

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ESTUDO SOBRE FOSFATÍDIOS
EM ÓLEO DE SOJA

TESE DE MESTRADO
MARCIA BLOCH

PROF. ORIENTADOR

DR. LEOPOLD HARTMAN

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

- 1983 -

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ESTUDO SOBRE FOSFATÍDIOS EM ÓLEO DE SOJA

Tese de Mestrado de

Marcia Bloch

Engenheira Química

Orientador:

Professor 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 Ciência de Alimentos.

À memória de meu irmão.

Aos meus pais e tios pela compreensão e
apoio.

Aos meus amigos pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Leopold Hartman pela dedicação e interesse.

Aos membros do laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola (FEAA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e aos pesquisadores e funcionários do laboratório de Óleos e Gorduras do Centro de Tecnologia Agrícola Alimentar (CTAA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela boa vontade e colaboração durante a execução de uma parte do trabalho experimental.

À CAPES pela bolsa de estudo.

ÍNDICE

	páginas
1. ÍNDICE DE TABELAS	i
2. ÍNDICE DE FIGURAS	iii
3. RESUMO	iv
4. SUMMARY	v
5. INTRODUÇÃO	1
6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
6.1. Fosfatídios em óleo de soja	4
6.1.1. Nomenclatura	4
6.1.2. Composição	11
6.1.3. Propriedades e utilização	16
6.2. Processamento de óleo de soja	17
6.2.1. Degomagem	20
6.2.2. Neutralização ou desacidificação	23
6.2.3. Branqueamento e desodorização	25
6.2.4. Refinação física	27
6.3. Determinação de fósforo e de fosfatídios	28
6.4. Fatores de conversão de fósforo em fosfatídios...	31
6.5. Turbidimetria	36
7. MATERIAIS E MÉTODOS	45
7.1. Materiais	45
7.2. Métodos	45

7.2.1. Métodos de caracterização de óleos.....	45
7.2.2. Determinação de fósforo	46
7.2.3. Determinação em óleos brutos da matéria insolúvel em acetona	50
7.2.4 Determinação em óleos degomados da matéria insolúvel em acetona	52
7.2.5. Turbidimetria	53
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
8.1. Características das amostras de óleos de soja es- tudados	55
8.2. Determinação do teor de fósforo e do fator de conversão	59
8.3. Turbidimetria	64
9. CONCLUSÕES	73
10. BIBLIOGRAFIA	75

ÍNDICE DE TABELAS

	páginas
Tab. 1 - Fatores de conversão de fósforo elementar em fosfolipídios em óleo bruto de soja	34
Tab. 2 - Características dos óleos de soja degomados e brutos	55
Tab. 3 - Composição de ácidos graxos das amostras <u>B</u> (óleo degomado) e <u>E</u> (óleo bruto)	56
Tab. 4 - Teores de fósforo e de fosfatídios e fatores de conversão de fósforo elementar em fosfolipídios de óleos de soja degomados	61
Tab. 5 - Teores de fósforo e de fosfatídios e fatores de conversão de fósforo elementar em fosfolipídios de óleos de soja brutos	62
Tab. 6 - Absorbâncias de misturas de óleos de soja com acetona saturada com ácido bórico, lidas no espectrofotômetro Micronal	67

Tab. 7 - Absorbâncias de misturas de óleos de soja com acetona saturada com ácido bórico, lidas no espectrofotômetro Beckman 69

Tab. 8 - Absorbâncias de misturas de óleos de soja com acetona contendo 2% de água, lidas no espectrofotômetro Micronal. 71

ÍNDICE DE FIGURAS

	páginas
Fig. 1 - Glicerol e fórmulas genéricas de ácidos graxos, mono -, di-e tri-acilgliceróis	5
Fig. 2 - Ácido fosfatídico e ácido lisófosfatídico	7
Fig. 3 - Fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina e fosfatidil inositol	8
Fig. 4 - Difosfoinositídio	9
Fig. 5 - Principais reações envolvidas na degomagem e na neutralização com álcalis	24
Fig. 6 - Esquema dos sistemas ópticos para colorimetria e turbidimetria, e para nefelometria	37
Fig. 7 - Cubeta multifacetada	41
Fig. 8 - Cromatograma do óleo degomado <u>B</u>	57
Fig. 9 - Cromatograma do óleo bruto <u>E</u>	58

3. RESUMO

Foram determinados os teores de fósforo de sete amostras de óleo de soja (quatro brutos e três degomados) pelo método de saponificação. Precipitou-se os fosfatídios com acetona e determinou-se o teor de fósforo no precipitado, calculando-se o fator de conversão de fósforo elementar em fosfatídios. Os fatores assim obtidos foram diferentes do fator de 30 recomendado pelo método oficial Ca 12-55 da "American Oil Chemists' Society" (AOCS), sendo um pouco maiores ou menores que este valor para óleos brutos e abaixo de 25,5 no caso de óleos degomados.

Foi ensaiado um método analítico para relacionar a turbidez produzida pela adição de acetona ao óleo à concentração de fosfatídios do mesmo, para controle da eficiência do processo industrial de degomagem. Foram testados vários compostos que poderiam intensificar a turvação.

Os melhores resultados foram obtidos adicionando-se ao óleo, acetona com 2% de água nas proporções de 1:10 e 1:20, lendo-se a absorbância à 540 nm contra soluções de mesma concentração de óleo em hexana.

4. SUMMARY

v

Phosphorus content was determined by the saponification method of seven samples of soya bean oil (four crude and three degummed oils). Phosphatides of the above oils were precipitated with acetone and the phosphorus content of the precipitates was determined in order to obtain the factors of conversion of elemental phosphorus into phosphatides. The factors thus obtained differed from that of 30 recommended by the Official Method Ca 12-55 of the American Oil Chemists' Society. They were a few units greater or smaller than the factor of 30 for crude oils, and below the value of 25,5 for degummed oils.

A tentative method of correlating the turbidity produced by the addition of acetone to crude and degummed soya bean oils, with their phosphorus content, was developed. Several reagents that would intensify the turbidity were tested.

Best results were obtained by the addition of acetone containing 2% of water to the oils, in the ratios of 10:1 and 20:1. The absorbance was read at 540 nm against solutions of the same concentration of the oils in hexane.

5. INTRODUÇÃO

A indústria de óleo de soja tem se desenvolvido paralelamente à crescente produção de soja no Brasil nos últimos anos.

Inicialmente o óleo de soja bruto deve sofrer um processo de degomagem para remover a maior parte dos fosfatídios ou fosfolipídios; compostos que se depositam nos tanques de armazenamento.

Se a remoção dos fosfatídios não for devidamente executada, poderão ocorrer perdas de óleo ao longo do processamento. Desta forma, a determinação de fosfolipídios tem sido usada como um método de avaliação de uma das fontes de perda de óleo durante a refinação. Esta determinação pode ser efetuada pela precipitação dos insolúveis em acetona ou pela determinação de fósforo, uma vez que se pode considerar que praticamente todo o fósforo existente no óleo ocorre sob a forma de fosfolipídios. Os métodos atualmente em prática são morosos e exigem uma grande quantidade de reagentes.

São usados fatores de conversão de fósforo elementar em fosfatídios, importantes para a avaliação da eficiência da degomagem, além de serem muito úteis no caso do processador estar interessado no aproveitamento dos fosfolipídios do óleo de soja. Através da multiplicação do teor de fósforo elementar pelo fator, se obtém o teor de fosfatídios. O fator de 30 citado no método oficial Ca 12-55 da "American Oil Chemists' Society" (AOCS) (1) foi recomendado para uso indiscriminado em óleos de soja, sejam brutos, degomados ou refinados, o que tem sido questionado. Em adição, este fator foi determinado em função dos insolúveis em acetona, que envolvem outros compostos além dos fosfatídios propriamente ditos. Supõe-se também que óleos de soja de diversas variedades e proveniências apresentarão fatores distintos.

O objetivo do presente estudo foi o estabelecimento deste fator para diferentes óleos de soja, assim como o desenvolvimento de um método rápido de determinação aproximada de fosfatídios em óleos brutos e degomados, para ser utilizado em análises de rotina como controle de qualidade.

É necessário um método analítico que teste a eficiência da degomagem ao longo do processamento. O método proposto é baseado na insolubilidade dos fosfolípidos em acetona, produzindo uma turbidez que pode ser medida com o uso de um espectrofotômetro simples, escolhendo-se o comprimento de onda mais adequado. A adição de alguns compostos que auxiliam a intensificação da turbidez também foi testada.

6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

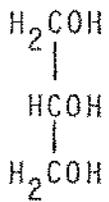
6.1. Fosfatídios em óleo de soja

6.1.1. Nomenclatura

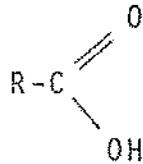
Gorduras neutras (Fig. 1) constituem mono, di- ou tri-ésteres de glicerol com ácidos graxos, sendo denominadas mono-, di- ou tri-acil gliceróis. Assim sendo, acilgliceróis podem ser misturas de quaisquer destes ésteres. (O termo acil se refere ao radical formado pela perda do grupo hidroxila de qualquer ácido) (2).

Fig. 1 - Glicerol e Fórmulas de Ácido Graxo, Mono-, Di- e Tri-Aciliglicerol

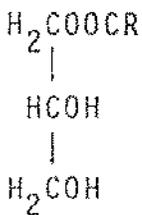
Glicerol



Ácido Graxo

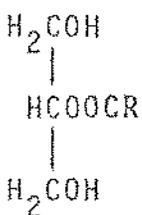


α -Mono-

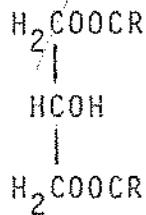


ou

β -Mono-

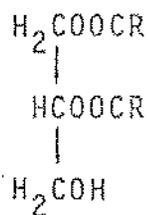


α, α' -Di-

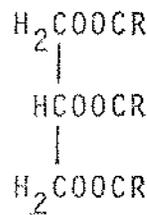


ou

α, β -Di-



Tri-Aciliglicerol



Onde R representa uma cadeia hidrocarbonada linear.

(3)

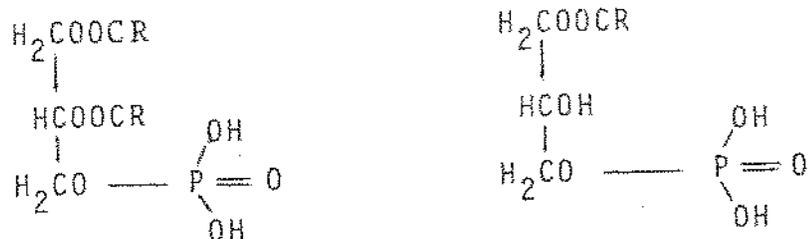
Em regras de nomenclatura rigorosas, os termos di- e tri-glicerídios são desaprovados, por não indicarem com clareza que envolvem a esterificação de dois ou três ácidos graxos com apenas uma molécula de glicerol(2).

Qualquer lipídio que seja um éster do ácido fosfórico pode ser definido como sendo um fosfolipídio (2,4). Fosfolipídios incluem glicero-, esfingo- e inositol fosfatídios, entre outros.

Se o grupo fosfórico esterificar a hidroxila central da molécula de glicerol, este será um β -lipídio, mas se a esterificação envolver uma das hidroxilas da extremidade da molécula de glicerol, este será um α -lipídio (Fig. 1) (5,6).

O ácido fosfatídico é um derivado do glicerol fosfato em que os dois grupos hidroxila do glicerol remanescentes são esterificados por ácidos graxos (Fig.2). Se um dos ácidos graxos for eliminado, obter-se-á o ácido lisofosfatídico (Fig. 2). De acordo com esta terminologia, os radicais correspondentes são fosfatidil- e lisofosfatidil-, respectivamente (2,7).

Fig. 2 - Ácido Fosfatídico e Ácido Lisofosfatídico

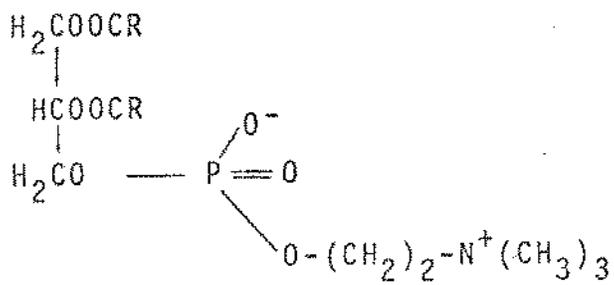


(7)

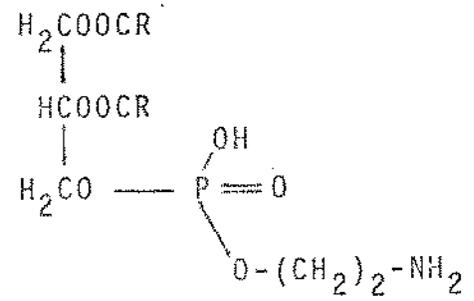
A denominação do fosfolipídio é resultante da união do radical ao nome do composto associado ao grupo fosfórico. Tem-se, por exemplo fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina ou fosfatidil inositol (Fig. 3).

