao contato com a água e verificaram uma penetração da água na fase oleosa, formando um complexo que contém glicerídeos e fosfatídeos, o qual denominaram fase dupla.

Isto é de grande importância tecnológica, porque demonstra que grande parte do óleo neutro contido na "lecitina" não está presente em forma de emulsão, mas é, em realidade, um componente da estrutura dos materiais hidratados. Assim, sua presença é absolutamente inevitável (032).

A hidratação dos fosfatídeos também é influenciada pelo conteúdo de ácidos graxos livres do óleo. Molines & Desnuelle (098) demonstraram que há necessidade de grande quantidade de água para remover a "lecitina" de óleos com acidez elevada.

2.2.3) Fosfatídeos Não Hidratáveis

Por mais vezes que seja adicionada água ao óleo bruto, é

impossível diminuir seu conteúdo de fosfatídeos abaixo de um certo valor. Isto indica a presença de uma certa quantidade de fosfatídeos que não são removíveis pela ação da água, ou seja, não são hidratáveis (067).

Não havendo grupo fortemente polar, como serina, etanolamina, colina, inositol (058,067,101,122), o fosfatídeo não se hidrata em condições normais. A maior parte dos fosfatídeos não hidratáveis, no óleo de soja, se apresenta sob a forma de sais de cálcio e de magnésio (067,101) dos ácidos fosfatídicos e lisofosfatídicos.

Os fosfatídeos não hidratáveis (na maioria fosfatidatos e lisofosfatidatos de cálcio e magnésio) podem ser removidos do óleo como componente das micelas ou de emulsificantes, ou por conversão numa forma dissociada, ou ainda, pela remoção do cálcio e do magnésio dos fosfatidatos e lisofosfatidatos (067).

Chibnall & Channon (026) e outros autores (011,103,137) estudaram as condições sob as quais os ácidos fosfatídicos e lisofosfatídicos sofrem hidrólise a ácidos graxos e ácido glicero-fosfórico. Para Olley (103), os sais neutros, como os de cálcio e de magnésio, são provavelmente mais estáveis do que os ácidos livres correspondentes.

Ácido fosfatídico não dissociado e fosfatidatos de cálcio e de magnésio não são hidratáveis (005,101). Ácido fosfatídico dissociado forma micelas (003,004,073) ou cristais líquidos (105) em contato com a água. A capacidade de hidratação aumenta com o grau de dissociação (005).

O ácido fosfatídico e, especialmente, o ácido lisofosfatí-

dico apresentam maior atividade superficial no óleo do que os fosfatídeos hidratáveis correspondentes. Os fosfatidatos e os lisofosfatidatos de cálcio e de magnésio também, aparentemente, apresentam grande atividade superficial (067).

2.3) Métodos de Degomagem

O óleo bruto de soja pode ser degomado, neutralizado e lavado, ou pode ser neutralizado e lavado, sem degomagem. A decisão de como proceder está baseada nas facilidades ou não de aproveitamento da "gomas" separadas.

Se o óleo bruto for degomado, as "gomas" serão processadas para a obtenção da "lecitina" comercial ou adicionadas ao farelo. Se o óleo bruto for neutralizado sem prévia degomagem, então as "gomas" serão removidas junto com os sabões (075).

A degomagem antes da neutralização é recomendável por facilitá-la e reduzir as perdas (134).

Segundo Beal et alii (013), um óleo desodorizado de ótima qualidade é conseguido com 2-20 ppm de fósforo. Uma super-refinação que resulte em conteúdo de fósforo menor do que 2 ppm tem efeito adverso sobre a estabilidade oxidativa e geralmente aumenta a cor do óleo desodorizado.

Os métodos de degomagem encontrados na literatura podem ser classificados em dois grupos: Degomagem com água ou vapor e Degomagem com outros agentes degomadores.

2.3.1) Métodos de Degomagem com Água ou Vapor

Desde que a "lecitina" passou, nas últimas décadas, a ser

considerada um produto de alto valor comercial, tendo aumentado, em consequência, sua demanda, a degomagem do óleo assumiu grande proeminência. Antes disso, grande parte do óleo bruto era neutralizada sem degomagem prévia.

Agitação do óleo bruto misturado com 3% de água, a 60° C , com resfriamento posterior, para separar as "gomas" (018) ou este processo com pequenas variações (069,072,134,144), foram encontrados na literatura consultada.

Boone (020) preconiza o uso de um processo contínuo de degomagem, no qual deve haver a mistura da água ao óleo, a uma temperatura suficientemente alta para coagular as "gomas", com adição posterior de uma solução ácida para atingir pH 3-5, resfriando-se posteriormente, submetendo-se a uma agitação decrescente e separando-se o óleo das "gomas" por centrifugação.

Altas temperaturas podem acelerar a remoção do fósforo, porém, ao mesmo tempo, a "lecitina" pode ser degradada e escurecida (082).

2.3.2) Degomagem com Outros Agentes Degomadores

Na literatura foram encontrados os seguintes processos:

Uso de solução aquosa de hidróxido de bário, o que previne a formação de emulsão durante a subsequente neutralização do óleo (019);

Floculação das mucilagens mediante a aplicação do óleo bruto

to a um campo de alta tensão, a temperaturas ao redor de 100º C (081,138);

Uso de solução 0,5-2,0% de cloreto de sódio (132) ou de tiosulfato de sódio para precipitar as "gomas" e reduzir sua viscosidade (133).

Degomagem com o uso de ácido bórico, ácido tânico, ácido tricloroacético e sulfato de alumínio (068,132).

Uso de solução 0,5-2,0% de hidróxido de sódio (027) ou de detergentes como ésteres de ácidos graxos e álcoois polihidroxilados ou açúcares (hexoses), para degomar o óleo bruto (089,118).

Clayton (029) e outros autores (090,127,135) recomendam o uso de amônia em grande excesso para neutralizar os ácidos graxos livres e com esse procedimento também degomam o óleo bruto. Devido ao grande excesso de amônia utilizado, há necessidade do uso de centrífugas herméticas. Desse processo resulta um subproduto não usual (sabão de amônia) que é semelhante à "lecitina" obtida pela degomagem com água. A amônia pode ser subsequentemente evaporada e reutilizada.

Ácidos orgânicos e anidridos são também indicados para degomagem do óleo bruto de soja. O anidrido acético (040,061,099), por exemplo, é indicado. A quantidade mínima de anidrido necessária é consideravelmente menor do que a quantidade estequiométrica do ácido correspondente. Para completa remoção dos fosfatídeos, usando ácidos orgânicos, a temperatura máxima é ao redor de 40º C, enquanto que para os anidridos, esta temperatura é ao redor de 100º C. O tratamento com anidridos dá óleos mais facilmente branqueáveis do que pelo tratamento com ácidos, porém,

como se trata de material corrosivo, há necessidade de equipamentos especiais.

Hayes & Wolff (061) recomendam aquecer o óleo bruto a 60°C e adicionar 0,1% de anidrido acético. Após 15 minutos, adicionar 1,5% de água e agitar continuamente durante 30 minutos, após o que, centrifugação a 90-100°C separa "gomas" e óleo. O óleo separado deve ser lavado com 10% de água.

Ringers et alii (120) afirmam que os fosfatídeos são removidos do óleo bruto de soja pela adição de ácido cítrico ao óleo com a subsequente dispersão de 0,2-0,5% de água, a 40°C, durante cinco minutos ou mais.

Também o uso de ácidos minerais é recomendado. Braae (021) indica o uso de ácido clorídrico concentrado ou ácido fosfórico a várias concentrações, enquanto Sullivan (128) afirma que aquecimento com 2,0% de água e 0,2% de ácido fosfórico apresentou resultados satisfatórios. Tadokoro et alii (129) confirmaram a eficiência do ácido fosfórico como agente degomador.

A utilização de ácidos minerais tem a desvantagem de escurecer a "lecitina" quando da secagem e pode danificar o óleo. Entretanto, Martinenghi (088) recomenda o uso de 1-2% de ácido sulfúrico (66° Bé) a 15-20°C.

De acordo com Guillaumin (056), o óleo de soja bruto pode ser degomado pelo tratamento com 3% de solução de ácido nítrico a 7%.

Guillaumin & Drouhin (057) recomendam o tratamento do óleo parcialmente degomado com 0,10-0,15% de ácido nítrico, durante uma meia hora, seguida de lavagem e centrifugação. O tratamento

com ácido nítrico elimina praticamente todos os fosfatídeos (055).

Agentes complexadores de cálcio e magnésio, como EDTA e precipitadores de cálcio e magnésio, como fluoreto, sulfato, citrato, oxalato, tartarato, carbonato e fosfato de sódio foram testado por Hvolby (067) e proporcionaram uma redução no teor de fosfatídeos nas amostras analisadas, em determinadas condições de pH, concentração de reagentes, tempo e temperatura de degomagem.

Martinenghi (088) indica a utilização de 0,5-2,0% de fosfato de sódio a 50°C.

Outros meios também foram citados para degomar o óleo bruto de soja, como o citado por Kustappa et alii (079), que recomendam a degomagem pela agitação com 4-5% de água, a 75-80°C, durante 40 minutos, na presença de pequena quantidade de silicone antiespumante, após o que, "goma" e óleo são separados por centrifugação.

Degomagem com ultrafiltração com membranas de colódio (150), diálise (017), eletrodiálise (047), descargas elétricas (081) e tratamento com raio-X e ultravioleta (039) são também citadas.

Teoria e prática dos processos de degomagem foram discutidas recentemente por Braae (022), Brian (023), Carr (025) e Cowan (031).

2.4) Determinação de Fósforo e de Fosfatídeos

A determinação de fosfatídeos pode ser feita aproveitando

sua insolubilidade em acetona (009,066,083) ou pela avaliação do conteúdo de fósforo do óleo e sua conversão em fosfatídeos.

A determinação de fósforo em materiais contendo fosfatídeos geralmente consiste em duas etapas: Destruição do material orgânico e Estimação do fósforo na solução aquosa posteriormente obtida (030).

