

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

“OBTENÇÃO DE CONCENTRADO DE TOCOFERÓIS A PARTIR DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA”

MARIA EUGENIA MARQUES DE ALMEIDA

Engenheira de Alimentos

**Prof. Dr. OLAVO RUSIG
ORIENTADOR**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria Eugenia Marques de Almeida, aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de junho de 2000.

Campinas, 27 de junho de 2000.


Prof. Dr. Olavo Rusig
Presidente da Banca

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP
para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos**

Campinas - SP - 2000



UNIDADE 80
 N.º CHAMADA:
TI/UNICAMP
AL640
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 42191
 PROC. 16-278100
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 01,00
 DATA 29/09/00
 N.º CPD

CM-00144808-9

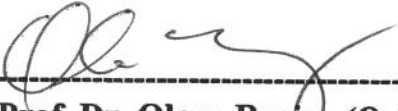
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

AL640 Almeida, Maria Eugenia Marques de
 Obtenção de concentrado de tocoferóis a partir do destilado
 da desodorização do óleo de soja / Maria Eugenia Marques de
 Almeida. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Olavo Rusig
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

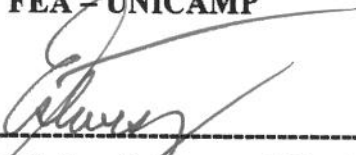
1. Vitamina E. 2. Extração (Química). 3. Óleo de soja. I. Rusig,
 Olavo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



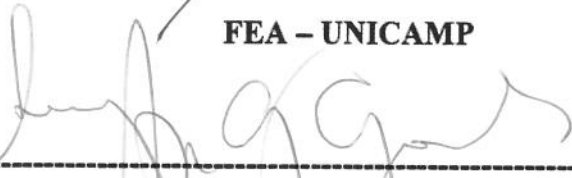
Prof. Dr. Olavo Rusig (Orientador)

FEA - UNICAMP



Prof. Dr. Walter Esteves (Membro)

FEA - UNICAMP



Profa. Dra. Lireny Guaraldo Gonçalves (Membro)

FEA - UNICAMP



Profa. Dra. Maria Isabel Felisberti (Membro)

IQ - UNICAMP



Dra. Rosemar Antoniassi (Membro)

CTAA - EMBRAPA

Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho (Membro)

ITAL

Dr. Alfredo Almeida Vitali (Membro)

ITAL

Dedico este trabalho à

Maria Grosselli Scuráchio

Maria Cândida Grosselli Machado

Eva Angelica Kauffman Klein

Marli Silveira Rocha

e

Beatriz de Dante

***pelo amor incondicional que me
deram durante sua existência.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Olavo Rusig, de modo especial, agradeço pela orientação desta tese, pela sugestão do tema, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Emílio Contreras Guzmán cuja experiência científica, tornaram possível a execução desta pesquisa, pela concessão das análises de tocoferóis por CLAE e pela amizade.

À todos os Professores e Pesquisadores, cuja experiência e colaboração foram preciosas durante o desenvolvimento desta pesquisa, em especial ao Prof. Dr. Walter Esteves, pelas valiosas sugestões para a condução dos experimentos, pelo encorajamento e pela amizade.

À Dra. Maria Isabel Felisberti pela valiosa colaboração na redação da tese, disposição ilimitada em ajudar, incentivo, encorajamento e especialmente pela amizade, que tornou possível o término deste trabalho de pesquisa.

À Profª. Dra. Lireny Gonçalves, pela autorização do uso do Laboratório de Tecnologia de Óleos e Gorduras-DTA, pelas valiosas sugestões na correção da dissertação, pela amizade, paciência e atenção.

Ao Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho, do Centro de Química-ITAL, assim como a Marta e Eny pela colaboração na realização das determinações por cromatografia líquida de alta eficiência.

À Dra. Rosemar Antoniassi pelo auxílio durante o meu trabalho no Lab. Tec. Óleos e Gorduras, pela revisão e correção da dissertação e pela amizade.

Ao colega e amigo Dr. Alfredo Vitali pelo estímulo e incentivo.

Aos Professores e Pesquisadores Membros da Banca Examinadora, pela revisão e correção desta tese, aperfeiçoando-a de modo expressivo.