Fig. 3 - Fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina e fosfatidil inositol.

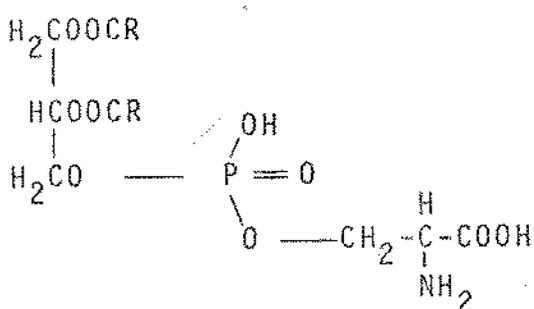
Fosfatidil Colina



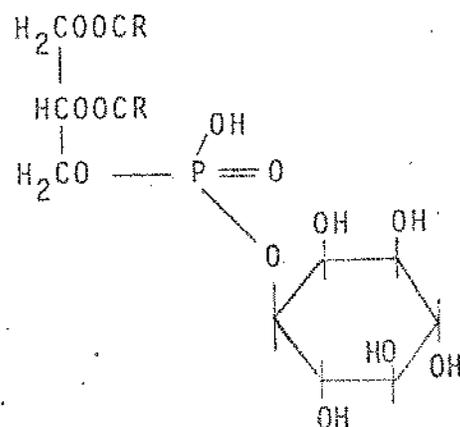
Fosfatidil Etanolamina



Fosfatidil Serina



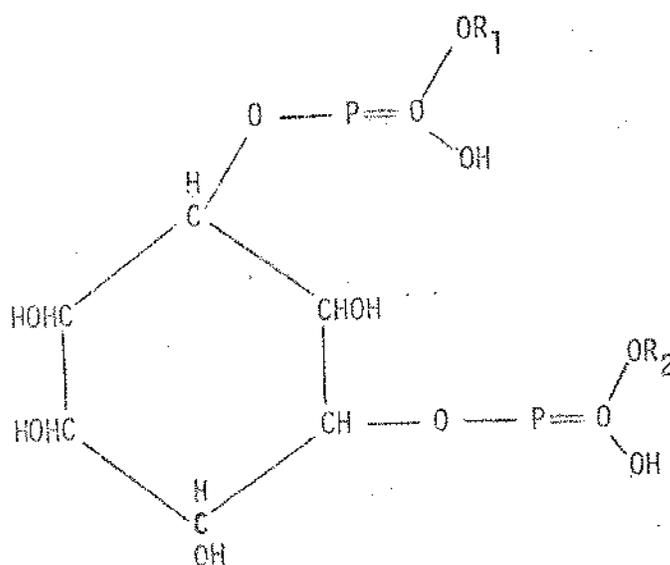
Fosfatidil Inositol



(3)

Aqueles fosfatídios nos quais o álcool poli-hídrico não é glicerol mas inositol, são chamados de inositídios, fosfoinositídios ou inositol fosfatídios (Fig. 4). Se a molécula contiver ambos os álcoois, as substâncias serão conhecidas como gliceroinositofosfa-tídios ou fosfogliceroinositídios (7).

Fig. 4 - Difosfoinositídio



onde R₁ e R₂ provavelmente contêm glicerol e ácidos graxos.

(8,9)

Embora os termos mono-, di- e tri-glicerídio, fosfatídio, fosfoglicerídio e fosfoinositídio não sejam recomendados por IUPAC - IUB (Comissão de Nomenclatura Bioquímica) (2), nesta tese esta terminologia será empregada por ser mais prática e pelo fato de se encontrar em uso corrente nos meios científicos. Porém o uso desses termos pode ser desaconselhável em pesquisas que envolvam a separação e identificação de diferentes compostos fosfolipídicos, por apresentar muitas vezes significado ambíguo.

6.1.2. Composição

Fosfolipídios são encontrados nas membranas de todas as células orgânicas, constituindo um elemento estrutural básico de organismo vivos (10). Assim sendo durante o seu isolamento e purificação, deve ser considerado que estão associados a outros lipídios e proteínas em células vivas (11).

Em 1868, fosfatídios foram precipitados pela primeira vez de uma solução alcoólica pela adição de cloreto de cádmio (CdCl_2) (11).

Até há poucos anos atrás, os fosfatídios eram considerados como sendo constituídos por duas substâncias, ou melhor, por dois grupos de substâncias cuja separação dependia de suas diferentes solubilidades em etanol. Enquanto que a fração solúvel era conhecida como lecitina, a insolúvel era chamada de cefalina. Contudo, não se conseguiu separar completamente estes dois grupos de substâncias por meio de etanol (7, 12, 13, 14).

Embora se possa obter lecitina de alta pureza pela adição de cloreto de cádmio, a fração insolúvel em álcool, que inicialmente se supunha ser apenas de cefali

na, continhá outros compostos além de fosfatidil etanolamina, tais como fosfatidil serina, fosfatidil inositol e outros inositol fosfatídios, que foram aos poucos sendo isolados (11, 14).

Foram encontradas muitas dificuldades na separação das diferentes classes de fosfolipídios. Dos fosfolipídios do óleo de soja, a lecitina foi a mais facilmente purificada, demonstrando ser basicamente constituída por fosfatidil colina (11).

Além disso, observou-se que a fosfatidil etanolamina (cefalina) se encontra presente tanto nas frações solúveis como nas insolúveis em álcool (14, 15, 16, 17).

Métodos cromatográficos mais recentes são baseados na diferente polaridade dos fosfolipídios, efetuando-se uma separação em contra-corrente pela adição contínua ou descontínua de solventes. Diversas classes de fosfatídios foram separadas, sendo que compostos diferindo apenas no comprimento da cadeia, grau e posição de insaturação ou de substituição no glicérol puderam ser isolados (11).

A primeira etapa da separação de fosfatídios passou a ser efetuada com base na sua insolubilidade em acetona.

Em pesquisas de Scholfield et al (14) o material insolúvel em acetona (das frações solúveis e insolúveis em álcool) foi fracionado pela distribuição em contra-corrente entre hexana e metanol. Enquanto que a fração solúvel em álcool continha lecitina e cefalina, a insolúvel apresentava dois inositol fosfatídios principais, sendo encontrados também açúcares ou glicosídeos em ambas as frações. Cálculos efetuados com base nestas pesquisas forneceram a seguinte composição dos fosfatídios de soja :29% de fosfatidil colina, 31% de fosfatidil etanolamina e 40% de inositol fosfatídios.

A composição dos fosfoinositídios não foi completamente determinada, embora várias pesquisas tenham sido efetuadas (7, 14).

Muitas controvérsias surgiram sobre a forma como os carboidratos ocorrem junto aos fosfatídios. Scholfield et al (18) demonstraram que os fosfatídios e os açúcares ocorrem em ambas as formas, combinada e não com

binada (açúcares livres).

Segundo Nielsen (7) os fosfatídios compreendem aproximadamente 29% de fosfatidil colina, 28% de fosfatidil etanolamina, 3% de fosfatidil serina, lisolecitina, ácidos fosfatídicos, compostos semelhantes à esfingomiéline e acetal fosfatídios e cerca de 40% de fosfoinositídios. Em um trabalho posterior do mesmo autor (19), os fosfatídios de soja foram fracionados pela distribuição em contra-corrente entre hexana e etanol, encontrando-se vários outros compostos.

O termo "lecitina" como usado hoje em dia no comércio se refere a uma mistura de compostos que constituem os fosfatídios hidratáveis, tais como fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina e fosfoinositídios como fosfatidil inositol (15, 19). A "lecitina" também consiste de compostos não fosfatídicos tais como triglicéridos, ácidos graxos, pigmentos, esteróis, esterol glicosídios, ésteres, tocoferóis e carboidratos, removidos durante a etapa de degomagem (hidratação) do processamento do óleo (15).

Os fosfatídios hidratáveis produzem gomas ou

compostos insolúveis no óleo por adição de água, que depois de separados são submetidos à secagem e resfriamento (3, 15, 20, 21). Estes fosfatídios apresentam um grupo fortemente polar em sua estrutura, tal como colina, etanolamina, serina ou inositol (19) esterificando o ácido fosfórico como um α -lipídio, de acordo com alguns autores (5, 6, 22).

Por outro lado, os fosfatídios não hidratáveis consistem basicamente de uma mistura de ácidos fosfatídicos e lisofosfatídicos, sendo que só podem ser extraídos de grãos de soja com uma mistura de hexana e álcool (19). Hvolby (23) observou que os fosfatídios não hidratáveis se apresentam no óleo de soja como sais de Ca e Mg dos ácidos fosfatídicos e lisofosfatídicos. Conseqüentemente, não apresentam um grupo fortemente polar (19, 23), sendo provavelmente β -lipídios (5, 6, 22).

6.1.3. Propriedades e utilização

Enquanto que em outras indústrias o uso de fosfatídios compete com o de compostos sintéticos mais eficientes, isto praticamente não ocorre no caso de produtos alimentares. Os fosfatídios parecem não constituir um nutriente essencial, mas são sem dúvida alimentos valiosos (13).

A "lecitina" é mais conhecida por suas propriedades emulsificantes, mas também é um agente umedecedor, dispersante, estabilizante e antioxidante, entre outros (12, 13, 20, 21, 24).

Além de seu uso em alimentos e rações, a "lecitina" é comercialmente utilizada em indústrias têxteis, na fabricação de tintas, na produção de plásticos e compostos de borracha, na indústria farmacêutica e na confecção de cosméticos (13, 21 24).

6.2. Processamento do óleo de soja

A soja atualmente domina o mercado mundial tanto de proteína vegetal como de óleo comestível (25).

A cultura de soja no Brasil tem sofrido um aumento considerável desde 1960, atingindo uma produção recorde de 15.000.000 de toneladas no ano de 1980. Conseqüentemente, tem se formulado novos produtos utilizando-se a soja, assim como desenvolvido técnicas mais adequadas para o aproveitamento de seus subprodutos. Comparando-se grãos de soja de diversas procedências e variedades brasileiras, observou-se um teor de óleo de aproximadamente 22,5% em peso. Atualmente, o óleo de soja é o óleo comestível mais consumido no Brasil, o 2º produtor mundial desta leguminosa (26).

Uma previsão sobre a produção mundial de óleos baseada em dados do ano de 1974 indica que o óleo de soja constituirá cerca de 33,7% da produção total em 1985 (5).

O objetivo do processamento do óleo de soja bruto é a sua purificação através da redução de compostos nocivos a suas características sensoriais. Esta de

pende da qualidade do óleo bruto, que por sua vez depende da soja da qual o óleo foi extraído (22).

As impurezas presentes no óleo bruto são constituídas de fosfolipídios, complexos metálicos, ácidos graxos livres, peróxidos e seus produtos de decomposição e pigmentos, entre outros, como consequência natural da extração (22).

Uma das considerações mais importantes quanto à qualidade do óleo é a manutenção de um fluxo de material rápido e contínuo ao longo do processamento. Além disso é importante se evitar fatores prejudiciais como alta temperatura, umidade elevada, contato com oxigênio, com luz ou com catalizadores de oxidação (27).

Dentre as condições nocivas à qualidade dos grãos de soja durante seu armazenamento, só o teor de umidade pode ser controlado na prática (27). Observou-se que em um ambiente de umidade elevada o dano se torna progressivamente intenso (28). Altos teores de umidade favorecem uma lipólise química ou uma degradação microbiológica por meio do crescimento de fungos que vão causar a deterioração dos grãos, lhes conferindo um

odor e aparência indesejáveis (27, 28). Soja com um teor de umidade menor ou igual a 12% resiste a mudanças de qualidade até por dois anos (28).