2.4.1) Destruição do Material Orgânico

A destruição do material orgânico é feita por incineração ou por digestão ácida.

2.4.1.1) Incineração

A incineração pode ser realizada em presença de óxidos de chumbo, de magnésio ou de zinco (014,052,054,142) ou de acetato de cálcio (001).

Nielsen (101), citando Thaler & Just (131) e Mollines (096), recomenda o uso de óxido de magnésio como agente ligante do fósforo e a subsequente incineração num forno elétrico. O tratamento é o seguinte:

Num cadinho de quartzo ou de platina, coloca-se 1-50 gramas de óleo ou uma solução de 0,1-0,2 gramas de fosfatídeo em clorofórmio e se mistura com 2,5 gramas de óxido de magnésio.

Após a evaporação do solvente, o óleo é queimado e incinerado num forno elétrico. As cinzas são dissolvidas numa mistura de ácido nítrico, ácido sulfúrico e água.

2.4.1.2) Digestão Ácida

A destruição de materiais contendo fosfatídeos pode ser

feita utilizando-se ácido nítrico, ácido sulfúrico ou ácido perclórico (016,042,045,046,097,143,152).

Segundo King (076), vários autores recomendam a digestão do material com ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico e nitratos, ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, no entanto, o ácido perclórico se mostra superior.

Harris & Popat (060) testaram a digestão de amostras de óleo com ácido perclórico a 72%, seguindo recomendações de King (076) e de Frampton et alii (043). Apresentam como desvantagem a incompatibilidade do ácido perclórico com o cloreto de estanho, o que impossibilita o uso desse redutor para a determinação colorimétrica do fósforo pelo método azul de molibdênio. Além disso, o ácido perclórico é perigoso, podendo provocar explosões (145).

2.4.2) Estimação de Fósforo

Após extraído o fósforo, sua estimativa pode ser feita por métodos gravimétricos, volumétricos, colorimétricos ou outros.

2.4.2.1) Métodos Gravimétricos, Volumétricos e Colorimétricos

Nos métodos gravimétricos, o fósforo pode ser precipitado, em condições apropriadas, numa das seguintes formas: fosfomolibdato de amônio (038,084,100,106,125,131), fosfato de magnésio (034,091), fosfomolibdato de amônio e magnésio (071), fosfomolibdato de bário (107,108) ou pelo uso de resina de troca iônica (078).

Nos métodos volumétricos, o fósforo, na forma de ácido fos

fórico, pode ser estimado por titulação direta com álcalis (077, 086,113,141,147); na forma de fosfomolibdato de amônio, com permanganato de potássio (114), com hidróxido de sódio (046,151) ou com hidróxido de bário (037); na forma de fosfomolibdato de magnésio, com ácido clorídrico (012); na forma de fosfatos, por titulação com acetato de urânio, nitrato de prata, tiocianato de potássio e sais de chumbo (086,115,124,146) ou, ainda, por iodometria (010).

Colorimetricamente, o fósforo pode ser estimado pela adição, à solução obtida pela extração, de molibdato de sódio, ácido nítrico e sulfato de estricnina (109,110,111); amônia, acetato de urânio, e ácido sulfúrico (051); molibdato de amônio, sulfato de hidrazina e outros reagentes (006,119); molibdato de amônio e tiosulfato de sódio (085); nitrato de prata, éter, acetona e álcool (123,140); cloreto estanoso, sulfomolibdato ou molibdato de amônio ou sódio e outros reagentes (028,042,,052,059).

Outros reagentes indicados para a determinação colorimétrica, são molibdato de amônio, amidol (p-metilaminofenol) e outros reagentes (007,036,048); sulfito e bissulfito de sódio, ácido perclórico e 1-naftol-2-amino-4-sulfonato de sódio (002,076); molibdato de amônio, ácido 1,2,4-aminonaftolsulfônico e outros reagentes (001,024,050,143); metol (2,4-diaminofenol), molibdato de amônio e outros reagentes (060,080,097,130); molibdato de amônio, iodeto de potássio, carbonato de sódio e ácido sulfúrico (063); ácido nítrico, molibdato e vanadato de amônio (049); molibdato de amônio, hidroquinona e ácido sulfúrico (126) ou, ainda, flavazina, ácido clorídrico e tetracloreto de carbono (104).

2.4.2.2) Outros Métodos de Avaliação

Além dos métodos anteriormente mencionados, são encontradas na literatura outras formas de estimação de fósforo, tais como, por fluorescência de raio-X (094,139) ou por cromatografia (008,044,106).

Neste trabalho foi desenvolvido um novo método de estimação de fósforo, aplicável a óleo bruto, óleo degomado, "lecitina" e outros produtos orgânicos que contém fósforo. O referido método se encontra descrito no Capítulo 3 - Materiais e Métodos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Materiais

Das oito amostras de óleo de soja bruto, inicialmente recebidas de várias indústrias, quatro apresentaram baixos conteúdos de fosfatídeos devido a autodegradação sofrida durante o armazenamento.

Foram utilizadas para este trabalho, portanto, quatro amostras de óleo bruto de soja: A, B, C e D, todas gentilmente cedidas pelas indústrias, logo após a extração.

Amostra A - procedente do Paraná,

Amostras B e D - procedentes do Rio Grande do Sul, e

Amostra C - procedente de São Paulo.

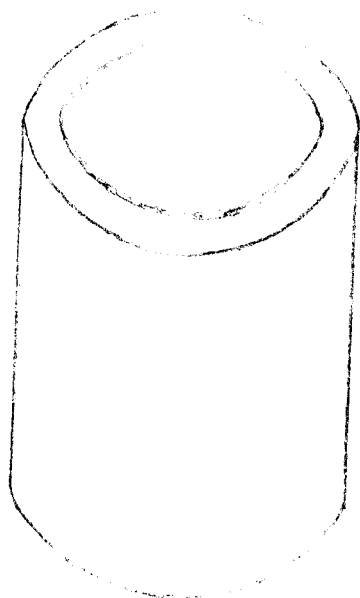
A "lecitina" utilizada foi uma "lecitina" comercial, adquirida no comércio local.

O ácido glicerofosfórico utilizado foi preparado no Laboratório de Óleos e Gorduras desta Faculdade.

Para os tratamentos e determinações foram utilizados materiais, reagentes e equipamentos comuns de laboratório.

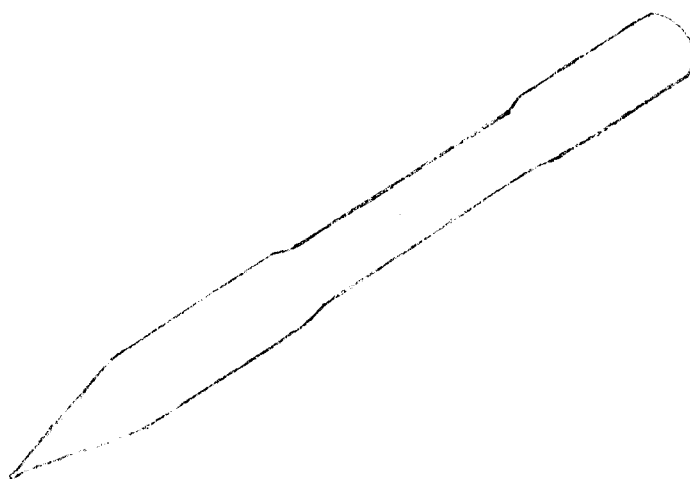
Para a digestão alcalina do óleo, da "lecitina" e do ácido glicerofosfórico foi feito um cadinho de teflon na oficina desta Faculdade. O referido cadinho e a bagueta, do mesmo material, são mostrados na Figura 1, na página seguinte.

Figura 1. Cadinho e Bagueta de Teflon para Digestão Alcalina



CADINHO

Diâmetro interno = 3,5 cm
Diâmetro externo = 4,5 cm
Altura interna = 4,4 cm
Altura externa = 5,0 cm



DIMENSÕES

BAGUETA

Comprimento = 10,5 cm
Diâmetro = 0,9 cm

3.2) Métodos

Índice de Acidez, de acordo com Official Method Aa 6-38 da A.O.C.S. (009).

Incineração, de acordo com Official Method Ca 12-55 da A.O.C.S. (009).

Índice de Iodo, de acordo com Official Method Cd 1-25 da A.O.C.S. (009).

Índice de Saponificação de acordo com Off. Method Cd 3-25 da A.O.C.S. (009).

Síntese do Ácido Glicerofosfórico, de acordo com o método de Power & Tutin (112).

Umidade, de acordo com o método Karl Fischer (041).

Degomagem do Óleo Bruto

Foram pesados 40 gramas de óleo bruto num bequer, adicionados 1,2 ml (3% volume/peso) de água ou solução de reagente apropriado e agitados num agitador magnético, a 55-60° C, mantendo-se nessa temperatura durante 30 minutos, sob agitação média constante. As amostras foram centrifugadas, durante 10 minutos, numa centrífuga Fanem Ltda a 1300 g. Após a centrifugação, cada amostra foi lavada com 10% de água destilada (volume/peso) a 60° centígrados e centrifugada novamente durante 10 minutos.

Neutralização

O óleo degomado, após determinação da acidez, foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio a 10%. A quantidade de solução cáustica utilizada foi em quantidade suficiente para dar um excesso de 50% em relação à quantidade estequiométrica.

A mistura óleo degomado e soda cáustica foi colocada num agitador magnético com aquecedor, a 60° C e agitada durante dez minutos, com temperatura e agitação média constantes. Após a neu-

tralização, o óleo foi lavado, da mesma forma que na degomagem.