Ao Dr. Renato Grimaldi, pela amizade, inestimável assistência, valiosas sugestões no decorrer desta pesquisa, revisão e correção da dissertação.

À Rosana do Lab. Tec. Óleos e Gorduras pela realização das determinações de ácidos graxos pelo auxílio durante minha estadia no laboratório, pela paciência e atenção.

Ao Sr. Gil Barros e Eng Sato da empresa HENKEL pela concessão das análises de composição em tocoferóis e esteróis por cromatografia gasosa.

As empresas CARGIL, CEVAL, SAMBRA e MINASA, pela gentileza em doarem a matéria-prima utilizada neste trabalho.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Zeno José De Martin, pela elaboração do Abstracts, pelo incentivo, encorajamento e inestimável amizade.

À chefia do FRUTHOTEC – ITAL, pela concessão de afastamento parcial durante a realização da parte experimental.

Ao pessoal ligado do Laboratório de Tecnologia Geral, Ana Maria, Alice, Ana Lourdes, Nelson, pela colaboração, paciência, cordialidade, amizade e bons momentos de convivência.

À Marlene, secretária do DTA, por sempre ter sido muito prestativa.

Aos amigos e colegas que trouxeram alegria e conforto em diversos momentos, em especial: Ana Lúcia, Márcia, Marcinha, Flávia Belarde, Marília, Niurka, Carlos Prentice, Walter Cuba, José Ricardo, João, Erna, Maria Sebastiana, Cris, Mara, Ivone, Ruth e Ana Cecília.

À Janice, Martha, Renata, Genoveva e Maria Célia, pela amizade, sugestões no decorrer deste trabalho, compreensão e valioso incentivo.

Ao Dr. Hélio por compartilhar os árduos momentos desta jornada.

À amiga Judite pela colaboração técnica e amizade, tão necessária para superar as dificuldades experimentadas durante a realização desta pesquisa.

Aos entes queridos que já se foram, especialmente à vovó Maria, a prima Maria Cândida, a minha “mãe adotiva” Eva, e a Marli que durante 23 anos demonstrou ter sido minha melhor amiga e irmã espiritual, quero aqui expressar a minha crença de estar compartilhando convosco, na eternidade, esta conquista tão importante em minha vida terrena..

As minhas tias, Lídia, Arlete, Nininha, Hilza, Nelly, Marília e Zezé, pelos votos de uma bem sucedida conclusão deste trabalho, pela preocupação com o meu bem estar e pelo carinho.

Aos meus queridos pais, Odila e Antonio Francisco, e ao meu irmão Téo que compreenderam o significado deste trabalho para mim, tolerando minha frequente ausência e me dando amor, incentivo e apoio.

Assim, agradecemos a todos que, direta ou indiretamente, nos propiciaram este crescimento profissional e pessoal, mesmo sabendo de antemão que podemos esquecer alguém.

A AUTORA.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	vi
RESUMO.....	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A Produção de Soja e Seus Derivados	3
2.2 O Refino do Óleo de Soja	6
2.3 Composição do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja	11
2.4 Tocoferóis	20
2.4.1 Propriedades Físico-Químicas e Estabilidade dos Tocoferóis	23
2.4.2 Função Antioxidante dos Tocoferóis	24
2.4.3 Aplicações dos Tocoferóis em Alimentos	27
2.4.4. Metabolismo e Função da Vitamina E em Humanos	31
2.4.5 Aspectos Nutricionais e da Legislação	34
2.5. Métodos para Obtenção do Concentrado de Tocoferóis	37
2.5.1 Extração Fracionada	38
a) Extração Líquido-Líquido	38
b) Cristalização Fracionada	39
c) Destilação Molecular	42
d) Extração Supercrítica	43
2.5.2 Tratamentos Químicos	46
a) Esterificação	46
b) Processo com Uréia	47
c) Saponificação	48
2.5.3 Cromatografia	52
2.5.4 Combinação de Várias Técnicas	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1 Materiais	56
3.1.1 Matéria - Prima	56
3.1.2 Reagentes	56
3.1.3 Instrumental	57