Além do efeito prejudicial da umidade excessiva, a soja pode ser danificada por geadas, por condições de colheita desfavoráveis, ou durante o seu transporte ou armazenamento, entre outros. Os óleos brutos obtidos de tais grãos são de qualidade inferior, contendo elevados teores de ácidos graxos livres, de ferro e de fosfatídios não hidratáveis (22, 25, 28, 29, 30, 31), não se transformam em óleos de cor clara com o branqueamento e apresentam um sabor desagradável e uma pior estabilidade, sendo por isso rejeitados pelos processadores (28, 30).

O processamento convencional do óleo envolve sua extração, degomagem, desacidificação com álcali, lavagem com água, branqueamento e desodorização (3, 32, 33).

Antes da extração, o teor de umidade dos grãos é ajustado para seu valor ótimo, que geralmente é cerca de 12-13% (7).

O óleo bruto de soja pode ser submetido a uma pré-prensagem ou é diretamente extraído por um solvente como hexana, que é eliminado depois (3, 33, 34).

6.2.1. Degomagem

Após a dessolventização filtra-se o óleo, seguindo-se o processo de degomagem (33). A finalidade deste processo é a remoção de fosfatídios e de outras substâncias mucilaginosas, que são constituintes indesejáveis ao óleo, por formarem depósitos sólidos dificilmente removíveis dos tanques durante o transporte ou o armazenamento do óleo bruto (5, 33, 35, 36, 37, 38).

O processo de degomagem se baseia na afinidade de parte dos fosfolipídios (α - lipídios) à água, constituindo uma prática internacionalmente utilizada para se evitar perdas desnecessárias de óleo (5, 22). A hidratação torna insolúveis no óleo a maior parte dos fosfatídios e gomas presentes no óleo bruto (Fig.5). Tal hidratação pode ocorrer devido à umidade do ar absorvida pelo óleo durante o armazenamento (autodegomagem) (36), mas é efetuada na indústria pela adição de água ao óleo na etapa de degomagem. Adiciona-se apenas uma quantidade

de de água suficiente para a precipitação das "gomas" (5, 25, 33, 37), uma vez que um excesso resultaria em perdas, influenciando na qualidade do óleo degomado e no teor de óleo das gomas (39). A quantidade de água adicionada deve ser cerca de 75% do teor de fosfatídios do óleo (38, 40, 41).

Industrialmente o óleo de soja é degomado através de dois processos básicos: na degomagem por batelada, que é o principal método usado nos EUA, separa-se os fosfatídios do óleo por centrifugação após agitação da mistura no tanque; o outro processo é por degomagem centrífuga contínua, que é praticado extensivamente na Europa, na qual o óleo bruto pré-aquecido e água são introduzidos em um agitador, mantidos por um breve período, e então bombeados para uma centrífuga onde as gomas e o óleo são separados (42).

Cerca de 90% dos fosfatídios são removidos por degomagem com água (32) mas "lecitinas" e outras gomas são freqüentemente removidas no final do processo de extração; vários métodos para a degomagem de óleos têm sido sugeridos além do método acima descrito (31, 38). O teor de fosfatídios não hidratáveis pode ser reduzi

do (Fig. 5) pela degomagem com: sais e adsorventes (23); por uma solução de NaCl (43), bases como NH_4OH (44), anidridos (35) especialmente como o acético (30, 32), ácidos orgânicos e inorgânicos como o acético (35), cítrico (45), bórico (46), nítrico (35), tânico (47), oxálico (48) e fosfórico (30, 48), entre outros.

Óleos de soja também podem ser degomados por aquecimento a alta temperatura, mas esta prática é restrita a óleos para fins industriais (38).

A descoberta de um método de degomagem que removesse toda a "lecitina" eliminaria a necessidade da etapa de neutralização com álcalis, porque os ácidos graxos livres poderiam ser removidos na etapa de desodorização subsequente (32).

Por outro lado, alguns processadores tratam o óleo bruto diretamente com álcali, sendo que as gomas são removidas com a "borra". A presença de fosfatídios vai aumentar o risco de perdas devido à formação de emulsões durante o tratamento alcalino, sendo que a desodorização pode resultar em um óleo de sabor desagradável (7).

Como o uso de ácido fosfórico pode causar problemas para os processadores que recuperam "lecitina" de soja por originar "gomas" mais escuras, pode-se inicialmente tratar o óleo com água, recuperando em seguida a maior parte da "lecitina", e efetuando-se por último uma degomagem com H_3PO_4 , de modo que a cor da "lecitina" não seja prejudicada (49).

De acordo com regras da "National Soybean Processors Association" (50) faz-se um desconto nas operações comerciais envolvendo óleos degomados com um conteúdo de fósforo superior a 0,02%, sendo que o máximo teor permitido no transporte de óleo degomado é de 0,025%.

6.2.2. Neutralização ou desacidificação

Na refinação alcalina o óleo de soja bruto ou degomado é aquecido com uma solução de soda cáustica para neutralizar os ácidos graxos livres, formando-se sabões insolúveis no óleo (Fig. 5). Usa-se uma quantidade considerável de álcali para garantir a remoção completa de fosfatídios e pigmentos, principalmente se o óleo não tiver sido previamente degomado (22, 37); porém,

um excesso de álcali pode causar perdas de óleo neutro por saponificação, ou por arraste do mesmo (34).

Quanto mais concentrada a solução de soda, menos intensa a cor do óleo refinado (51).

No caso do uso de um pré-tratamento com H_3PO_4 , a quantidade de álcali adicionada deve ser suficiente para neutralizar tanto o H_3PO_4 como os ácidos graxos livres do óleo. Este pré-tratamento melhora a qualidade do óleo branqueado e desodorizado (22, 37).

A mistura é centrifugada para se separar os sabões formados, lavada com água, e novamente centrifugada para eliminar o sabão remanescente do óleo. Se armazenagem for necessária, deve-se secar o óleo para evitar sua hidrólise (22, 37).

Fig. 5 - Principais reações envolvidas na degomagem e neutralização com álcalis.

1. Fosfolipídios hidratáveis $\xrightarrow{+ \text{água}}$ gomas hidratadas
(α -lipídios)
2. Fosfolipídios não ou difi- $\xrightarrow{+ \text{álcali}}$ gomas hidratadas
cilmente hidratáveis (β -lipídios) ou ácido
3. Ácidos graxos livres $\xrightarrow{+ \text{álcali}}$ sabões insolúveis em óleo.

6.2.3. Branqueamento e desodorização

O processo de branqueamento convencional tem o objetivo de descorar o óleo, ou seja, de transformá-lo de um óleo escuro e opaco em um líquido claro e transparente, que apresente uma vida de prateleira prolongada e que seja estável quanto ao sabor, em contraste com o produto original (52).

O branqueamento ou clarificação é efetuado pela adição de uma certa quantidade de terra clarificadora (argila natural ou ativada), de grande poder de adsorção, ao óleo neutralizado quente, que é filtrado depois de um tempo de contato convenientemente definido (22, 52). Contudo, de acordo com Wiedermann (22), a principal função do branqueamento seria a remoção de peróxidos e de produtos de oxidação secundários. A clarificação também elimina os traços residuais de sabão e fosfatídios das etapas de neutralização e lavagem. Segundo o mesmo autor, a redução na intensidade da cor do óleo seria uma consequência da remoção dos pigmentos, como decorrência da etapa de branqueamento, e não o seu objetivo principal.

Por outro lado, Cowan (53), atribui à desodorização, que constitui a fase final do processamento do óleo, e não ao branqueamento, a função de remover todos os produtos de degradação oxidativa que proporcionam ao óleo odor e sabor desagradáveis. Através da desodorização se remove até certo ponto os tocoferóis, esteróis e outros constituintes que ocorrem em menor quantidade, deixando no óleo um conteúdo de 0,02% a 0,05% de ácidos graxos livres.

Contrariando a opinião geral, Wiedermann (22) afirma que a desodorização não remove produtos de degradação oxidativa, que só podem ser eliminados durante o branqueamento, como já foi citado.

A temperatura de desodorização é o parâmetro mais importante quanto a alterações na qualidade do óleo de grãos danificados. Através do uso de temperaturas adequadas, pode-se melhorar a qualidade dos óleos provenientes de tais grãos. Deve-se usar um menor tempo para uma maior temperatura de desodorização ou vice-versa, para se obter um óleo de maior estabilidade (30).

Sabendo-se que a qualidade do óleo bruto pode variar de um lote para outro, deve-se aplicar tratamentos garantindo um óleo refinado de características uniformes. Por outro lado, deve-se adotar o tratamento mínimo (as condições mais suaves) para se assegurar a melhor qualidade do produto final (22).

6.2.4. Refinação física

O óleo bruto de soja também pode ser refinado a vapor (refinação física), que compreende uma pré-refinação (degomagem e branqueamento) e uma etapa de desacidificação - desodorização (54).

O objetivo inicial da refinação física era a redução da acidez até um valor suficientemente baixo, de modo que permitisse uma neutralização alcalina sem grandes perdas de refinação. Atualmente, dependendo do caso, uma refinação física pode dispensar a neutralização alcalina (3). É necessário um pré-tratamento com H_3PO_4 para remover quase que completamente os fosfatídios (3, 48, 49, 54, 55). Ainda não existem muitas informações sobre o teor residual de fosfolipídios após uma refinação física (49). Segundo alguns autores (32, 56), o

uso de anidrido acético como agente degomador seguido por lavagem com água, dispensa a neutralização alcalina, mas isso não pôde ser confirmado no laboratório de óleos e gorduras da FEAA da UNICAMP (3).

Apesar da refinação física reduzir as perdas de óleo, os óleos brutos tais como os de soja (com 0,5 a 1,0% de ácidos graxos livres) não se prestam para uma refinação a vapor em virtude da dificuldade encontrada na degomagem completa do óleo (3, 55).

6.3. Determinação de fósforo e de fosfatídios

A determinação direta de fosfatídios pode ser efetuada utilizando sua insolubilidade em acetona (57).

Por outro lado, o conteúdo de fosfatídios pode ser obtido indiretamente pela avaliação do teor de fósforo do óleo e sua conversão em fosfatídios (41, 58).

Nielsen (7) modificou um método de separação de fosfatídios não hidratáveis baseado em sua insolubilidade em acetona, aumentando a quantidade de água adicionada à acetona e acrescentando ácido acético concentrado; este método demonstrou ser bastante eficiente.

A fase inicial da determinação de fósforo em materiais contendo fosfatídios geralmente consiste na destruição do material orgânico por incineração (1) ou por digestão ácida. No caso de digestão ácida pode-se utilizar ácido sulfúrico (59) ou ácido perclórico (59, 60, 61), entre outros. Este último apresenta grande perigo de explosão, exigindo um extremo cuidado (62).

Seguindo-se a destruição do material orgânico, o fósforo convertido em fosfatos pode ser estimado por métodos gravimétricos, colorimétricos ou volumétricos, sendo que estes últimos (63) não parecem ser amplamente utilizados.

Nos métodos gravimétricos (64) os fosfatos podem ser precipitados em condições adequadas como fosfomolibdato de amônio ou na forma de outros compostos de fosfomolibdato.

Fósforo pode ser estimado colorimetricamente através do uso de reagentes que promovam um desenvolvimento de cor azul de molibdênio proporcional à concentração de fósforo na amostra. Espectrofotômetros ou até mesmo fotômetros mais simples podem ser usados na

leitura dos resultados, relacionados a uma solução - padrão com um teor de fósforo conhecido. Existem variações e modificações do método azul de molibdênio cujo aperfeiçoamento levou ao uso de diversos reagentes (59, 60, 65, 66).

O teor de fósforo também pode ser estimado colorimetricamente pela adição de vários reagentes à solução obtida pela digestão da amostra, tais como nitrato de prata e outros (67, 68).

Recentemente foi desenvolvido um procedimento que consiste na saponificação completa do óleo, sem destruição da matéria orgânica. Neste caso, o fósforo é determinado colorimetricamente através de uma adaptação do método azul de molibdênio (69).

Existem métodos mais sofisticados de determinação de fósforo, tais como pelo uso de Raios X (70, 71) ou por absorção atômica (72), que exigem aparelhos fora do alcance da maioria dos laboratórios.