Determinação de Fósforo

O fósforo foi determinado por um método desenvolvido neste trabalho, baseado na digestão alcalina da amostra, em condições anidras. O referido método é descrito a seguir:

a) Reagentes

Solução de hidróxido de sódio a 50% (peso/peso);

Etanol 95% G.L.;

Ácido clorídrico concentrado;

Hexana pura;

Solução de molibdato de amônio a 5% e

Solução de metol=0,5 gramas de metol (p-metil-amino-fenol sulfato), 2,4 gramas de sulfito e 12,5 gramas de bissulfito de sódio, completada com água destilada a 100 ml e guardada em frasco escuro, na geladeira.

b) Procedimento

Obtenção da Curva Padrão

Coloca-se um certo número de amostras de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), com diluições conhecidas, em balões volumétricos de 25 ml. Adiciona-se 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado, 1,0 ml de solução de molibdato de amônio e 2,0 ml de solução de metol, completando-se o volume. O branco é preparado pela adição de todos os reagentes acima mencionados, com exceção

do molibdato de amônio. Deixa-se em repouso durante 30 minutos, à temperatura ambiente e se lê a absorbância no espectrofotômetro a 690 nm. Prepara-se o gráfico plotando-se mg P/25 ml vs. absorbância. A curva obedece a Lei de Beer.

Determinação do Conteúdo de Fósforo na Amostra

Num cadinho de teflon, previamente lavado com solução de hidróxido de sódio fervente, seguido de lavagem com água destilada, pesa-se 2,5 gramas de óleo ou quantidade adequada de lipídeos. Adiciona-se 2,0 ml de solução de hidróxido de sódio a 50% e 5,0 ml de etanol. Completa-se a saponificação em chapa elétrica e se evapora o etanol.

Coloca-se o cadinho na estufa a 180°C, durante 30 minutos. Resfria-se à temperatura ambiente e se transfere seu conteúdo para um bequer de 250 ml, lavando-se o cadinho com 20 ml de água destilada, transferindo-a também ao bequer. Adiciona-se 5,0 mililitros de ácido clorídrico concentrado e se aquece até a liberação dos ácidos graxos. Resfria-se e se adiciona 10 ml de hexana pura.

Transfere-se a um funil de separação, separa-se a fase aquosa a um balão volumétrico de 25 ml e se completa o volume com a lavagem da fase hexana. Filtra-se em papel filtro e se toma uma alíquota de 10 ml num balão volumétrico de 25 ml.

Adiciona-se 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado, 1,0 ml de solução de molibdato de amônio, 2,0 ml de solução de metol, nesta ordem e se completa o volume com água destilada. O branco é obtido pelo mesmo procedimento, mas sem adição de molibdato.

Deixa-se em repouso durante 30 minutos e se lê a absorbância a 690 nm.

c) Cálculo do Teor de Fósforo

Obtém-se da curva padrão a quantidade de fósforo em mg de P/25 ml. Com esse valor, calcula-se a percentagem de fósforo na amostra, da seguinte forma:

$$\% \text{ de fósforo} = \frac{\text{mg P/25 ml} \times \text{fator de diluição}}{\text{peso da amostra em miligramas}} \times 100$$

ou, simplificando:

$$\% \text{ de fósforo} = \frac{\text{mg P/25 ml} \times \text{fator de diluição}}{10 \times \text{peso da amostra em gramas}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Características das Amostras de Óleo de Soja Bruto

Os resultados das determinações das características dos 4 óleos brutos de soja utilizados neste trabalho aparecem na Tabela I.

Tabela I. Característica das Amostras (3 repetições)

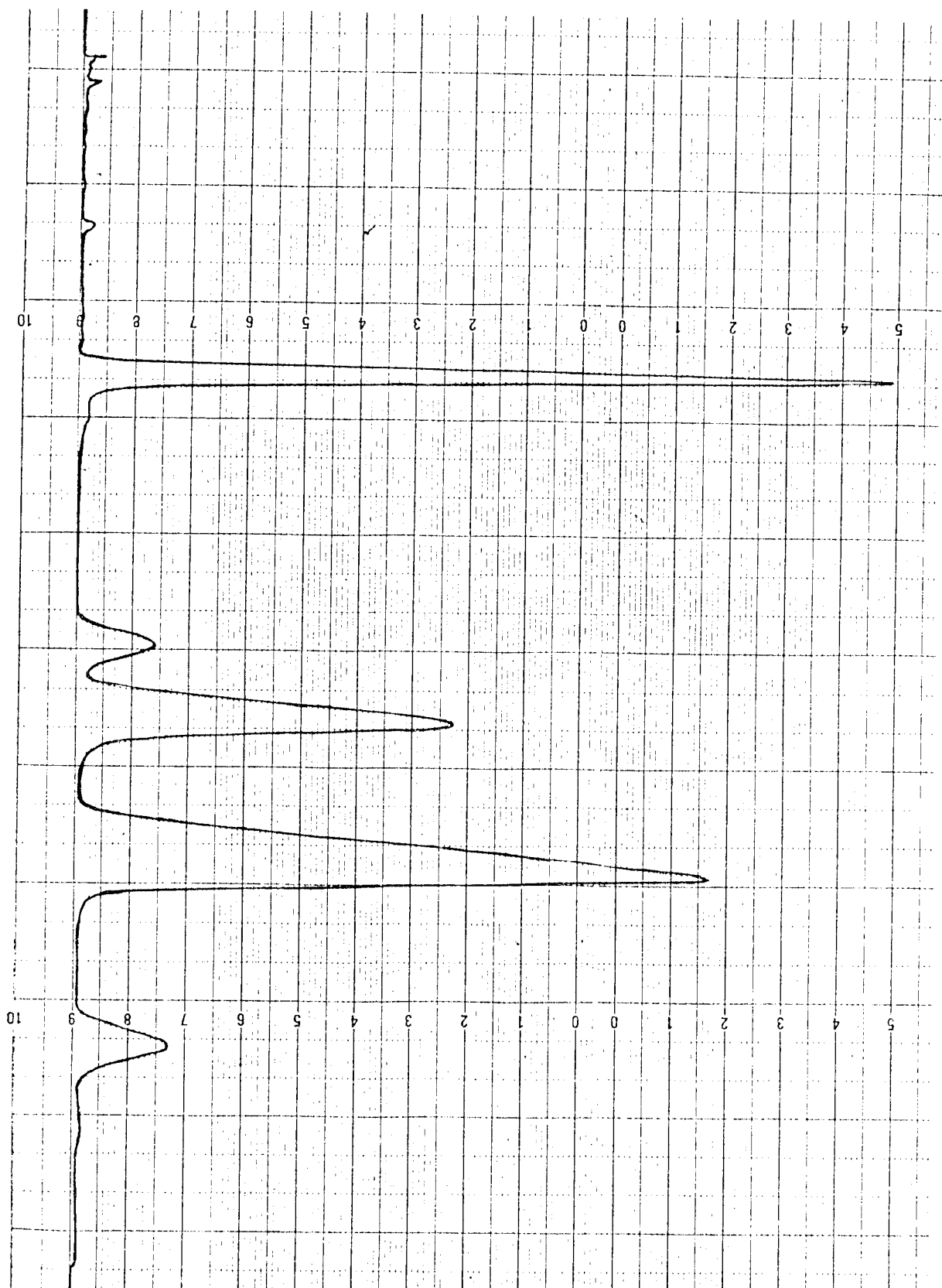
AMOSTRA	UMIDADE %	ACIDEZ* % AGL	ÍNDICE DE SA PONIFICAÇÃO	ÍNDICE DE IODO	FÓSFORO %
A	0,05	1,16	187,15	128,41	0,07705
B	0,07	0,61	187,70	129,69	0,05574
C	0,09	2,30	185,64	126,62	0,06083
D	0,07	1,93	186,56	128,95	0,04917

* = calculada como ácido oleico

Pode-se notar que a percentagem de ácidos graxos livres variou na faixa de 0,61 a 2,3%, o que está de acordo com os valores encontrados normalmente no óleo de soja bruto produzido no Brasil. Para os resultados encontrados nas outras características avaliadas, se pode fazer a mesma afirmativa.

A composição de ácidos graxos das amostras de óleo de soja bruto aparece na Tabela II e na Figura 2 (Cromatograma).

Figura 2. Cromatograma dos Ácidos Graxos da Amostra A.



Os cromatogramas dos ácidos graxos das amostras A-D foram obtidos num Cromatógrafo Perkin-Elmer, Modelo 990, com Coluna de Polietileno succinato, nas seguintes condições:

Comprimento da coluna	3 m
Diâmetro da coluna	3 mm
Fluxo de N ₂	32 mL/min.
Quantidade de amostra	1 µL
Temperatura da coluna	190º C
Temperatura do detector	250º C
Temperatura do injetor	250º C

Com os cromatogramas das amostra A (Figura 2), B, C e D, determinou-se as respectivas composições de ácidos graxos que aparecem na Tabela II.

Tabela II. Composição de Ácidos Graxos das Amostras

ÁCIDO GRAXO	AMOSTRA			
	A	B	C	D
Mirístico (%)	0,08	0,08	0,10	0,07
Palmítico (%)	11,36	12,26	10,41	12,19
Estearico (%)	4,41	4,53	3,75	5,06
Oleico (%)	23,34	24,55	22,12	24,39
Linoléico (%)	53,49	52,07	55,05	52,21
Linolênico (%)	7,32	6,51	8,57	6,08
TOTAL (%)	100,00	100,00	100,00	100,00

4.2) Degomagem

Como foi exposto na Revisão Bibliográfica, segundo alguns autores, o tratamento com água remove apenas uma parte dos fosfatídeos, os hidratáveis, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (pág.10-13). Por conseguinte, usando-se degomagem com água como referência, testou-se uma variedade de reagentes, alguns dos quais já reportados em literatura, para determinar sua eficiência na remoção de fosfatídeos.

A seleção de reagentes foi feita evitando-se o emprego de compostos que poderiam diminuir o valor do óleo obtido e das "gomas" resultantes desse tratamento.

Um dos objetivos do presente trabalho (pág. 03) foi desenvolver um processo que permitisse a eliminação ou a remoção dos fosfatídeos a níveis abaixo de 0,001% de fósforo e, assim, dispensar o tratamento do óleo com álcalis, ou seja, empregar a desacidificação por meios físicos.

Os resultados de degomagem aparecem nas Tabelas III a VI.