6.4. Fatores de conversão de fósforo em fosfatídios

Em 1932 observou-se pela primeira vez que alguns óleos brutos deixados em repouso por certo tempo se tornavam turvos, formando um depósito no fundo dos tanques de armazenamento. A composição do precipitado foi elucidada quando se efetuou uma análise de fósforo, indicando um alto teor de fosfatídios. O precipitado foi filtrado através de um funil de Büchner e deixado em repouso por 3 dias. Depois foi dissolvido em clorofórmio e reprecipitado com acetona, sendo então facilmente filtrado através do funil de Büchner e lavado com acetona até que todo o óleo fosse removido. Os fosfatídios foram secos em um dessecador com CaCl_2 por várias semanas, e a seguir foram reduzidos a um pó que continha 3,20% P, calculando-se o teor de fosfatídios em termos de lecitina como sendo 81,6%. O fator de 25,5 usado para calcular as percentagens de fósforo em termos de lecitina é baseado na fórmula de Levine, $\text{C}_{44}\text{H}_{86}\text{PO}_9\text{N}$. Observou-se que a separação dos fosfatídios dependia do

tipo e/ou proveniência dos óleos. Tornou-se então interessante se determinar o teor de fosfatídios dos óleos em questão. Como o óleo de soja não contém quantidades mensuráveis de compostos fosforados outros que fosfatídios, só foi necessário se determinar o seu teor de fósforo; todos os óleos brutos de soja estudados continham quantidades consideráveis de fosfatídios (35).

Como o teor de fosfatídios nem sempre pode ser obtido por métodos diretos, e sabendo-se que praticamente todo o fósforo do óleo de soja está associado aos fosfolipídios, é desejável se recorrer a um fator de conversão de fósforo elementar em fosfatídios (35, 41). Para a determinação deste fator costuma-se precipitar os fosfatídios com acetona (41). Este método é imperfeito pelo fato de fosfatídios e de outras substâncias mucilaginosas consideradas como insolúveis em acetona serem parcialmente solúveis, sendo que esta solubilidade talvez seja apreciável em óleos cujo teor de fosfatídios é pequeno, como os degomados (73). As substâncias que são arrastadas, precipitando com os insolúveis em acetona, também devem ser responsáveis pela discrepância en-

tre os valores experimentais e os calculados para se converter o teor de fósforo elementar no de insolúveis em acetona (41, 58, 74).

Como já foi mencionado, Jamieson & Mc Kinney (35) propuseram um fator de 25,5 para transformar o teor de fósforo elementar no de lecitina pura. Depois, observou-se que os insolúveis em acetona continham 3,20% P, correspondendo a um fator de 31,3 (41). List et al (41) e Pardun (74) afirmaram que a origem do fator 30 vem do trabalho de Scholfield et al (14), complementando que o fator de 29,7 obtido foi arredondado para 30 e incorporado ao método oficial Ca 12-55 da AOCS (1). Dos outros trabalhos de Scholfield et al (17,75) foram deduzidos por List et al (41) fatores de 32,1 e 31,7 mais semelhantes aos de pesquisas mais recentes. Pardun (76) obteve um fator médio de $32,1 \pm 0,9$ para conversão de fósforo elementar a insolúveis em acetona em óleo de soja bruto. List et al (41) obtiveram um fator experimental de 31,7 indicando um teor de 3,15% P nos insolúveis em acetona (Tab. 1) (41).

Tab. 1 - Fatores de conversão de fósforo elementar em
fosfolipídios em óleo bruto de soja

ÓLEO	FÓSFORO (%)	INSOLÚVEIS EM ACETONA(I.A.)%	FATOR= $\frac{\% \text{ I.A.}}{\% \text{ P}}$	FOSFOLIPÍDIOS(%)	
				%Px30	%Px31,7
1	0,0583	1,83	31,38	1,75	1,85
2	0,0623	1,96	31,46	1,87	1,97
3	0,0684	2,35	34,35	2,05	2,17
4	0,0714	2,16	30,29	2,14	2,26
5	0,0733	2,28	31,10	2,20	2,32
6	0,0867	2,74	31,60	2,60	2,75

(41)

De acordo com Chapman (77) a percentagem de fosfolipídios (%PL) em óleo bruto ou degomado de soja pode ser calculada a partir da equação $\% \text{ PL} = \% \text{ P} \times \left(\frac{1}{\text{peso fracionário de P}} \right)$.

O peso fracionário de fósforo é igual ao peso atômico deste elemento (P.Á. = 30,97) dividido pelo peso molecular médio dos fosfatídios. Por sua vez, este exige uma análise dos fosfolipídios do óleo, o que embora seja

cientificamente interessante não é aplicável aos fins industriais. Desta forma Chapman (77) obteve um fator de conversão igual a 25 para óleo de soja bruto. Usando um cálculo semelhante, Singleton & Pattee (78) obtiveram um fator de 24,4 para óleo bruto de amendoim.

Como já mencionado, o método oficial Ca 12-55 da AOCS (1) prescreve um fator de conversão do teor de fósforo elementar a fosfatídios igual a 30, o que tem sido questionado pelo fato deste se referir a insolúveis em acetona, que incluem lipídios não fosforados (glicolipídios e lipídios neutros) e substâncias não fosfatídicas (41, 58, 74, 77). Além disso, no método oficial Ca 12-55 da AOCS (1), o fator 30 é recomendado indiscriminadamente para óleos de soja, sejam brutos, degomados ou refinados, o que tem sido recentemente questionado.

Nos óleos degomados, alguns compostos solúveis em água associados aos fosfatídios são separados destes, tornando o fator inferior a 30. Depois da neutralização com álcali o fator deve diminuir ainda mais, sendo inferior a 25,5 em virtude da remoção de alguns radicais de ácidos graxos e aminas de fosfatídios. Assim sendo,

diferentes amostras de óleos de soja apresentarão fatores distintos, de acordo com o tratamento que sofrerem(58, 74).

6.5. Turbidimetria

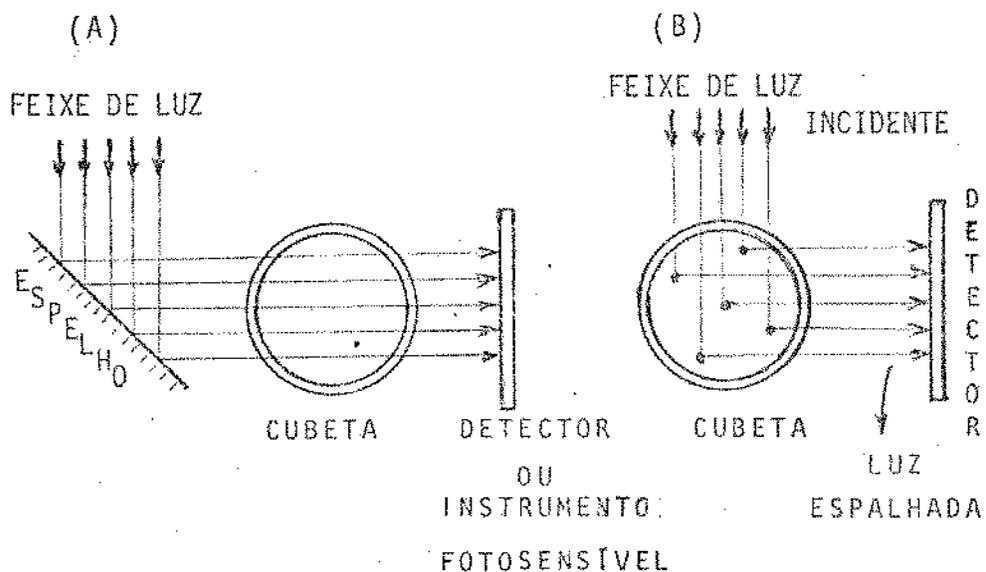
A turbidimetria e a nefelometria são métodos analíticos utilizados para se determinar a concentração da matéria em suspensão (79, 80, 81), baseados no fenômeno do espalhamento da radiação que atravessa uma solução com partículas suspensas (80).

As referências encontradas na literatura quanto ao uso de turbidimetria ou nefelometria para a determinação de fosfolipídios (5,6) apenas sugerem vagamente a utilização destas técnicas, sem a elaboração de um método aplicável a análises quantitativas. A seguir, será desenvolvida uma explicação conceitual da turbidimetria e nefelometria para uma melhor compreensão de seus princípios.

Quando a luz passa através de uma suspensão, parte da energia incidente é dissipada por absorção, reflexão ou refração, enquanto que a restante é transmitida ou espalhada (82,83).

Por turbidimetria é medido o decréscimo de intensidade da luz incidente que atravessa uma solução turva em linha reta, enquanto que por nefelometria se obtém a intensidade da luz dispersada pela suspensão em ângulo reto à direção de propagação da luz (79,80,81,82,83,84,85, 86, 87,88,89) (Fig. 6).

Fig. 6 - Esquema dos sistemas ópticos A) para colorimetria e turbidimetria e B) para nefelometria



Para uma maior sensibilidade, não deve haver ab sorção por quaisquer solutos presentes no comprimento de onda usado (81); isto significa que se a solução for co lorida, é necessário se selecionar uma porção do espectro na qual a absorção pelo meio seja minimizada, obtendo-se sensibilidade máxima no comprimento de onda de maior trans mitância do meio. Neste caso, o padrão é a amostra fil trada, compensando o efeito da cor presente (90). Assim sendo, deve-se considerar tanto a dispersão como a absor ção no caso de partículas opacas (84).

A escolha entre turbidimetria e nefelometria de pende da fração de radiação espalhada pelo sistema em es tudo (80,88).

A intensidade de luz espalhada em qualquer ângu lo muda com o comprimento de onda da radiação (80,81), é função da massa de matéria em suspensão por unidade de volume (concentração) (79), do número de partículas blo queadoras por unidade de volume e da geometria (tamanho e forma) das partículas (79,80,81,82,83,84,88,89), devendo-se também levar em consideração a diferença entre os ín dices de refração das partículas e do meio (80, 81) na leitura da transmitância. Deve-se lembrar que o espalha

mento é maior para radiações de comprimento de onda mais curto (81).

A turbidimetria abrange uma ampla faixa de concentrações (0,1 a 100 ppm) (81), mas exibe pequena sensibilidade em concentrações muito baixas (80, 81, 87,89) devido à dificuldade na medida da atenuação da luz que atravessa a solução (79,83,87).

Por outro lado, medidas nefelométricas são sensíveis para suspensões mais diluídas, já que ocorre um intenso espalhamento de luz em ângulos de 90° à direção de propagação (79,80,85,89). Neste caso, suspensões densas vão resultar em leituras inexatas devido à interferência entre partículas (79,80,81,89).

Como se vê, a turbidimetria e a nefelometria tem seus campos próprios em relação às faixas de concentração e são complementares (80,89).

A turbidimetria tem aplicações bem variadas para amostras gasosas, líquidas ou mesmo sólidas transparentes (79). A turbidez pode ser devida a uma espécie química, ou a combinação de vários componentes (81).

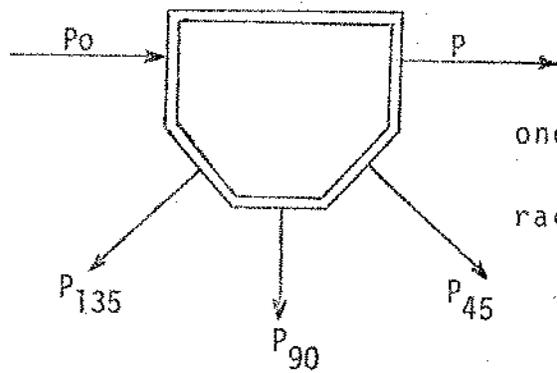
Precipitados difíceis de se filtrar devido ao pequeno tamanho das partículas ou à sua natureza gelatinosa, geralmente constituem suspensões ideais para serem medidas por técnicas de espalhamento de luz, substituindo operações gravimétricas (79).

Em analogia a medidas colorimétricas, a turbidimetria e a nefelometria exigem a seleção de padrões de referência, a eliminação de substâncias interferentes e cuidado quanto à qualidade óptica das cubetas (83).

Cubetas cilíndricas são freqüentemente usadas, embora de acordo com Ohlsen(79) não sejam adequadas para as medidas. Sua superfície curva age como uma lente, de colimando o feixe de luz incidente e colimando parcialmente os raios do feixe de luz transmitida, de modo que o ângulo de espalhamento é incerto e depende dos índices de refração tanto do solvente como das partículas dispersas (85).

O uso de cubetas prismáticas, sejam cúbicas ou multifacetadas (Fig. 7), é preferível para minimizar reflexões internas de luz e espalhamento múltiplo nas paredes da cubeta (79,81,85,88).

Fig. 7 - Cubeta multifacetada



onde P é a potência da radiação

(79,85)

Para se observar apenas determinados ângulos de espalhamento deve-se cobrir as paredes laterais com preto, que vão deste modo se tornar superfícies não transmissoras (79,85,89,91).

Quando uma radiação de potência P_0 atravessa uma suspensão diluída não absorvente, a potência transmitida P pode ser determinada como em espectrofotometria, ou a um determinado ângulo que favoreça a medida. A relação entre P e P_0 é dada por $P = P_0 e^{-\tau b}$ onde τ é a turbidez ou coeficiente de turbidez e b é o comprimento do percurso(80).

Pode-se também determinar experimentalmente a potência a um ângulo específico (como P_{90} a 90°). Enquanto que P/P_0 diminui, P_{90}/P_0 aumenta com o maior número de partículas em suspensão (85).

Análises turbidimétricas e nefelométricas são m todos muito mais adaptáveis a uma série de análises que a uma determinação específica ocasional, sendo também recomendável a construção de curvas de calibração obtidas a partir de sistemas semelhantes aos analisados, porém de concentrações conhecidas (81, 89).

Para uma análise turbidimétrica ou nefelométrica ser quantitativamente confiável, a precipitação deve ser efetuada sob condições que assegurem a reprodutibilidade do tamanho das partículas resultantes (83, 90). Este é o aspecto mais crítico dos métodos turbidimétricos e nefelométricos (80, 81, 88). As partículas em suspensão raramente apresentam tamanho uniforme. É extremamente importante que todas as amostras e padrões tenham a mesma distribuição de partículas pequenas, médias e grandes. Isto, por sua vez, requer que as amostras e padrões sejam preparados lado a lado sob condições semelhantes, o que nem sempre é uma tarefa fácil. As variações no crescimento das partículas constituem a causa mais freqüente de erros em turbidimetria e nefelometria (79).

Assim sendo, deve-se padronizar as condições de nucleação e crescimento associadas à formação de precipitado, para o método ser reprodutível. Estas dependem de vários fatores, tais como: concentração dos reagentes (81, 82, 83, 84, 85, 88), maneira (82, 86) e ordem (79, 82, 88) de mistura dos reagentes, condições (79, 84, 85, 86) e velocidade (81, 82, 84, 88) de mistura, tempo permitido para o crescimento das partículas (80, 83), ou seja, tempo de agitação (79) e tempo de repouso (81, 88), temperatura (79, 80, 82, 83, 84, 85, 86, 88), natureza do meio (80, 88), isto é, pH (79) e força iônica, presença de substâncias não reativas que possam afetar a nucleação ou o crescimento de retículos cristalinos (79, 85), a quantidade de outros sais e substâncias presentes, especialmente de colóides protetores (gelatina, ágar, albumina, goma arábica, dextrina, etc.) (80, 82).

Uma estabilização efetiva de suspensões turbidimétricas pode ser obtida por agentes tensoativos de carga semelhante (90). Contudo, após a formação do precipitado, se as condições experimentais não forem devidamente controladas, uma deposição diferencial do precipitado, re

cristalização, reação química e absorção atrasadas podem limitar a sua estabilidade (83).

Além disso, o precipitado deve ser pouco solúvel e bem fino, para se formar rapidamente (80), porém de modo que suas partículas não se depositem imediatamente (82, 90).

Concluindo, apesar do perigo de se obter resultados inexatos, os métodos analíticos baseados no fenômeno de espalhamento da radiação podem ser usados quando métodos analíticos precisos forem tediosos, exigirem uma técnica experimental extremamente cuidadosa ou quando os resultados da análise não precisarem ser muito acurados. As vantagens da turbidimetria e da nefelometria são a simplicidade da instrumentação e a rapidez dos procedimentos e medidas, comparadas a outros métodos (84, 86).

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Materiais

Nesta pesquisa foram utilizadas três amostras de óleos degomados de soja (A, B e C), todas obtidas de indústrias.

Foram quatro os óleos de soja brutos, incluindo óleos comerciais (D e E) e óleos extraídos em laboratório (F e G).

Utilizou-se também um óleo comercial refinado.

Para as determinações foram usados reagentes e equipamentos convencionais de laboratório.

7.2. Métodos

7.2.1. Métodos de caracterização de óleos

Índice de Acidez segundo o método oficial Aa 6-38 da AOCS (92).

Índice de Iodo segundo o método oficial Cd 1-25 da AOCS (93).

Índice de Saponificação segundo o método oficial Cd 3-25 da AOCS (94).

A composição de ácidos graxos das amostras B e E foi determinada por cromatografia gasosa, a partir dos ésteres metílicos obtidos de acordo com o método desenvolvido por Hartman & Lago (95).

7.2.2. Determinação de fósforo

A determinação de fósforo descrita a seguir foi baseada no método desenvolvido no laboratório de Óleos e Gorduras da FEAA da UNICAMP (69) com algumas modificações:

Reagentes

- Solução de hidróxido de sódio a 50% (m/m) guardada em um cadinho de Teflon tampado;
- Etanol comercial (96%);
- Ácido clorídrico concentrado;
- Hexana comercial redestilada;
- Solução de molibdato de amônio a 5% (m/v);

- Solução de metol (agente redutor): 0,5g de metol (p-amino fenol sulfato), 2,4g de sulfito de sódio e 12,5g de bissulfito de sódio dissolvidos em água destilada, completando-se o volume a 100 ml (esta solução foi guardada em frasco escuro na geladeira);

- Solução - padrão de dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) contendo 0,1mgP/ml.

PROCEDIMENTO

A vidraria utilizada nesta análise foi previamente lavada com água destilada para remover quaisquer traços de fósforo porventura presentes.

Preparou-se o padrão usando a solução de dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) contendo 0,1mg P/ml. Foi pipetado 1 ml de NaOH a 50% para um balão volumétrico de 25 ml, adicionando-se água destilada até cerca da metade de seu volume e em seguida 2,5 ml de HCl concentrado. Completou-se o volume com água destilada, retirando-se alíquotas de 10 ml para outros dois balões volumétricos de 25 ml (padrão e branco, respectivamente); pi-

petou-se 1 ml da solução de KH_2PO_4 (0,1mgP/ml) para am bos, 1 ml da solução de molibdato apenas para o padrão e 2 ml da solução redutora para ambos os balões, nesta ordem. Completou-se com água destilada, e após 30 minutos de repouso foi lida a absorvância a 690 nm no es pectrofotômetro Micronal modelo B 295II.

Sabendo-se que a curva da "concentração em mgP/25ml versus absorvância" obedece a lei de Beer (69), não foram determinados outros pontos da curva.

O peso da amostra de óleo foi escolhido de a cordo com o seu teor aproximado de fósforo. Para conteúdos de fósforo iguais ou menores que 0,01% usou-se 2,5g de óleo; caso contrário, o peso inicial foi proporcionalmente menor, ou se efetuou uma maior diluição.

A amostra foi pesada em um cadinho de Teflon, adicionando-se em seguida 1 ml da solução de NaOH a 50% e 5ml de etanol comercial. O cadinho foi aquecido em uma chapa elétrica, misturando-se seu conteúdo de vez em quan do com uma bagueta de Teflon até quase completa secura. Em seguida, o cadinho foi deixado por 30 minutos em uma

estufa a 180°C . Depois de resfriar, seu conteúdo foi transferido para um becher de 200 ml lavando-se o ca dinho com 15 ml de água destilada, também transferi - dos.

Acrescentou-se 2,5 ml de HCl concentrado, dei xando a mistura ferver brandamente por alguns minutos para a liberação dos ácidos graxos e conversão de piro- em orto-fosfatos. Resfriou-se e se adicionou com pro veta 10 ml de hexana. A mistura foi transferida para um funil de separação, do qual se coletou exatamente 25ml da fase aquosa inferior para um balão volumétrico de 25 ml, por lavagens consecutivas da fase hexana com água destilada. A fase aquosa foi filtrada para uma prove ta através de papel de filtro até ficar límpida, pipetando-se em seguida alíquotas de 10 ml do filtrado para dois balões volumétricos de 25 ml (amostra e branco). Adicionou-se apenas à amostra 1,0 ml da solução de molibdato de amônio a 5%, e 2 ml da solução de metol pa ra ambos, mantendo a ordem descrita.

Completou-se o volume com água destilada e se deixou em repouso por 30 minutos; a absorbância foi então lida no espectrofotômetro Micronal modelo B 295II a 690 nm.

Cálculo de teor de fósforo

Conhecendo-se a absorvância referente ao padrão (que corresponde a 0,1mg de fósforo em 25 ml), pode-se obter por "regra de três", a massa de fósforo em 25 ml de solução.

A partir do peso (em mg) da amostra inicial, se calcula a percentagem de fósforo de acordo com a seguinte fórmula:

$$X = \frac{25}{P_A} \frac{A_A}{A_P}$$

Onde X é a percentagem de fósforo na amostra,

P_A é o peso da amostra em mg,

A_A é a absorvância da solução final da amostra e

A_P é a absorvância da solução-padrão.

7.2.3. Determinação em óleos brutos da matéria insolúvel em acetona

Reagentes

- Acetona comercial saturada com fosfatídios
- Éter etílico P.A.

BC/5118

PROCEDIMENTO

Pesou-se aproximadamente 5g de óleo em um tubo de centrífuga. Foram adicionados 15 ml de acetona saturada com fosfatídios. Colocou-se então em banho de gelo por 5 minutos. Misturou-se bem com o uso de uma bagueta de vidro, adicionando então com proveta, 30 ml de acetona fria e deixando no gelo por 15 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos e decantou-se a acetona. Adicionou-se mais 40 ml de acetona, misturando com bagueta. Deixou-se no gelo por mais 15 minutos e centrifugou-se novamente, decantando a acetona.

Adicionou-se 5 ml de éter etílico e aqueceu-se até que tudo estava dissolvido. Transferiu-se para um cadinho de Teflon seco e pesado e lavou-se com 5 ml de éter etílico em pequenas quantidades. Evaporou-se o éter em uma chapa elétrica, mexendo sempre.

Colocou-se na estufa a 105°C por 30 minutos e pesou-se novamente. Determinou-se fósforo no precipitado obtido, de acordo com o método previamente descrito.

7.2.4. Determinação em óleos degomados da matéria

insolúvel em acetona

Reagentes

- Acetona comercial
- Ácido acético P.A.
- Celite
- Éter etílico P.A.

PROCEDIMENTO

Pesou-se 50g de óleo em uma balança semi-analítica, sendo adicionados 200 ml de acetona, 2 ml de ácido acético e 2 ml de água.

Após se deixar por 30 minutos na geladeira, formaram-se duas fases; coletou-se com uma pipeta a fase inferior, que continha a maior parte dos fosfatídios, diluindo com acetona em uma razão de 1:4.

Adicionou-se celite à mistura, que foi filtrada através de papel de filtro. Lavou-se então com acetona para remover o óleo remanescente. O precipitado foi

dissolvido ao se lavar o filtro com éter etílico, passando para um cadinho de Teflon previamente pesado e seco. Evaporou-se o éter em uma chapa elétrica, deixando-se secar em uma estufa a 105°C, até peso constante. Estimou-se então o conteúdo de fósforo neste precipitado segundo o método descrito anteriormente.

Cálculo do fator de conversão de fósforo em insolúveis em acetona

A partir do teor de fósforo nos insolúveis em acetona, calculou-se o fator de conversão como a razão entre a quantidade de precipitado e o teor de fósforo determinado no mesmo.

7.2.5. Turbidimetria

Reagentes

- Acetona P.A. contendo 2% de água
- Hexana destilada

PROCEDIMENTO

Em tubos de ensaio contendo acetona com 2% de água, pipetou-se amostras de cada um dos óleos na proporção de 1:10 ou de 1:20 (óleo:acetona), respectivamente. Os brancos foram preparados usando-se hexana na mesma proporção. A temperatura ambiente era de aproximadamente 25°C, sendo efetuadas leituras em um espectrofotômetro Micronal modelo B 295II imediatamente após a obtenção da mistura, no comprimento de onda 540 nm.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. Características das amostras dos óleos de soja estudados

Os resultados das determinações das características dos óleos degomados e brutos utilizados neste trabalho aparecem na tabela 2.

Tab. 2 - Características dos óleos de soja degomados e brutos

	ÓLEOS	ACIDEZ	ÍNDICES DE	
			ÍODO	SAPONIFICAÇÃO
DEGOMADOS	A	1,1	128,6	193,0
	B	5,5	127,4	192,8
	C	1,1	129,2	190,5
BRUTOS	D	1,6	136,5	191,7
	E	1,1	130,2	191,4
	F	2,8	133,8	189,9
	G	2,2	132,7	193,3

As características dos óleos de soja usados estão de acordo com os valores normalmente encontrados em óleos de soja produzidos no Brasil.