As tabelas foram elaboradas de acordo com a natureza dos reagentes utilizados, classificados em compostos orgânicos neutros (Tabela III), sais de amônio (Tabela IV), ácidos e anidrido acético (Tabela V) e compostos básicos (Tabela VI). Essas tabelas apresentam a amostra tratada, as soluções e concentrações empregadas e a percentagem de fósforo no óleo, antes e depois dos tratamentos.

Tabela III. Uso de Compostos Orgânicos Neutros (5 repetições no mínimo)

AMOSTRA	TRATAMENTO COM 3% DE	% DE FÓSFORO		FÓSFORO REMOVIDO %
		ANTES DO TRATAMENTO	APÓS O TRATAMENTO	
C	ÁGUA (TESTEMUNHA)	0,06083	0,00608	90,00
C	ACETONA A 10%	0,06083	0,00492	91,91
C	ACETONA A 50%	0,06083	0,00467	92,32
C	ETANOL A 10%	0,06083	0,00342	94,38
C	SACAROSE A 20%	0,06083	0,00508	91,65

Tabela IV. Uso de Sais de Amônio (5 repetições no mínimo)

AMOSTRA	TRATAMENTO COM 3% DE	% DE FÓSFORO		FÓSFORO REMOVIDO %
		ANTES DO TRATAMENTO	APÓS O TRATAMENTO	
D	ÁGUA (TESTEMUNHA)	0,04917	0,00587	88,06
D	ACETATO A 10%	0,04917	0,00425	91,36
D	CARBONATO A 10%	0,04917	0,00392	92,03
D	CLORETO A 10%	0,04917	0,00367	92,54
D	FOSFATO A 10%	0,04917	0,00358	92,72

Tabela V . Uso de Ácidos e Anidrido Acético (5 repetições no mínimo)

AMOSTRA	TRATAMENTO COM	% DE FÓSFORO ANTES DO APÓS O TRATAMENTO TRATAMENTO		FÓSFORO REMOVIDO %
A	3,0% DE ÁGUA (TESTEM.)	0,07705	0,00843	89,06
A	0,3% DE ANID. ACÉTICO*	0,07705	0,00322	95,82
B	3,0% DE ÁGUA (TESTEM.)	0,05574	0,00594	89,34
B	0,3% DE ANID. ACÉTICO*	0,05574	0,00247	95,57
C	3,0% DE ÁGUA (TESTEM.)	0,06083	0,00608	90,00
C	0,3% DE ANID. ACÉTICO*	0,06083	0,00283	95,35
C	3,0% DE ÁC. ACÉT. A 10%	0,06083	0,00308	94,94
C	3,0% DE ÁC. CLORÍD. 0,1N	0,06083	0,00317	94,79
* = Tratamento com anidrido acético seguido por tratamento com 2,7% de água.				

Nota-se que a eficiência da degomagem, expressa em percentagem de fósforo removido, variou, de acordo com o óleo e os reagentes, entre os limites de 88-90% para a água até 99,41% para o hidróxido de sódio e 99,51% para o hidróxido de amônio, empregados em grande excesso.

Em geral, as soluções de compostos orgânicos neutros (Tabela III) e de sais de amônio (Tabela IV) mostraram eficiência me

nor na remoção de fosfatídeos do que os reagentes ácidos (Tabela V), enquanto as soluções básicas (Tabela VI) resultaram em quase completa remoção de fósforo. Estes resultados, até certo ponto, confirmam as observações de Hvolby (067) e Nielsen (101), segundo os quais, a degomagem com água e ácidos orgânicos remove somente os fosfatídeos hidratáveis.

Dentre as soluções de compostos orgânicos neutros (Tabela III), os melhores resultados foram obtidos com etanol a 10%, que removeu 92,32% do fósforo original do óleo bruto, mostrando eficiência superior à acetona a 50%.

Os sais de amônio (Tabela IV) permitiram a remoção de cerca de 91-93% dos fosfatídeos, superando a ação da água, que para o mesmo óleo, permitiu a remoção de 88%.

Em vista dos problemas de autodegomagem do óleo bruto já referidos (pág. 22) e das dificuldades de conseguir amostras logo após a extração, os reagentes que apresentaram menor eficiência na remoção de fósforo, compostos orgânicos neutros e sais de amônio, foram testados em apenas uma amostra cada um (C e D, respectivamente).

O efeito do anidrido acético (Tabela V) merece uma menção especial. De acordo com Hayes & Wolff (061) e outras referências de literatura (040,099), o emprego de anidrido acético e anidridos afins, como propiônico ou butírico, resultaria em degomagem quase total, o que não pode ser confirmado neste trabalho. Além disso, conforme já mencionado na Revisão Bibliográfica (pág.15), o uso de anidrido acético exige equipamentos especiais, devido a efeitos corrosivos.

Tabela VI. Uso de Compostos Básicos (5 repetições no mínimo)

AMOSTRA	TRATAMENTO COM 3% DE ÁGUA OU SOLUÇÃO DE HI-DRÓXIDO DE	QUANTI-DADE NA SOLUÇÃO	% DE FÓSFORO ANTES DO TRATAMENTO	APÓS O TRATAMENTO	FÓSFORO REMOVIDO %
A	ÁGUA (TESTEM.)	-	0,07705	0,00843	89,06
A	HIDR. DE AMÔNIO Q. EST.		0,07705	0,00367	95,24
A	HIDR. DE AMÔNIO 1,5 x QE		0,07705	0,00260	96,65
A	HIDR. DE SÓDIO 1,5 x QE		0,07705	0,00158	97,95
B	ÁGUA (TESTEM.)	-	0,05574	0,00594	89,34
B	HIDR. DE AMÔNIO Q. EST.		0,05574	0,00307	95,51
B	HIDR. DE AMÔNIO 1,5 x QE		0,05574	0,00219	96,07
B	HIDR. DE SÓDIO 1,5 x QE		0,05574	0,00115	97,94
C	ÁGUA (TESTEM.)	-	0,06083	0,00608	90,00
C	HIDR. DE AMÔNIO Q. EST.		0,06083	0,00302	95,04
C	HIDR. DE AMÔNIO 1,5 x QE		0,06083	0,00230	96,22
C	HIDR. DE SÓDIO 1,5 x QE		0,06083	0,00127	97,91
C	HIDR. DE CÁLCIO Q. EST.		0,06083	0,00488	92,08
D	ÁGUA (TESTEM.)	-	0,04917	0,00587	88,06
D	HIDR. DE AMÔNIO Q. EST.		0,04917	0,00243	95,06
D	HIDR. DE AMÔNIO 2,0 x QE		0,04917	0,00128	97,40
D	HIDR. DE AMÔNIO 3,0 x QE		0,04917	0,00062	98,74
D	HIDR. DE AMÔNIO 4,0 x QE		0,04917	0,00041	99,17
D	HIDR. DE AMÔNIO 5,0 x QE		0,04917	0,00024	99,51
D	HIDR. DE SÓDIO Q. EST.		0,04917	0,00224	95,44
D	HIDR. DE SÓDIO 1,5 x QE		0,04917	0,00122	97,52
D	HIDR. DE SÓDIO 2,0 x QE		0,04917	0,00029	99,41

OBS.: QE e Q. EST. = QUANTIDADE ESTEQUIOMÉTRICA

As maiores remoções de fosfatídeos foram obtidas com o emprego de compostos básicos (Tabela VI) em excesso. Isso, no entanto, seria equivalente a degomagem e desacidificação simultâneas, o que, no caso do hidróxido de sódio significaria profundas alterações nas "gomas" obtidas e, no caso do hidróxido de amônio representaria um elevado custo de reagentes e necessidade de utilização de centrífugas herméticas na indústria.

Por outro lado, o emprego de amônia em excesso, já reportado na literatura (099), embora permita a degomagem e a desacidificação de forma satisfatória, é menos eficiente em reduzir a coloração do óleo bruto do que quando se usa álcalis, o que resultaria em maiores despesas na subsequente clarificação.

Em vista disso, realizou-se uma série de experiências para testar o desempenho da combinação de ambos os hidróxidos. Esta tentativa foi baseada no fato de que o hidróxido de amônio, usado em quantidade estequiométrica, mostrou, para todas as amostras analisadas (A,B,C e D), eficiência bem maior do que a degomagem com água (Tabela VI) e esta quantidade não exigiria o uso de centrífugas herméticas pela indústria.

Era de se esperar que esta forma de degomagem, seguida pelo tratamento com pequenas quantidades de hidróxido de sódio, produzisse um óleo refinado de boa qualidade e reduzisse as perdas de neutralização. As "gomas" assim obtidas poderiam ser processadas para obtenção de "lecitina" comercial similar ao produto de degomagem com água, considerando-se que a amônia poderia ser removida durante a desidratação das "gomas" a vácuo.

4.3) Degomagem e Neutralização

As degomagens com amônia em quantidade estequiométrica foram feitas conforme descrição em Materiais e Métodos (pág. 24), acrescentando-se a avaliação quantitativa das perdas.

Para avaliar as perdas de degomagem e de neutralização, trouxe-se duas amostras de óleo bruto de soja, de 40 gramas cada uma, lado a lado, com quantidade estequiométrica, diluído o hidróxido de forma a se usar 3% de solução (1,2 ml/40 gramas de óleo) e pesagem do óleo degomado.

Em uma das amostras degomadas foram feitas determinações de acidez e de fósforo, enquanto a outra foi tratada com solução de hidróxido de sódio a 10%, em quantidade suficiente para dar um excesso de 50% em relação à quantidade estequiométrica, conforme descrito em Neutralização, no capítulo 3, Materiais e Métodos (pág. 24).

Após a neutralização, o óleo foi cuidadosamente decantado e pesado, avaliando-se, desta forma, as perdas de neutralização.

A seguir, o óleo neutralizado foi lavado com 10% de água destilada (volume/peso) a 80°C e centrifugado, após o que, seus conteúdos de fósforo e de ácidos graxos livres foram determinados.

Os resultados desses tratamentos aparecem nas Tabelas VII a IX, que mostram as variações dos conteúdos de fósforo e de acidez durante os tratamentos de degomagem e neutralização e, também, as perdas verificadas com esses processos.