Como exemplo, determinou-se a composição de ácidos graxos de duas das amostras de óleo de soja estudadas, B e E, degomado e bruto respectivamente, que se encontra na tabela 3, calculada com base nos cromatogramas correspondentes (Fig. 8 e Fig. 9).

Utilizou-se um cromatógrafo a gás modelo CG 270, operando-se nas seguintes condições:

coluna: 17% DEGS/Chromosorb W

temperatura da coluna: 200°C

temperatura do detector: 270°C

temperatura do vaporizador: 280°C

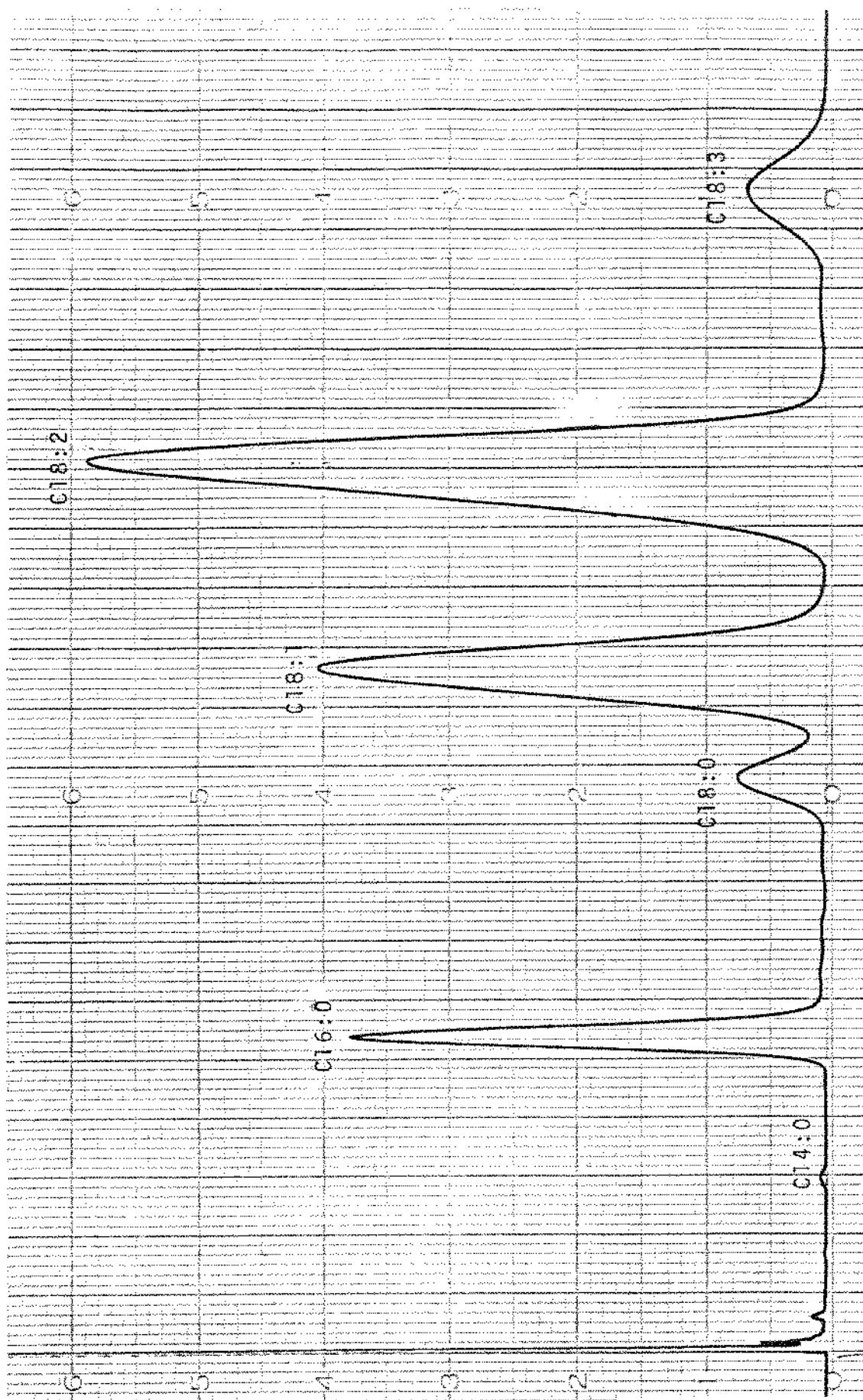
gás de arraste: N₂ (vazão= 35ml/min)

injeção: 0,1µl

Tab. 3 - Composição de ácidos graxos das amostras B e E.

<u>ÁCIDO GRAXO</u>		<u>B</u> (ÓLEO DEGOMADO)	<u>E</u> (ÓLEO BRUTO)
		%	%
Mirístico	14:0	0,07	0,05
Palmítico	16:0	11,55	11,42
Estearico	18:0	4,56	4,15
Oleico	18:1	27,91	24,76
Linoleico	18:2	49,41	52,53
Linolênico	18:3	6,49	7,09

Fig. 8 - Cromatograma do óleo degomado B.



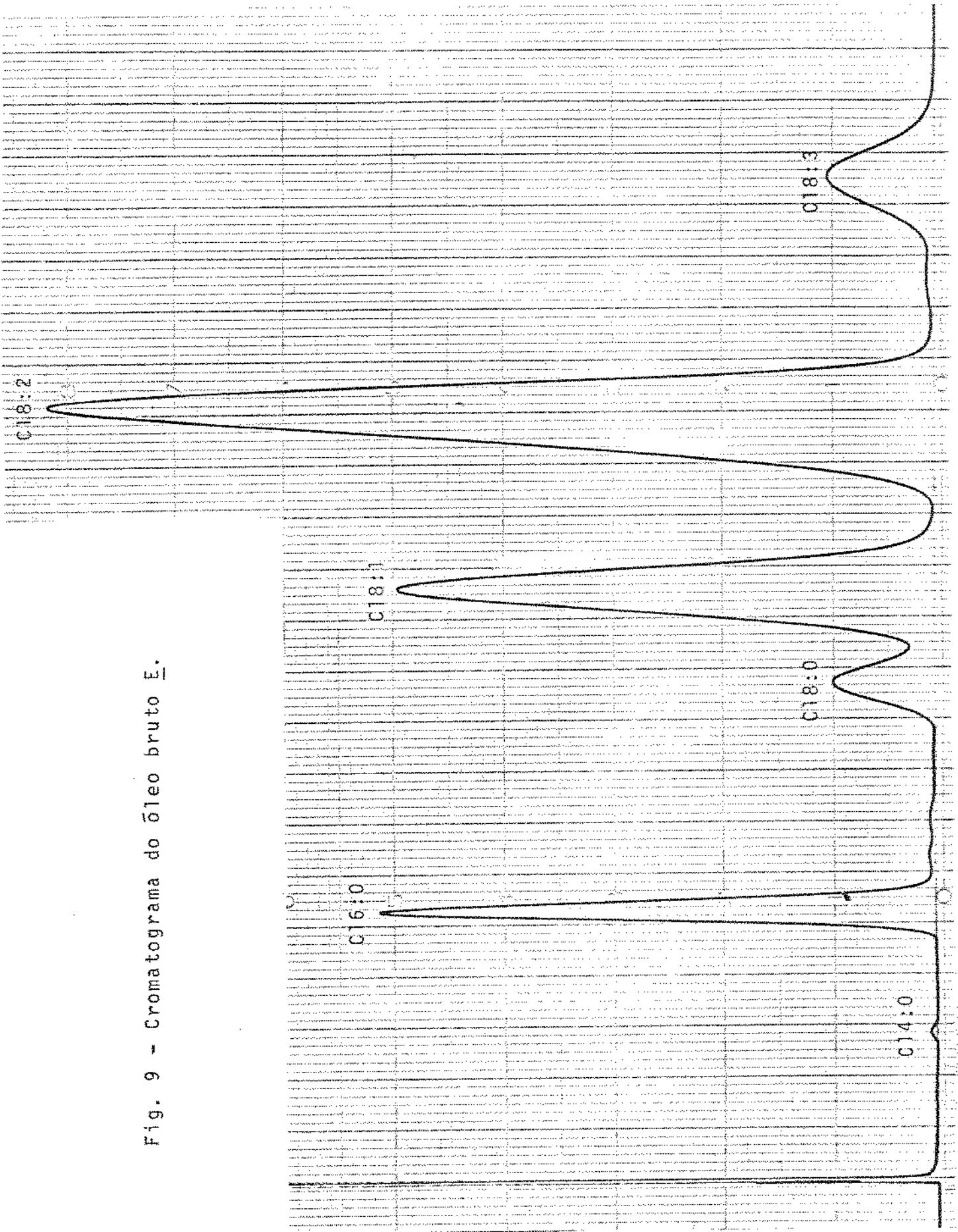


Fig. 9 - Cromatograma do óleo bruto E.

8.2. Determinação do teor de fósforo e do fator de conversão

Neste estudo, as determinações de fósforo nos óleos brutos, degomados e refinados de soja foram efetuadas através de uma modificação do método que compreende uma digestão alcalina (69) ao invés de incineração, como é descrito no método oficial Ca 12-55 da AOCs (1).

Saponificação total ocorre quando se submete a amostra à ação de excesso de álcali a 180°C por 30 minutos, não havendo necessidade de se destruir a matéria orgânica. O método usa um cadinho de Teflon por não conter fósforo e por resistir à ação de álcali à temperatura desejada (180°C).

Nesta determinação se omite a adição no branco do reagente responsável pelo desenvolvimento de cor, mas se adiciona o fosfato da amostra, o que não é uma prática habitualmente adotada em métodos colorimétricos. A intenção é reproduzir no branco as condições da amostra, mantendo-se o pH, a mesma concentração de NaCl e

compensando a cor da solução final.

As vantagens do método de saponificação (69) são o menor risco para o operador comparado com os métodos de digestão ácida (59, 60, 61) e o menor tempo de análise comparado com o método oficial Ca 12-55 da AOCs (1).

O método de saponificação foi usado para se determinar o teor de fósforo em cada um dos óleos estudados assim como o teor de fósforo nos fosfatídios precipitados com acetona. O fator de conversão de fósforo elementar em fosfatídios foi calculado na base de seu teor em fosfatídios e não no seu teor em óleos brutos ou degomados, devido à incompleta precipitação dos fosfatídios com acetona.

Na tabela 4 para óleos degomados pode-se ver o teor de fósforo, o fator de conversão de fósforo elementar em fosfatídios obtido com base na sua determinação em insolúveis em acetona, o teor de fosfatídios calculado com base neste fator e o teor de fosfatídios calculado usando o fator de 30 (1).

Tab. 4 - Teores de fósforo e de fosfatídios e fatores de conversão de fósforo elementar em fosfolipídios de óleos de soja degomados

ÓLEO	%P	FATOR OBTIDO DA ANÁLISE DOS INSOLÚVEIS EM ACETONA	DA INSO-	% FOSFATÍDIOS COM BASE NO FATOR OBTIDO	% FOSFATÍDIOS (FATOR DA AOCs=30)
A	0,0081	16,4		0,13	0,24
B	0,0082	18,3		0,15	0,25
C	0,0115	21,4		0,25	0,35

Nota-se que os fatores obtidos para óleos degomados foram bem inferiores ao fator de 30 citado no método oficial Ca 12-55 da AOCs e até mesmo menores que 25,5, indicando a provável remoção de compostos solúveis em água associados aos fosfatídios com o processo de degomagem e uma hidrólise parcial de fosfatídios. Comparando-se os teores de fosfatídios obtidos a partir do fator 30 com os teores obtidos no presente estudo, observa-se que a diferença é de até 85%.

Os resultados correspondentes aos óleos brutos são mostrados na tabela 5.

Tab. 5 - Teores de fósforo e de fosfatídios e fatores de conversão de fósforo elementar em fosfolipídios de óleos de soja brutos

ÓLEO	%P	FATOR OBTIDO DA ANÁLISE DOS INSOLÚVEIS EM ACETONA	% FOSFATÍDIOS COM BASE NO FATOR OBTIDO	% FOSFATÍDIOS (FATOR DA AOCS=30)
D	0,0188	32,0	0,60	0,56
E	0,0416	25,6	1,06	1,25
F	0,0416	28,6	1,19	1,25
G	0,0625	32,0	2,00	1,88

O óleo D apresentou um teor de fósforo surpreendentemente baixo, enquanto que o óleo G foi o único que apresentou um teor de fósforo superior a 0,06%. Em comparação, List et al (41) dentre seis óleos de soja encontraram apenas um óleo com um teor de fósforo abaixo de 0,06%, como indicado na tabela 1 da Revisão Bibliográfica.

A considerável diferença observada entre estes óleos e os óleos usados no presente trabalho provavelmente se deve a características genéticas da soja brasileira ou a possível danificação dos grãos durante o transporte e armazenamento em condições tropicais.

Quanto aos fatores de conversão encontrados para os óleos brutos, observa-se que todos são superiores a 25,5 (fator calculado com base na fórmula de Levine para lecitina)(35), sendo maiores que 30 apenas para os óleos D e G, enquanto que List et al (41) obtiveram fatores maiores que 30 para todos os óleos por eles estudados.

Os fatores encontrados demonstraram que o método oficial Ca 12-55 da AOCs é contestável porque prescreve o mesmo fator de 30 tanto para óleos brutos, como para óleos degomados ou refinados.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os fatores de conversão para óleos brutos podem apresentar valores acima de 30, em concordância com os resultados de outros autores (41, 74), mas também abaixo deste valor. Para óleos degomados, de acordo com as considerações anteriores, este fator deveria ser ao redor ou abaixo de 25,5.

A determinação do fator para óleos refinados não parece por enquanto praticável, tendo em vista que não existe atualmente um método de determinação direta de fosfatídios em óleos refinados.

8.3. Turbidimetria

Sabendo-se que acetona precipita fosfatídios de óleos, resultando em uma turbidez, pareceu de interesse se determinar as absorbâncias de misturas de óleo com acetona contra soluções de mesma concentração de óleo em hexana.

Utilizou-se vários compostos com a intenção de intensificar a turbidez. Contudo, pela adição de ácido cítrico, ácido salicílico ou ácido tricloroacético à acetona em pequenas (1- 2%) concentrações não se observou turvação.

Ácido ortofosfórico anidro ou ácido metafosfórico foram testados, mas não se dissolveram em acetona. O uso de ácido clorídrico também não deu resultados satisfatórios.

Por outro lado, compostos tais como $MgCl_2$, $AlCl_3$ ou $ZnCl_2$ entre outros, não forneceram resultados coerentes, ou seja, não se observou proporcionalidade entre o teor de fosfatídios e a absorbância lida em um espectrofotômetro.

Usando-se cerca de 40% de anidrido acético, se obteve turbidez quase igual em óleos brutos e degomados, o mesmo sendo com o uso de acetato de alumínio básico misturado com ácido acético glacial e de nitrato de alumínio.

Testando-se a adição de 0,5% de HNO_3 a acetona, se obteve óleos degomados e brutos claros. Até cerca de 3% de HNO_3 , as soluções continuaram límpidas, porém um maior excesso tornou ambos os óleos turvos, separando-se duas fases.

Inicialmente a adição de ácido bórico pareceu promissora por causar uma turbidez muito mais intensa em óleos brutos do que em óleos degomados.

Além disso, os testes quantitativos preliminares com outros compostos adicionados à acetona exigiram a manutenção das misturas em banho de gelo durante 10 minutos, imediatamente antes da medida de absorbância.

Uma das vantagens do uso de acetona saturada com ácido bórico foi a de que esta solução dispensava o resfriamento para a obtenção de turbidez. Todas as leituras foram efetuadas em torno de 25°C.

Após terem sido testados comprimentos de onda de 500 a 580 nm, o de 540 nm foi escolhido porque demonstrou abranger uma faixa de absorbâncias mais adequada à leitura. Em comprimentos de onda mais altos a absorbância foi pequena para óleos degomados, enquanto que em comprimentos de onda mais baixos a absorbância foi excessiva para óleos brutos.

Foram então efetuados testes com os óleos degomados e brutos em proporção de 1:5 e 1:10 em re

lação à acetona saturada com ácido bórico (Tab. 6).

Tab. 6 - Absorbâncias de misturas de óleos de soja com acetona saturada com ácido bórico, lidas no espectrofotômetro Micronal em $\lambda = 540\text{nm}$ à temperatura de aproximadamente 25°C contra soluções de mesma concentração destes óleos em hexana.

ÓLEO	%P	ABSORBÂNCIAS EM DILUIÇÕES DE	
		1:5	1:10
A	0,0081	0,155	0,125
B	0,0082	0,134	0,134
C	0,0115	0,377	0,356
D	0,0188	0,346	0,211
E	0,0416	0,602	0,438
F	0,0416	0,523	0,426
G	0,0625	0,602	0,456

Efetuuou-se a leitura das amostras imediatamente após a adição de acetona ao óleo para evitar a deposição do precipitado e consequente mudança de absorbância (leitura a 25°C).

BIBLIOTECA CENTRAL
UNICAMP

O espectrofotômetro Micronal é bem simples, mas utiliza cubetas cilíndricas, e por isso repetiu-se a experiência com o espectrofotômetro Beckman que emprega cubetas cúbicas. Desta forma pôde-se cobrir as faces não transmissoras das cubetas com fita isolante preta para impedir o espalhamento de luz, evitando perdas e consequentemente aumentando a absorbância consideravelmente (79, 89, 91).

Para os óleos B (bruto) e E (degomado), usando-se óleo e acetona saturada com ácido bórico na proporção de 1:5, se obteve absorbâncias de 0,301 e 1,398 sem se cobrir as paredes laterais das cubetas e absorbâncias iguais a 0,398 e 1,602 ao se cobrir as paredes laterais das cubetas, respectivamente.

Determinou-se então as absorbâncias de todas as amostras nas mesmas concentrações no espectrofotômetro Beckman (Tab. 7).

Tab. 7 - Absorbâncias de misturas de óleos de soja com acetona saturada com ácido bórico, lidas no espectrofotômetro Beckman em $\lambda = 540$ nm a temperatura de aproximadamente 25°C contra soluções de mesma concentração destes óleos em hexana.

ÓLEO	%P	ABSORBÂNCIAS EM DILUIÇÕES DE	
		1:5	1:10
A	0,0081	0,187	0,187
B	0,0082	0,495	0,276
C	0,0115	0,678	0,319
D	0,0188	0,903	0,491
E	0,0416	1,00	0,523
F	0,0416	1,46	0,959
G	0,0625	1,05	0,620

As diferenças nas leituras para os vários óleos testados nos dois tipos de espectrofotômetro se devem a diferente forma e espessura das cubetas, pelo uso de fita isolante preta no caso das cubetas cúbicas e devido a características dos próprios aparelhos.

Observa-se que em ambas as diluições as leituras no espectrofotômetro Micronal foram semelhantes para óleos degomados, enquanto que no caso de óleos brutos as absorvâncias não foram proporcionais às diluições nem às concentrações de fósforo das amostras.

Com o uso do espectrofotômetro Beckman os resultados foram mais razoáveis para quase todos os óleos estudados, porém ainda não se obteve boa proporcionalidade.

Tentou-se aplicar a lei de Beer através da diluição de óleos brutos ou degomados com óleos refinados, que não apresentam turbidez devido ao seu baixo teor de fósforo (cerca de 0,002%P) e conseqüentemente de fosfatídios. Contudo, não foi observada proporcionalidade. O mesmo ocorreu pelo uso como diluente de ácidos graxos livres de óleo de soja, e de óleo cujos fosfatídios foram precipitados com acetona e removidos por filtração.

A experiência que produziu resultados mais coerentes foi pelo uso de acetona com 2% de água (Tab.8). Porém neste caso, uma diluição de 1:5 proporcionou tur

vação demasiada no comprimento de onda escolhido. Por isso, se preparou misturas com diluições de 1:10 e de 1:20. O espectrofotômetro Micronal foi escolhido para a leitura devido a maior simplicidade de operação. As medidas foram efetuadas no comprimento de onda de 540 nm, à temperatura de aproximadamente 25°C.

Tab. 8 - Absorbâncias de misturas de óleos de soja com acetona contendo 2% de água, lidas no espectrofotômetro Micronal em $\lambda = 540$ nm à temperatura de aproximadamente 25°C contra soluções de mesma concentração destes óleos em hexana.

ÓLEO	%P	ABSORBÂNCIAS EM DILUIÇÕES DE	
		1:10	1:20
A	0,0081	0,113	0,046
B	0,0082	0,081	0,027
C	0,0115	0,148	0,071
D	0,0188	0,194	0,102
E	0,0416	0,377	0,167
F	0,0416	0,420	0,244
G	0,0625	0,657	0,301

Relacionando-se ao teor de fósforo, a diluição de 1:10 desta série de leituras apresentou resultados mais coerentes que as anteriores, enquanto que a segunda diluição (de 1:20) foi a que melhor se aproximou à lei de Beer, quando comparada à diluição inicial (de 1:10).

O estudo sobre a determinação de fósforo (e de fosfatídios) em óleos brutos e degomados pelo uso de técnicas de espalhamento de luz requer um aperfeiçoamento de modo que se possa distinguir diferenças de até 0,005% de fósforo aproximadamente. Além disso, o método deve ser reprodutível para aplicação no controle industrial da degomagem, obedecendo a Lei de Beer. Provavelmente aparelhos mais adequados a medidas de absorbância em baixas concentrações como nefelômetros fornecerão resultados mais coerentes. É mais conveniente o uso de espectrofotômetros que possam ser adaptados à nefelometria, já que nefelômetros são demasiadamente específicos, sendo por isso dificilmente encontrados em laboratórios convencionais.

9. CONCLUSÕES

9.1. Os teores de fosfatídios obtidos para os óleos estudados foram bem inferiores aos relatados em outros trabalhos, provavelmente devido às características genéticas da soja brasileira e à possível danificação dos grãos durante o transporte e armazenamento em condições tropicais.

9.2. O uso do fator de 30 de conversão de fósforo elementar em fosfatídios do método oficial Ca 12-55 da "American Oil Chemists' Society" (AOCS) é contestável devido à diferença na composição de fosfatídios dos óleos brutos, degomados e refinados, devendo-se obter um fator diferente se o óleo em questão for bruto ou degomado.

9.3. Os óleos brutos podem apresentar fatores maiores ou menores que 30, enquanto que óleos degomados em geral mostram fatores abaixo de 25,5.

9.4. Como até o momento não se pôde obter experimentalmente o teor de fosfatídios de óleos refinados, ainda não é possível a determinação do

fator de conversão de fósforo elementar em fosfatídios, neste caso.

9.5. Foi desenvolvido um método aproximado baseado em turbidimetria na avaliação do teor de fósforo (e de fosfatídios) usando-se óleo dissolvido em acetona com 2% de água e determinando-se a absorbância em um espectrofotômetro contra óleo em hexana, na mesma concentração. Este método tem por finalidade o controle industrial do processo de degomagem do óleo.

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

1. A.O.C.S. Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society. Champaign, IL (Revised to 1973). Official method Ca 12-55.
2. IUPAC - IUB Commission on biochemical nomenclature. The nomenclature of lipids — Recommendations (1976) Lipids, 12 (6): 455-468, 1977.
3. HARTMAN, L. & ESTEVES, W. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982.
4. EARLE, F. R. & MILNER, R.T. The occurrence of phosphorus in soybeans. Oil & Soap, 15 (4): 41-42, 1938.
5. CARR, R. A. Degumming and refining practices in the U.S. JAACS, 53 (6): 347-352, 1976.
6. CARR, R. A. Refining and degumming systems for edible fats and oils. JAACS, 55(11): 765-771, 1978.
7. NIELSEN, K. Studies on the non-hydratable soybean phosphatides. London, Maxons, 1956.

8. FOLCH, J. Complete fractionation of brain cephalin: isolation from it of phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine, and diphosphoinositide. J. Biol.Chem., 177 (2): 497-504, 1949.
9. FOLCH, J. Brain diphosphoinositide, a new phosphatide having inositol metadiphosphate as a constituent. J. Biol. Chem., 177 (2): 505-519, 1949.
10. MORRISON, R. T. & BOYD, R.N. Organic Chemistry. 3.ed. Boston, Allyn & Bacon, 1975.
11. HALMANN, M. Analytical chemistry of phosphorus compounds; chemical analysis. New York, Wiley-Interscience, 1972. v.37.
12. OLCOTT, H.S. & MATTILL, H. A. Antioxidants and the autoxidation of fats. IV. Lecithin as an antioxidant. Oil & Soap, 13 (4): 98-100, 1936.
13. WIESEHAHN, G.A. Soybean phosphatides and their uses. A review. Oil & Soap, 14 (5): 119-122, 1937.