Tabela VII. Variação do Conteúdo de Fósforo Durante os Tratamentos de Degomagem e Neutralização (5 repetições)

AMOSTRA	BRUTO	% DE FÓSFORO DEGOMADO COM ÁGUA	NOS ÓLEOS NEUTRA- LIZADO	DEGOMADO COM AMÔNIA	NEUTRA- LIZADO
A	0,07705	0,00843	0,00036	0,00367	0,00033
B	0,05574	0,00594	0,00029	0,00307	0,00023
C	0,06083	0,00608	0,00024	0,00302	0,00024

Tabela VIII. Variação da Acidez Durante os Tratamentos de Degomagem e Neutralização (5 repetições)

AMOSTRA	BRUTO	% DE ÁCIDOS DEGOMADO COM ÁGUA	GRAXOS LIVRES NEUTRA- LIZADO	NOS ÓLEOS DEGOMADO COM AMÔNIA	NEUTRA- LIZADO
A	1,16	1,16	0,06	0,33	0,06
B	0,61	0,61	0,05	0,28	0,05
C	2,30	2,30	0,06	0,31	0,06
OBS.: % DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CALCULADOS COMO ÁCIDO OLEICO.					

Tabela IX. Perdas de Degomagem e Neutralização (8 repetições)

AMOSTRA	DEGOMAGEM COM ÁGUA	NEUTRA- LIZAÇÃO	% DE PERDAS			TOTAL
			TOTAL	DEGOMAGEM COM AMÔNIA	NEUTRA- LIZAÇÃO	
A	4,93	2,13	7,06	3,60	0,99	4,59
B	4,99	1,32	6,31	3,31	0,66	3,97
C	4,74	3,69	8,43	4,80	0,99	5,79

Os resultados demonstram que o uso de solução de hidróxido de amônio, em quantidade estequiométrica, para degomagem, seguido por tratamento com hidróxido de sódio, ofereceu as seguintes vantagens:

a) A degomagem por este método removeu mais fosfatídeos do que a degomagem com água, em todas as amostras (Tabela VII).

b) As perdas de degomagem foram menores do que as observadas na degomagem com água para as amostras A e B, enquanto que a amostra C, com maior acidez, deu perda só levemente superior, em comparação com a degomagem com água, apesar da simultânea desacidificação do óleo (Tabelas VIII e IX).

Essa ocorrência, um tanto inesperada, é, possivelmente, devido ao fato observado por Desnuelle et alii (1932), segundo os quais, o óleo arrastado pelas "gomas" é parte da estrutura dos materiais hidratados. Ao que parece, os sabões de amônia, neste

caso, substituem, em parte, o óleo estrutural.

A diminuição das perdas, comparadas com a degomagem com água, pode ser explicada pela diminuição da viscosidade, o que diminui o material arrastado. A diminuição da viscosidade das "gomas" obtidas pela degomagem com amônia é bem conhecida (090) e, assim, facilita o transporte das "gomas" depois da centrifugação o que representa uma vantagem adicional.

c) As pequenas perdas da subsequente neutralização com hidróxido de sódio são óbvias, uma vez que se trata de óleo com acidez muito baixa.

O método em pauta resultou em perdas 2,34-2,64% menores do que no método convencional, para óleos com acidez dentro da faixa atualmente encontrada no Brasil.

d) O conteúdo de fósforo em óleos neutralizados (Tabela VII) variou entre 0,00023-0,00033%, bem dentro dos limites geralmente exigidos.

A desidratação das "gomas" a temperatura elevada e a vácuo produz "lecitina" comercial similar a obtida pela degomagem com água, segundo a revisão de literatura (090,127,135).

Para alguns fins, no entanto, esta "lecitina", que contém ácidos graxos livres (resultantes da decomposição dos sabões de amônia), pode ser inconveniente. Neste caso, seria recomendável, talvez, a mistura da "lecitina" assim obtida com a proveniente da degomagem com água, a fim de não exceder o índice de acidez 30, limite exigido por algumas especificações do exterior (075) e do País.

4.4) Determinação de Fósforo e Fosfatídeos

Tendo em vista que este trabalho exigiu muitas estimações de fósforo e que os métodos de digestão ácida e/ou incineração exigem muitas horas de trabalho, foi desenvolvido um método de digestão alcalina para estimação de fósforo, conforme descrito em Materiais e Métodos (pág. 25).

O aquecimento da amostra com excesso de hidróxido de sódio a 180° C, exigiu que fosse feito um cadinho de teflon, pela impossibilidade do uso de outros recipientes, como é demonstrado a baixo, na Tabela X.

Tabela X. Efeito do Recipiente na Determinação de Fósforo*

RECIPIENTE	ABSORVÂNCIA A 690 nm	
	EXPERIÊNCIA 1	EXPERIÊNCIA 2
Copo de Becker	0,630	0,407
Cadinho de Aço Inoxidável	0,190	0,210
Cadinho de Teflon	0,000	0,000
* Nestas condições foi aplicado o método de digestão alcalina num sistema isento de fósforo.		

A determinação colorimétrica de fósforo, baseada na redução do fosfomolibdato a azul de molibdênio, usualmente é efetuada usando-se compostos como amidol (p-metilaminofenol), sulfato

de hidrazina, metol (2,4-diaminofenol), ácido 1,2,4-aminonaftol-sulfônico ou cloreto estanoso com ou sem sulfito e/ou bissulfito de sódio.

Todos estes reagentes foram testados e deram resultados satisfatórios, com exceção do cloreto estanoso, que exigiu um controle muito rigoroso de acidez do meio. As absorvâncias obtidas com os demais reagentes aparecem na Tabela XI.

Tabela XI. Comparação Entre os Reagentes Usados para o Desenvolvimento da Cor Azul de Molibdênio

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO (mg/25 ml)	ABSORVÂNCIA EM 30 min.		
		625 nm	690 nm	720 nm
AMIDOL	0,10	0,528	0,631	0,671
ÁC. NAFTOLSULFÔNICO	0,10	0,466	0,539	0,581
METOL	0,10	0,400	0,488	0,507
SULFATO DE HIDRAZINA	0,10	0,987	1,163	1,235

O metol foi escolhido neste trabalho porque, a par do bom desempenho, apresenta vantagens de preço e conveniência de uso.

A literatura (060) recomenda o uso do ácido perclórico junto ao metol, porém, neste trabalho, foi escolhido o ácido clorídrico, de acordo com os resultados mostrados na Tabela XII, além

das vantagens de preço e disponibilidade.

Tabela XII. Influência da Concentração Final de Ácido na Determinação de Fósforo (2 repetições)

ÁCIDO	ml/25 ml	ABSORBÂNCIA λ			TEMPO min.
		620 nm	690 nm	720 nm	
CLORÍDRICO conc.	0,5	0,398	0,488	0,509	30
CLORÍDRICO conc.	1,0	0,400	0,488	0,507	30
CLORÍDRICO conc.	1,5	0,400	0,489	0,512	30
CLORÍDRICO conc.	2,0	0,329	0,405	0,423	30
PERCLÓRICO 72 %	1,0	0,406	0,495	0,518	30
PERCLÓRICO 72 %	2,0	0,419	0,512	0,527	30
CLORÍDRICO conc.	0,5	0,420	0,513	0,533	60
CLORÍDRICO conc.	1,0	0,421	0,513	0,537	60
CLORÍDRICO conc.	1,5	0,420	0,502	0,525	60
CLORÍDRICO conc.	2,0	0,300	0,369	0,388	60
PERCLÓRICO 72 %	1,0	0,416	0,507	0,528	60
PERCLÓRICO 72 %	2,0	0,397	0,486	0,509	60
CLORÍDRICO conc.	0,5	0,423	0,519	0,541	90
CLORÍDRICO conc.	1,0	0,421	0,516	0,542	90
CLORÍDRICO conc.	1,5	0,431	0,525	0,551	90
CLORÍDRICO conc.	2,0	0,363	0,447	0,471	90
PERCLÓRICO 72 %	1,0	0,425	0,521	0,545	90
PERCLÓRICO 72 %	2,0	0,410	0,501	0,526	90

O ácido clorídrico deu boa estabilidade de cor na fai-

xa de 0,5-1,5 ml de ácido concentrado na solução final (25 ml).

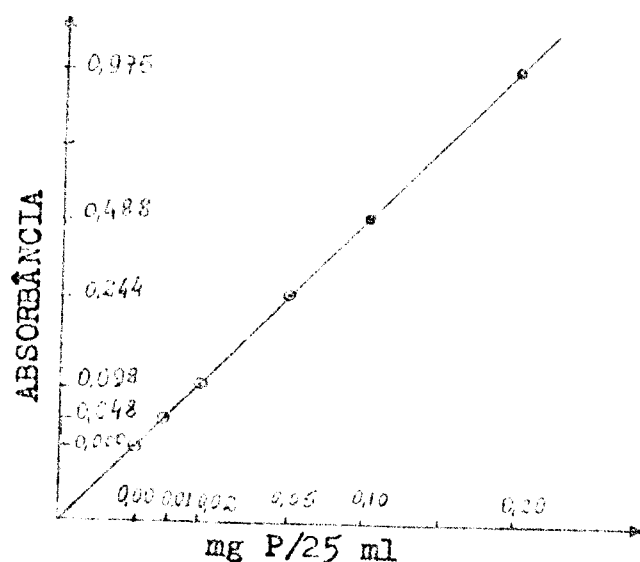
O tempo de 30 minutos foi escolhido para leitura, de acordo com os resultados constantes da Tabela XIII.

Tabela XIII. Relação Entre Coeficiente de Extinção e Tempo (2 repetições)

QUANTIDADE DE mg de P/25 ml	ABSORBÂNCIA LIDA A 690 nm			
	20 min.	30 min.	40 min.	60 min.
0,05	0,239	0,244	0,246	0,253
0,10	0,485	0,488	0,489	0,513
0,20	0,974	0,975	0,983	0,989

Sob as condições adotadas, a absorbância seguiu a lei de Beer, como demonstra o gráfico da figura 3.