14. SHOLFIELD, C.R., DUTTON, H.J., TANNER JR., F.R. & COWAN, J.C. Components of soybean lecithin. JAOCS, 25 (10): 368-372, 1948.
15. SCHOLFIELD, C.R. Composition of soybean lecithin. JAOCS, 58 (10): 889-892, 1981.
16. Mac LEAN, H. Composition of "lecithin" together with observations on the distribution of phosphatides in the tissues and methods for their extraction and purification. Biochem.J., 9: 351-378, 1915.
17. SCHOLFIELD, C.R. & DUTTON, H.J. Preparation of phosphatidyl ethanolamine from soybean phosphatides. J. Biol. Chem., 214 (2): 633-638, 1955.
18. SCHOLFIELD, C.R., DUTTON, H. J. & DIMLER, R.J. Carbohydrate constituents of soybean "lecithin". JAOCS, 29 (7): 293-298, 1952.
19. NIELSEN, K. The composition of the difficultly extractable soybean phosphatides. JAOCS, 37 (5): 217-219, 1960.

20. Van NIEUWENHUYZEN, W. Lecithin production and properties. JAACS, 53 (6): 425-427, 1976.
21. WOERFEL, J. B. Processing and utilization of by - products from soy oil processing. JAACS, 58 (3): 188-191, 1981.
22. WIEDERMANN, L. H. Degumming, refining and bleaching soybean oil. JAACS, 58 (3): 159-166, 1981.
23. HVOLBY, A. Removal of nonhydratable phospholipids from soybean oil. JAACS, 48 (9): 503-509, 1971.
24. SCOCCA, P. M. Utilization of lecithin. JAACS, 53 (6): 428-429, 1976.
25. MOUNTS, T. L., LIST, G. R. & HEAKIN, A. J. Postharvest handling of soybeans: effect on oil quality. JAACS, 56 (10): 883-885, 1979.
26. PREGNOLATTO, W. Soybean oil in Brazil and Latin America: uses, characteristics and legislation. JAACS, 58 (3): 247-249, 1981.
27. OHLSON, J. S. R. Processing effects on oil quality. JAACS, 53 (6): 299-301, 1976.

28. ROBERTSON, J.R., MORRISON, W.H. & BURDICK, D.
Chemical evaluation of oil from field - and
storage - damaged soybeans. JAOCS, 50 (11):
443-445, 1973
29. EVANS, C.D., LIST, G.R., BEAL, R.E. & BLACK, L.T.
Iron and phosphorus content of soybean oil
from normal and damaged beans. JAOCS, 51(10):
444-448, 1974.
30. LIST, G.R., EVANS, C.D., WARNER, K., BEAL, R.E.,
KWOLEK, W.F., BLACK, L.T. & MOULTON, K. J.
Quality of oil from damaged soybeans.
JAOCS, 54 (1): 8-14, 1977.
31. LIST, G.R., EVANS, C.D., BLACK, L.T. & MOUNTS, T.L.
Removal of phosphorus and iron by commercial
degumming of soybean oil. JAOCS, 55 (2):
275-276, 1978.
32. MYERS, N.W. Design and operation of a commercial
soybean oil refining plant, using acetic
anhydride as a degumming reagent. JAOCS, 34 (3):
93-96, 1957.

33. SLEETER, R. T. Effects of processing on quality of soybean oil. JAOCS, 58 (3): 239-241, 1981.
34. ROHR, R. Óleos e gorduras vegetais; seus subprodutos proteicos. 4. ed. São Paulo, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1978. 120 p.
35. JAMIESON, G.S. & Mc KINNEY, R.S. Phosphatides in American soybeans and oil. Oil & Soap, 12 (4): 70-72, 1935.
36. BURKHALTER, J. P. Processing vegetable fats and oils - crude oil handling and storage. JAOCS, 53 (6): 332-333, 1976.
37. BRAAE, B. Degumming and refining practices in Europe. JAOCS, 53 (6): 353-357, 1976.
38. BREKKE, O.L. Oil degumming and soybean lecithin cap. 6, p.71-88. In: Handbook of soy oil processing and utilization. St. Louis, Mo., Erickson Pryde Brekke, Am. Soybean Assoc., 1980.

39. CRAUER, L.S. Special techniques to optimize vegetable oil refining. New York, The Delaval Separator, presented at ISF World Congress, Goteburg, Sweden, June 1972 In: BREKKE (38).
40. SWERN, D. In: Bailey's industrial oil and fat products. 3 ed. New York, Interscience Publishers, 1964.
41. 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 oil. JAOCS, 55 (6): 521-522, 1978.
42. LIST, G.R., AVELLANEDA, J.M. & MOUNTS, T.L. Effect of degumming conditions on removal and quality of soybean lecithin. JAOCS, 58 (10):892-898, 1981.
43. THURMAN, B.F. U.S. Patent 2 150 732 (To Refining, Inc.), 1940. In: BREKKE (38).
44. MATTIKOW, M. Some recent developments in the refining of fatty oils. JAOCS, 37(5): 211-213, 1960.

45. RINGERS, H.J., U.S. Patent 4 049 686 (To Lever Brothers Company), 1977. In: BREKKE (38).
46. THURMAN, B.F. U.S. Patent 2 201 062 (To Refining, Inc.), 1940. In: BREKKE (38).
47. ANDERSEN, A.J.C. Refining of oils and fats for edible purposes. New York, Pergamon Press, 1962. p.28-42.
48. OHLSON, H. & SVENSSON, C. Comparison of oxalic acid and phosphoric acid as degumming agents for vegetable oils. JAOCS, 53 (1): 8-11, 1976.
49. LIST, G.R., MOUNTS, T.L. & HEAKIN, A.J. Steam - refined soybean oil: II - Effect of degumming methods on removal of prooxidants and phospholipids. JAOCS, 55 (2): 280-284, 1978.
50. NSPA. Yearbook and trading rules of the National Soybean Processors Association 1978-1979. Washington, 1978. In: BREKKE (38).
51. BEAL, R.E. LANCASTER, E.B. & BREKKE, O.L. The phosphorus content of refined oil as a criterion of quality. JAOCS, 33 (12): 619-624, 1956.

52. GOEBEL, E.H. New concepts of bleaching soy oil.
JAOCS, 58 (3): 199-200, 1981.
53. COWAN, J.C. Degumming, refining, bleaching and
deodorization theory. JAOCS, 53 (6): 344-346, 1976.
54. LIST, G.R., MOUNTS, T.L., WARNER, K. & HEAKIN, A.J.
Steam - Refined soybean oil: I - Effect of
refining and degumming methods on oil quality.
JAOCS, 55 (2): 277-279, 1978.
55. SULLIVAN, F.E. Steam refining. JAOCS, 53 (6):
358-360, 1976.
56. HAYES, L.P. & WOLFF, H. Novel method for refining
soybean oil. JAOCS, 33 (10): 440-442, 1956.
57. A.O.C.S. Official and tentative methods of the
American Oil Chemists' Society. Champaign, IL
(Revised to 1973) Official method Ja 4-46.
58. HARTMAN, L. About the conversion factor of
phosphorus to phosphatides in soybean oil.
JAOCS, 56 (10): 908, 1979.

59. A.A.C.C. American Association of Cereal Chemists.
Method 40-56. Phosphorus. Colorimetric
modified Fiske - Subbarow method. 1962.
60. ALLEN, R.J.L. The estimation of phosphorus.
Biochem. J., 34 (2): 858-865, 1940.
61. HARRIS, W.D. & POPAT, P. Determination of
phosphorus content of lipids. JAACS, 31 (4):
124-127, 1954.
62. WHARTON, H.W. Potential hazards of HClO_4 in heated
systems where esters are involved. JAACS, 51(2):
35-36, 1974.
63. A.O.C.S. Official and tentative methods of the
American Oil Chemists' Society. Champaign, IL
(Revised to 1973). Official method Ja 5-55.
64. THALER, H. & JUST, K. Fette u. Seifen, 51:55, 1944.
In: NIELSEN (7).
65. A.A.C.C. American Association of Cereal Chemists.
Method 40-55. Phosphorus - colorimetric, acetate
ashing method. 1962.

66. HARDWICK, P.J. Colorimetric estimation of phosphorus by reduction of phosphomolybdate to molybdenum blue. Analyst, 68: 183-184, 1943.
67. STICH, C. Accurate colorimetric determination of small quantities of phosphorus dissolved in oil. Chem. Abstr., 21: 3856, 1927
68. OVCHARENKO, V.E. & NECHAEVA, A.V. Photometric determination of the amount of phosphatides in vegetable oils. Chem.Abstr., 78:109519, 1973.
69. HARTMAN, L., CARDOSO ELIAS, M. & ESTEVES, W. Method for the determination of phosphorus in lipids and lipid-containing materials. Analyst, 105 (2): 173-176, 1980.
70. MERKEL, A. The determination of phosphorus by the X-Ray by photometric titration. Chem. Abstr., 30: 1326, 1936.
71. VRIES, J. L.de. Experiences with an X-Ray fluorescence vacuum spectrograph. Chem. Abstr., 60: 8621, 1964.

72. PREVOT, A. & GENTE-JAUNIAUX, M. Dosage rapide du phosphore dans les corps gras par absorption atomique sans flamme. Rev. Fr. Corps Gras, 24 (10): 493-496, 1977.
73. FREYER, E. & SHELBURNE, V. The centrifugal acetone foots test applied to crude soybean oil. Rapid estimation of phosphatide content. JAACS, 28 (9): 393-395, 1951.
74. PARDUN, H. Neuberechnung der zur Bestimmung des Phosphatidgehaltes benötigten Umrechnungsfaktoren. Fette - Seifen - Anstrichmittel, 83 (6): 240-242, 1981.
75. SCHOLFIELD, C.R., McGUIRE, T.A. & DUTTON, H. J. Comparative composition of soybean and corn phosphatides. JAACS, 27 (9): 352-355, 1950.
76. PARDUN, H. Analytische Methoden zur Qualitätsbeurteilung von Sojalecithin. Fette - Seifen - Anstrichmittel, 66 (6): 467-476, 1964.

77. CHAPMAN Jr., G.W.A. Conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. JAACS, 58 (9): 873-875, 1981.
78. SINGLETON, J.A. & PATTEE, H.E. Computation of conversion factors to determine the phospholipid content in peanut oils. JAACS, 58 (9): 873-875, 1981.
79. OHLSEN, E.D. Modern optical methods of analysis. New York, Mc Graw-Hill, 1975. cap. 11, p.451-462.
80. OHLWEILER, O.A. Química analítica quantitativa. 2ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 3, p. 759-763.
81. PICKERING, W.F. Modern analytical chemistry. New York, Marcel Dekker, 1971. p.244-247.
82. VOGEL, A.J. A text-book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis. 3 ed. London, Longmans Green, 1961. cap. 12, p. 847-853.

83. DELAHAY, P. Analysis instrumental. 3ed. Madrid, Paraninfo, 1970. p. 304-306.
84. CALDER, A.B. Photometric methods of analysis. London, Adam Hilger, 1969. p.180-182.
85. EWING, G.W. Métodos instrumentais de análise química. São Paulo, Edgard Blücher, 1972. v.1, p. 129-133.
86. KENNER, C.T. Instrumental and separation analysis. Columbus, Bell and Howell Company, 1973. p.40.
87. SCHENK, G.H., HAHN, R.B. & HARTKOPF, A.V. Quantitative analytical chemistry; principles and life science applications. 2.ed. Boston, Allyn and Bacon, 1977. p. 360-362.
88. SKOOG, D.A. & WEST, D.M. Principles of instrumental analysis. New York, Holt, Rinehart and Winston, 1971. cap. 9, p.243-247.
89. STROBEL, H.A. Chemical instrumentation. California, Addison-Wesley, 1973. cap. 20, p.581-585.

90. SNELL, F.D. & SNELL, C.T. Colorimetric methods of analysis; including some turbidimetric and nephelometric methods. 3.ed. New York, D. von Nostrand, 1948. v.1, p. 115-123.
91. HELLER, W. & TABIBIAN, R.M. Experimental investigations on the light scattering of colloidal spheres. II. Sources of error in turbidity measurements. J. Colloid Science, 12: 25-39, 1957.
92. A.O.C.S. Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society. Champaign, IL (Revised to 1973). Official method Aa 6-38.
93. A.O.C.S. Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society. Champaign, IL (Revised to 1973). Official method Cd 1-25.
94. A.O.C.S. Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society. Champaign, IL (Revised to 1973). Official method Cd 3-25.
95. HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Practice, 22 (8): 475-476, 1973.