Figura 3. Gráfico Absorbância a 690 nm vs. mg P/25 ml.



A precisão do método foi testada em comparação com o método de incineração (pág. 23), usando óleo bruto de soja, "lecitina" comercial e ácido glicerofosfórico (Tabela XIV).

Tabela XIV. Comparação Entre os Métodos de Incineração e Digestão Alcalina (3 repetições)

AMOSTRA	MÉTODO			
	INCINERAÇÃO		DIGESTÃO ALCALINA	
	% DE FÓSFORO	% DE FOSFATÍDEOS	% DE FÓSFORO	% DE FOSFATÍDEOS
ÓLEO BRUTO DE SOJA	0,07712	1,967*	0,07705	1,965*
"LECITINA" COMERCIAL DE SOJA	2,63100	67,091*	2,62900	67,040*
ÁCIDO GLICEROFOSFÓRICO	17,70800	98,251**	17,71600	98,295**
* % de fosfatídeos = % de fósforo X 25,5 (ver Fatores de Conversão de Fósforo em Fosfatídeos).				
** Conversão estequiométrica de fósforo em ácido glicerofosfórico. Os valores obtidos dão a pureza da amostra.				

4.5) Fatores de Conversão de Fósforo em Fosfatídeos

Vários fatores de conversão de % de fósforo em % de fosfatídeos são reportados na literatura.

Jamieson & Mc Kenney (070) sugeriram o fator 25,5. O método Ca 12-55 da A.O.C.S. (009) prescreve o fator 30 para converter % de fósforo em % de fosfatídeos, enquanto List et al. (083)

propõem o fator 31,7. Estes fatores, porém, se referem antes à conversão para insolúveis em acetona, os quais incluem além dos fosfatídeos, carboidratos e outros compostos.

No presente trabalho escolheu-se apresentar os resultados em percentagem de fósforo, em virtude de não haver um fator aplicável igualmente a fosfatídeos hidratáveis e não hidratáveis.

4.6) Considerações Sobre o Método de Digestão Alcalina

O tempo total de estimação de fósforo pelo método de digestão alcalina foi inferior a 3 horas, computando-se desde a pesagem da amostra até a leitura da absorbância. Este tempo é menor do que apenas a etapa de incineração ou a de digestão ácida da amostra, utilizadas nos métodos convencionais.

A diferença entre as médias de determinações de fósforo em óleo bruto de soja (Tabela XIV), efetuadas pelas métodos de incineração e de digestão alcalina, foi de 0,00007%, comparável com a precisão obtida por Hvolby (067), utilizando um único método, ou seja, a incineração pelo método oficial Ca 12-55 da A.O.C.S. (009).

O método não apresentou nenhum risco para o operador, como na digestão ácida com ácido perclórico (145), a qual, ao ser tentada no início deste trabalho, provocou violenta explosão.

O teflon usado como material do cadinho de incineração alcalina resiste bem à ação de álcalis a 250° C e não mostrou, durante o decorrer deste trabalho, nenhum desgaste.

5. C O N C L U S Õ E S

5.1) A degomagem do óleo bruto de soja, com 3% de solução de hidróxido de amônio, empregada em quantidade estequiométrica para neutralizar os ácidos graxos livres, a 55-60° C, possibilitou maior remoção de fosfatídeos do que o processo convencional de degomagem com água.

5.2) O emprego de solução amoniaca em quantidade estequiométrica dispensará o uso de centrífugas herméticas na indústria, necessárias quando se emprega amônia em excesso.

5.3) As "gomas" assim obtidas foram menos viscosas do que as resultantes do processo convencional.

5.4) A neutralização do óleo assim degomado, com hidróxido de sódio, reduziu o conteúdo de fósforo a valores menores do que 0,0004% e as perdas de degomagem e de neutralização foram aproximadamente 2,5% menores por este processo do que pelo convencional.

5.5) O método de estimação de fósforo em óleos por digestão alcalina em cadinho de teflon, desenvolvido neste trabalho, mostrou-se mais rápido do que os métodos padrões e de precisão comparável a eles.

5. B I B L I O G R A F I A

- 001) A.A.C.C. Method 40-55. Phosphorus. Colorimetric, Acetate Ashing Method. Page 1 of 1 (1962).
- 002) A.A.C.C. Method 40-56. Phosphorus. Colorimetric Modified Fiske-Subbarow Method. Page 1 of 2 (1962).
- 003) ABRAMSON, M. B.; KATZMAN, R. & CURCI, R.- Turbidimetric Studies of the Interaction of Aqueous Micelles of Phosphatidic Acids with Cations - J. Colloid Sci. 20:777(1965).
- 004) ABRAMSON, M. B.; KATZMAN, R.; WILSON, C. E. & GREGOR, H. P. Ionic Properties of Aqueous Dispersions of Phosphatidic Acids - J. Biol. Chem. 239:4066(1964).
- 005) ABRAMSON, M. B.; NORTON, W. T. & KATZMAN, R. - Ionic Structures in Phospholipids by Infrared Spectra - J. Biol. Chem. 240:2389(1965).
- 006) ADELT, M. & GRUENDLER, G. A. - The Photometric Determination of Phosphorus, Chromium, Nickel and Molybdenum - Arch. Eisen. 19:21(1948). Ch. Abst. 43:1286(1949).
- 007) ALLEN, R. J. L. - The Estimation of Phosphorus - Bioch. J. 34:858(1940).
- 008) ANTOSZEWSKI, R. & KNYPOL, J. S. - A Chemichromatographic Micromethod of Determining Phosphorus - Mikroch. Acta 321(1960).
- 009) A.O.C.S. Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society - Champaign, IL (Revised to 1973).
- 010) ARTMANN, P. & BRANDIS, R. - An Iodometric Determination of Phosphoric Acid - Z. Anal. Chem. 49:25(1910).
- 011) BAER, E. & KATES, M. - Migration During Hydrolysis of Esters and Glycerophosphoric Acid. II. Acid and Alkaline Hydrolysis of L- α -Lecithins - J. Biol. Chem. 185:615(1950).

- 012) BAUZIL, J. - Determination of Phosphoric Acid and of Magnesium by Titration of Magnesium Ammonium Phosphate - J. Pharm. Ch. 16:231(1918).
- 013) BEAL, R. E.; LANCASTER, E. B. & BREKKE, O. L. - The Phosphorus Content of Refined Soybean Oils as a Criterion of Quality - J. Am. Oil Chem. Soc. 33:619(1956).
- 014) BECKER, E. & KRULL, L. - Colorimetric Semimicro Method for Determination of Phosphorus in Edible Oils - Fette, Seifen, Anstrichmittel 60:449(1958).
- 015) BELOZERSKII, A. N. - Biokhimiya 1:225(1936). IN: NIELSEN (101).
- 016) BOHRISCH, P. - Phosphorized Oil - Pharm. Centrbl. 50:19,41, 63. Ch. Abst. 3:874(1909).
- 017) BOLDING, J. - Schwed. P.129863. IN: KAUFMANN (074).
- 018) BOLLMAN, H. - Phosphatides from Soy Beans or Other Oil-seeds - U.S. 1,667,767(1928).
- 019) BOLLMAN, H. - Purifying Vegetable Oils - Br. 243,643(1925).
- 020) BOONE, P. D. - Refining Vegetable Oils such as Cotton, Soybean, Linseed, Peanut or Castor Oils - U. S. 2,351,184(1944).
- 021) BRAAE, B. - Influence of Degree of Refining on Oxidation Stability and Taste of Soy and Rapeseed Oils - Chem. and Ind. 11:52(1958).
- 022) BRAAE, B. - Degumming and Refining Practices in Europe - J. Am. Oil Chem. Soc. 53:353(1976).
- 023) BRIAN, R. - Soybean Lecithin Processing Unit Operations - J. Am. Oil Chem. Soc. 53:27(1976).
- 024) BROSE, L. H. & JONES, E. B. - Colorimetric Estimation of Phosphorus - Nature 138,644(1936).
- 025) CARR, R. A. - Degumming and Refining Practices in the U.S. - J. Am. Oil Chem. Soc. 53:347(1976).

- 026) CHIBNALL, A. C. & CHANNON, H. J. - Ether-soluble Substances of Cabbage Leaf Cytoplasm. II- Calcium Salts of Glyceride-phosphoric Acids - Bioch. J. 21:233(1927).
- 027) CHRISTENSON, R. M. - Brev. U.S.A. 2.510.379(1950). IN: MARTI NENGHI (088).
- 028) CIUREA, V. V. - Determination of Small Quantities of Phosphorus by the Method of Denigès - Bull. Soc. Ch. Romania 2:86(1928). Ch. Abst. 22:3370(1928).
- 029) CLAYTON, B. - U.S. Pat. № 2,412,251(1946). IN: THURMAN & MATTIKOW (135).
- 030) COCKS, L. V. & REDE, C. van - "Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts" p. 137 - Academic Press, Inc. Ltd., New York (1966).
- 031) COWAN, J. C. - Degumming, Refining, Bleaching and Deodorization Theory - J. Am. Oil Chem. Soc. 53:344(1976).
- 032) DESNUELLE, P. - i. HOLMAN, R. T.; LUNDBERG, W. O. og MALKIN, T.: "Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids" vol. 1, New York (1952). IN: NIELSEN (101).
- 033) DESNUELLE, P.; MOLINES, J. & DERVICHIAN, D. - Hydration of Phospholipides in Presence of Glycerides - Bull. Soc. Ch. France 18:197(1951). IN: NIELSEN (101).
- 034) DUMAS, W. C. - The Use of Silver Phosphate as a Standard for Phosphoric Acid and a Critical Study of the Gravimetric Magnesia Method for Estimation of Phosphoric Acid - Chem. Eng. 12:185(1911).
- 035) EARLE, F. R. & MILNER, R. T. - The Occurrence of Phosphorus in Soybeans - Oil & Soap 15:41(1938).
- 036) EGSGAARD, J. - Colorimetric Determination of Phosphorus with Amidol - Acta Physiol. 16:179(1948).
- 037) FAIRCHILD, J. G. - Accurate Volumetric Determination of Phosphoric Acid in Phosphate Rock - J. Wash. Acad. Sci. 2:114. Ch. Abst. 6:1265(1912).

- 038) FALLADA, O. - Estimation of Phosphoric Acid according to the Method of N. Von Lorenz - Oesterr. ung. Z. Zuckerind. u. Landw. 37:333. Ch. Abst. 3:158(1909).
- 039) FASH, R. H. - A.P. 2229062. IN: KAUFMANN (074).
- 040) FIALA, R. J. - Refining Soybean Oil - U.S. 3,093,667(1961).
- 041) FISCHER, K. - Método de Determinação de Água. IN: "Manual de Uso do Metrohm A.G.", Suíça (1964).
- 042) FONTAINE, T. D. - Spectrophotometric Determination of Phosphorus - Ind. and Eng. Chem. 44:77(1942).
- 043) FRAMPTON, V. L.; MASELES, R. D. & MARTIN, G. N. - Lipids of Cottonseed.III.Perchloric Acid Ashing of Lipids for the Determination of Phosphorus - J. Am. Oil Chem. Soc. 25:219(1948).
- 044) FRANZKE, C.; HOLSTEIN, E.; BRANDT, P & ZIETZE, H. - Determination of Trace Amounts of Phosphate in Biological Material - Nahrung 17:679(1973).
- 045) FREUNDLER, P. - Determination of Phosphorus in Lecithin - Bull. Soc. Chim. 2:1041(1913).
- 046) FREY, O. - Simple Determination of Phosphorus in Phosphorized Oils - Pharm. Post, 43:969 . Ch. Abst. 5:3026(1911).
- 047) FUCHS, W. - DRP. 630790. IN: KAUFMANN (074).
- 048) GARCIA, F. C. & ALVAREZ, F. M. - The Spectrophotometric Determination of Phosphorus with Amidol - Anales Edafol. y Fisiol. Vegetal 13:767(1954). Ch. Abst. 49:6026(1955).
- 049) GERICKE, S. & KURMIES, B. - Colorimetric Determination of Phosphoric Acid with Vanadate-molybdate - Z. Anal. Chem. 137:15(1952).
- 050) GIANI, M. - Microdetermination of Phosphorus by Means of the Pulfrich Photometer - Giorn. Chim. Ind. Applicata - 15:432(1933). Ch. Abst. 28:1627(1934).

- 051) GIBSON, R. B. & ESTES, C. - The Indirect Colorimetric Determination of Phosphorus with Uranium Acetate and Potassium Ferrocyanide - J. Biol. Chem. 6:349(1909).
- 052) GODLOE, P. - Photometric Determination of added Phosphorus in Oils - Ind. Eng. Chem. 9:527(1937).
- 053) GRAFE, V. & OSE, K. - Bioch. Z. 187:102(1927). IN: NIELSEN (101).
- 054) GRAJEWSKA, Z. - Determination of Phosphorus in Vegetable Oils. Tlusz. Jadal. Pol. 10:179(1966). Ch. Abst. 67:12809(1967).
- 055) GUILLAUMIN, R. - Recent Investigations in Soybean Oil Refining - Rev. Franc. Corps Gras 11:655(1964).
- 056) GUILLAUMIN, R. - Refining Soybean Oils. Fr. 1,388,671(1963).
- 057) GUILLAUMIN, R. & DROUHIN, N. - New Method for Refining Soybean Oil. Method Utilizing Complete Degumming - Rev. Fr. Corps Gras 8:463(1963).
- 058) HANDEL, E. van - "The Chemistry of Phosphoaminolipids"- Amsterdam (1954). IN: HVOLBY (067).
- 059) HARDWICK, P. J. - Colorimetric Estimation of Phosphorus by Reduction of Phosphomolybdate to Molybdenum Blue - Analyst 68:183(1943).
- 060) HARRIS, W. D. & POPAT, P. - Determination of Phosphorus Content of Lipids - J. Am. Oil Chem. Soc. 31:124(1954).
- 061) HAYES, L. P. & WOLFF, H. - Novel Method of Refining Soybean Oil - J. Am. Oil Chem. Soc. 33:440(1956).
- 062) HELME, J. P. - "Sur la Fabrication Industrielle des Leci-thi-nes d'Arachide et de Soja" (1949). IN: NIELSEN (101).
- 063) HOLMAN, W. I. M. - A New Technique for the Determination of Phosphorus by the Mo-blue Method - Bioch. J. 37:256(1943).
- 064) HORVATH, A. A. - The Chemistry of Soybean-protein Extraction - Chem. and Ind. 56:735(1937).

- 065) HORVATH, A. A. - Phosphatides of the Soybean - Ind. Eng. Chem. 13:89(1935).
- 066) HUTT, H. H. & WEATHERALL, H. - Analysis of Commercial Lecithin - Analyst 69:39(1944).
- 067) HVOLBY, A. - Removal of Nonhydratable Phospholipids from Soybean Oil - J. Am. Oil Chem. Soc. 48:503(1971).
- 068) JAKOBSEN, J. L. - U.S.A. 2.448.434(1948). IN: MARTINENGHI (088).
- 069) JAMES, E. M. - The Refining and Bleaching of Vegetable Oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 35:76(1958).
- 070) JAMIESON, G. S. & MCKENNEY, R. S. - Phosphatides in American Soybean Extraction as Developed at the Edison Institute of Technology - Oil and Soap 12:70(1935).
- 071) JONES, W. - Admissibility of Ammonium Magnesium Phosphate as a Form in which to Weigh Phosphoric Acid - J. Biol. Chem. 25:87(1916).
- 072) KAMINSKII, N. A.; IKHMO, N. P.; DMITRIEVA, N. A.; VODYANITSKI, A. N. & BARTASHEVICH, E. I. - Removal of Phosphatides from Vegetable Oils - U.S.S.R. 293,842(1971). Ch. Abst. 75:78416(1971).
- 073) KATZMAN, R. - "Studies of Naturally Occurring Acidic Lipids: Ionic, Surface and Membrane Properties" - U.S. Department of the Interior. Research and Development Progress Report № 178 (1966). IN: HVOLBY (067).
- 074) KAUFMANN, H. P. - "Analyse der Fette und Fettprodukte" - p. 14 - Springer-Verlag - Berlin (1958).
- 075) KHYM, F. & MOUNTS, T. - "Processing Soybean Oil Into a High Quality Shortening, Margarine and Salad Oil. Recent Developments in Vegetable Oil Technology" - American Soybean Association (1978).
- 076) KING, E. J. - The Colorimetric Determination of Phosphorus - Bioch. J. 20:292(1932).

- 077) KRASSER, J. M. - The Determination of Phosphoric Acid by Neumann's Method - Z. Nahr. Genussm. 21:198. Ch. Abst. 5:1889(1911).
- 078) KUBO, S. & TATSUMI, C. - Gravimetric Determination of Phosphorus by the Use Cation-exchange Resin - Repet. Food Research Inst. (Japan). 3:87(1950). Ch. Abst. 47:6818(1953)
- 079) KUSTAPPA, G.; AZEMODDIN, G.; RAO, S. & THIRUMALA, S. - Studies on the Phosphatides of Indian Soybean Oil - Paintin dia 26:21(1976). Ch. Abst. 87:4242(1977).
- 080) LEIBOFF, S. L. - The Reduction of Phosphomolybdic Acid by Monomethyl-p-aminophenol and its Use in the Quantitative Determination of Phosphorus - J. Lab. Clin. Med. 16:495(1931).
- 081) LEIMDÜFFER, G. - Seifensieder Ztg. 60:84(1933). IN: KAUFMANN (074).
- 082) LIST, G. R.; EVANS, C. D.; BLACK, L. T. & MOUNTS, T. L.- Removal of Phosphorus and Iron by Commercial Degumming of Soybean Oil - J. Am. Oil Chem. Soc. 55:275(1978).
- 083) LIST, G. R.; HEAKIN, A. J.; EVANS, C. D.; BLACK, L. T. & MOUNTS, T. L. - Factor for Converting Elemental Phosphorus to Acetone Insolubles in Crude Soybean Oils - J. Am. Oil Chem. Soc. 55:521(1978).
- 084) LORENZ, N. von - The Determination of Phosphoric Acid - Ch. Ztg. 32:707. Ch. Abst. 2:2767(1908).
- 085) LOSANA, L. - Colorimetric Determination of Phosphorus - Giorn. Ch. Ind. Applicatta 4:60(1922).
- 086) LYONS, A. E. - Silver Nitrate in the Volumetric Determination of Phosphoric Acid - Am. Druggist 52:173. Ch. Abst. 2:1669(1908).
- 087) MARREUW, W. P. H. D. - Determination of Phosphorus in Oil - Pharm. Weekblad 63:1039(1926). Ch. Abst. 21:546(1927).

- 088) MARTINENGHI, G. B. - "Technologia Chimica Industriale degli Oli, Grassi e Derivati" - p. 267 - Ed. Ulrico Hoepli- Milano (1963).
- 089) MATTIKOW, M. - Brev. U.S.A. 2.525.702 (1950). IN: MARTINENGHI (088).
- 090) MATTIKOW, M. - Some Recent Developments in the Refining of Fatty Oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 37:211 (1960).
- 091) MAUDE, A. H. - Gravimetric Estimation of Phosphates - Chem. News 101:241. Ch. Abst. 4:2249 (1910).
- 092) MCKINNEY, R. S.; JAMIESON, G. S. & HOLTON, W. B. - Oil & Soap 14:126 (1937). IN: NIELSEN (101).
- 093) MCLEAN, H. - Composition of "Lecithin", Together with Observations on the Distribution of Phosphatides in the Tissues and Methods for their Extraction and Purification - Bioch. J. 9:351 (1915).
- 094) MERKEL, A. - The Determination of Phosphorus by the X-ray by Photometric Titration - Ber. Naturf. Ges. 34:249 (1934). Ch. Abst. 30:1326 (1936).
- 095) MIRONAVA, A. N. & DANILOVA, T. A. - Rapid Colorimetric Determination of Phosphorus in Oils and Phosphorus-containing Substances - Masloboino-Zhirovaya Prom. 26:18 (1960). Ch. Abst. 55:9910 (1961).
- 096) MOLINES, J. - "Contribution a l'Etude de Quelques Propriétés Chimiques, Physicochimiques et Techniques des Phospholipides" - Marseilles (1948).
- 097) MOLINES, J. & DESNUELLE, P. - Colorimetric Determination of Phosphorus in Oils and Lecithins - Bull. Mens. RECH 2:1 (1948).
- 098) MOLINES, J. & DESNUELLE, P. - Oleagineux 5:17 (1950). IN: NIELSEN (101).
- 099) MYERS, N. W. - Design and Operation of a Commercial Soybean-Oil Refining Plant, Using Acetic Anhydride as a Degumming Reagent - J. Am. Oil Chem. Soc. 34:93 (1957).

- 100) NEUBAUER, H. & LUCKER, F. - Lorenz Method for the Determination of Phosphoric Acid - Z. Anal. Chem. 51:161(1911).
- 101) NIELSEN, K. - "Studies on the Non-Hydratable Soybean Phosphatides" - Maxons Co. (Publishers) Ltd -London (1956).
- 102) NORRIS, F. A. - "Bailey's Industrial Oil and Fat Products", 3^a Ed. - cap. 16, p. 732 - Interscience Publishers - U. S.A. (1964).
- 103) OLLEY, S. - Instability of the Phosphatidic Acids - Ch. and Ind. 1069(1954).
- 104) OVCHARENKO, V. E. & NECHAEVA, A. V. - Photometric Determination of the Amount of Phosphatides in Vegetable Oils - U.S.S.R. 358,654(1972). Ch. Abst. 28:109519(1973).
- 105) PAPAHAJIOPOULOS, D. & WATKINS, S. C. - Bioch. Biophys. Acta 135:639(1967). IN: HVOLBY (067).
- 106) PELLET, H. - Determination of Phosphoric Acid as Ammonium Phosphomolybdate - Bull. Assoc. Chim. 24:525(1907).
- 107) POSTERNAK, S. - The Determination of Small Quantities of Phosphoric Acid as Barium Phosphomolybdate in the Presence and in the Absence of Organic Phosphorus - Bull. Soc. Ch. 27:507(1920).
- 108) POSTERNAK, S. - The Technic of the Determination of Phosphoric Acid as Barium Phosphomolybdate - Bull. Soc. Ch. 27:564(1920).
- 109) POUGET, I. & CHOUGHAK, D. - Colorimetric Determination of Phosphoric Acid - Ann. Ch. Anal.Appl. 14:125(1908).
- 110) POUGET, I. & CHOUGHAK, D. - Colorimetric Determination of Phosphoric Acid - Bull. Soc. Ch. 5:104(1906).
- 111) POUGET, I. & CHOUGHAK, D. - The Colorimetric Determination of Phosphoric Acid - Bull. Soc. Ch. 2:649(1910).
- 112) POWER, F. B. & TUTIN, F. - The Relation Between Natural and Synthetical Glycerylphosphoric Acids - J. Chem. Soc. 82:249(1905).

- 113) POZZI, E. - Remark Upon the Direct Titration of Phosphates by Alkalimetry - Bull. Assoc. Ch. 27:775(1910).
- 114) RANDALL, D. L. - Behavior of Molybdic Acid in the Zinc Reductor - Am. J. Sci. 24:213(1907).
- 115) REPITON, F. - The Titrimetric Determination of Phosphoric Acid by Means of Uranium - Mon. Sci. 21:753(1907). Ch. Abst. 2:2528(1908).
- 116) REWALD, B. - Biochem. Z. 211:199(1929). IN: NIELSEN (101).
- 117) REWALD, B. - Food 6:7(1936). IN: NIELSEN (101).
- 118) RIEDER, T. H. & GERSHON, S. D. - Brev. U.S.A. 2.544.925 (1951). IN: MARTINENGHI (088).
- 119) RIEGLER, E. - Colorimetric Estimation of Phosphoric Acid - Bull. Acad. Sci. 2:272(1914).
- 120) RINGERS, H. J. & SERGERS, J. C. - Removing Slime from Triglyceride Oils - Brit. 75/9,862(1975). Ch. Abst. 85: P 191087(1976).
- 121) SCHOLFIELD, C. R.; DUTTON, H. J. & DIMLER, R. J. - Carbohydrate Constituents of Soybean "Lecithin" - J. Am. Oil Chem Soc. 29:293(1952).
- 122) SCHOLFIELD, C. R.; DUTTON, H. J.; TANNER, F. W. & COWAN, J. C. - Components of "Soybean Lecithin" - J. Am. Oil Chem. Soc. 25:368(1948).
- 123) STICH, C. - Accurate Colorimetric Determination of Small Quantities of Phosphorus Dissolved in Oil - Z. Angew. Chem. 40:1014(1927). Ch. Abst. 21:3856(1927).
- 124) STRECKER, W. & SCHIFFER, P. - The Titration of Phosphates - Z. Anal. Chem. 50:495. Ch. Abst. 5:2790(1911).
- 125) STUTZER, A. - The Estimation of Phosphoric Acid as Ammonium Phosphomolybdate - Landw. Versuchsstat 94:251(1919). Ch. Abst. 14:1645(1920).

- 126) SUDO, T.; HAMAKAWA, T. & KUBOTA, M. - Colorimetric Determination of a Small Amount of Phosphorus by the Molybdenum Blue Method with the Use of Hydroquinone - Bunseki Kagaku 6:564(1957). Ch. Abst. 52:15328(1958).
- 127) SULLIVAN, F. E. - Some Further Data on Pressure System Centrifugal Refining - J. Am. Oil Chem. Soc. 32:121(1955).
- 128) SULLIVAN, F. E. - U.S. Patent 2,702,813(1955). IN: LIST, G. R.; MOUNTS, T. L.; WARNER, K. & HEAKIN, A. J. - Steam Refining Soybean Oil: I. Effect of Refining and Degumming Methods on Oil Quality - J. Am. Oil Chem. Soc. 55:277(1978).
- 129) TADOKORO, Y.; HAMAJIMA, M. & TAKANO, S. - Edible Oil Refining - (Nisshin Oil Mills Ltd.) Japan, Kokai (1975). Ch. Abst. 87:166374(1977).
- 130) TAKAHASHI, Y. - Colorimetric Determination of Phosphorus - Med. and Biol. 26:235(1953).
- 131) THALER, H. & JUST, K. - Fette u. Seifen. 51:55(1944). IN: NIELSEN (101).
- 132) THURMAN, B. H. - Refining Inc. Brev. 2.150.732(1940). IN: NORRIS (102).
- 133) THURMAN, B. H. - Refining Vegetable Oils - U.S. 2,242,188 (1941). Ch. Abst. 35:P 5336(1941).
- 134) THURMAN, B. H. - Refining Vegetable Oils Such as Cottonseed, Soybean, Corn or Sesame Oil - U.S. 2,219,968(1941). Ch. Abst. 35:1660(1941).
- 135) THURMAN, B. H. & MATTIKOW, M. - Vegetable Oil Refining Procedures - J. Am. Oil Chem. Soc. 30:493(1953).
- 136) TOYAMA, Y. & TOYAMA, T. - Research Rept. Nagoya Ind. Sci. Research Inst. 4:56(1951). IN: NIELSEN (101).
- 137) UHLENBROEK, J. H. & VERKADE, P. E. - Rec. Trav. Ch. 22:558(1953). IN: HVOLBY (067).

- 138) UNSCHULD, H. M. - Brev. U.S.A. 2.516.733(1960). IN: MARTI-
NENGHI (088).
- 139) VRIES, J. L. - Experiences with an X-ray Fluorescence Va-
cuum Spectrograph - Collog. Spectros Intern. 8th - Lucer-
ne - Switz (1959). Ch. Abst. 60:8621(1964).
- 140) WAEL, H. - Colorimetric Determination of Small Quantities
of Free Phosphorus Dissolved in Oils - Dansk Tids. Pharm.
4:197(1930).
- 141) WAGENAAR, M. - Titration of Phosphoric Acid - Utrecht. Ph.
Weekblad. 48:845. Ch. Abst. 5:3664(1911).
- 142) WALLIS, T. E. - Phosphoric Acid and Ammonium Phosphate -
Pharm. J. 85:137(1910).
- 143) WARREN, M. S. - Electrophotometric Microdetermination of
Phosphorus in Lipide Extracts - Ind. Eng. Chem. 14:88
(1942).
- 144) WERLY, E. F. - Refining Soybean Oil - U.S. 2,746,867(1956).
- 145) WHARTON, H. W. - Potential Hazards of Perchloric Acid in Hea-
ted Systems Where Esters Are Involved - J. Am. Oil Chem.
Soc. 51:35(1974).
- 146) WILKIE, J. M. - The Determination of Phosphoric Acid by Me-
ans of Standard Silver Nitrate - J. Soc. Chem. Ind. 28:
794(1910).
- 147) WILKIE, J. M. - The Volumetric Determination of Phosphoric
Acid, Mono-alkali and Di-alkali Phosphates - J. Soc. Ch.
Ind. 28:68(1909).
- 148) WINTERSTEIN, E. & HIESTAND, O. - Z. Physiol. Chem. 54:288
(1907/8). IN: NIELSEN (101).
- 149) WITTCOFF, H. - "The Phosphatides" - New York (1951). IN: NI-
ELSEN (101).
- 150) WOLFF, G. - Physical Process for the Purification of Fats
and Oils - Chimie et Industrie Special No, 518(1928).

- 151) WÜRNER, E. - Estimation of Phosphorus in Phosphorized Oil - Pharm. Z. 53:398. Ch. Abst. 2:2841(1908).
- 152) ZOTTI, G. D. & JACINI, G. - Column Chromatography of Soybeans Phosphatides - Olii Minerali, Grassi e Saponi, Colori e Vernici 34:553(1957). Ch. Abst. 52:10613(1958).