3.2 Métodos Analíticos	57
3.3 Procedimento Experimental para Obtenção do Concentrado de Tocoferóis	60
3.3.1 Monitoramento do Processo	60
3.3.2 Parâmetros para a Avaliação dos Ensaios	60
3.3.3 Extração por Cristalização Isotérmica	68
3.3.4 Emprego da Saponificação na Obtenção de Concentrados de Tocoferóis	68
3.3.4.1 Procedimento Básico para Efetuar a Extração de Tocoferóis do DDOS	68
3.3.4.2 Influência da Adição de Hidróxido de Cálcio na Extração dos Tocoferóis	70
3.3.4.3 Influência da Composição da Solução Acetona:Água na Extração dos Tocoferóis	70
3.3.4.4 Influência da Temperatura na Extração dos Tocoferóis	71
3.3.5 Emprego da Saponificação Seguida de Cristalização Isotérmica em Diversos Solventes	71
3.3.6 Emprego da Extração Líquido-Líquido Seguida de Cristalização Isotérmica	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1 Caracterização da Matéria - Prima	76
4.2 Extração de Tocoferóis por Cristalização Isotérmica	85
4.3 Emprego da Saponificação na Obtenção de Concentrados de Tocoferóis	95
4.3.1 Influência da Adição de Hidróxido de Cálcio na Extração dos Tocoferóis	95
4.3.2 Influência da Composição da Solução Acetona:Água na Extração dos Tocoferóis	101
4.3.3 Influência da Temperatura na Extração dos Tocoferóis	107
4.4 Emprego da Saponificação Seguida de Cristalização Isotérmica em Diversos Solventes	114
4.5 Emprego da Extração Líquido-Líquido Seguida de Cristalização a Baixa Temperatura	119
4.6 Avaliação dos Procedimentos para a Obtenção do Concentrado de Tocoferóis	122
5. CONCLUSÕES	124
6. SUGESTÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ANEXOS	141

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos principais esteróis presentes no óleo de soja e no DDOS	18
Figura 2: Estrutura química dos tocoferóis	21
Figura 3: Estrutura química dos tocotrienóis.....	22
Figura 4: Esquema da reação de oxi-redução do ácido ascórbico e tocoferol	33
Figura 5 : Fluxograma da extração de tocoferóis por cristalização isotérmica em solventes diversos.....	63
Figura 6: Esquema da unidade de cristalização a baixa temperatura.....	64
Figura 7: Esquema da unidade de cristalização isotérmica, a baixa temperatura.....	65
Figura 8: Fluxograma básico do processo de extração de tocoferóis por saponificação	65
Figura 9: Fluxograma do procedimento para a extração por saponificação em hexano seguida de cristalização isotérmica em hexano, acetona ou metanol.....	73
Figura 10: Fluxograma do processo de extração de tocoferóis por extração líquido-líquido seguida de cristalização em acetona	75
Figura 11: Fator de concentração teórico de tocoferóis totais	83
Figura 12: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -20°C, em diversos solventes, com 20% de DDOS	86
Figura 13: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -20°C, em diversos solventes, com 16,7% de DDOS.	88
Figura 14: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -80°C, em diversos solventes, com 10% de DDOS	90
Figura 15: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -80°C, em hexano para diversas concentrações de DDOS	93
Figura 16: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de Ca(OH) ₂ empregando-se solução com 10% de DDOS (% m/v) a 0°C	95
Figura 17: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de Ca(OH) ₂ empregando-se solução com 15% de DDOS (% m/v) a 0°C	96

Figura 18: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 empregando-se solução com 20% de DDOS (% /v) a 0°C	97
Figura 19: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 empregando-se solução com 25% de DDOS (% m/v) a 0°C	98
Figura 20: Fração de sólidos removidos em função da concentração de DDOS e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 para soluções de acetona/água nas concentrações 92,5 e 100% de acetona a 0°C	99
Figura 21: Fração de tocoferóis recuperados em função da concentração de DDOS e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 para soluções de acetona/água nas concentrações 92,5 e 100% de acetona a 0°C	99
Figura 22: Fator de concentração dos tocoferóis em função da concentração de DDOS e da composição da solução acetona:água na extração por saponificação à 0°C.	102
Figura 23: Sólidos removidos em função da concentração de DDOS e da composição da solução acetona:água na extração por saponificação à 0°C	103
Figura 24: Recuperação dos tocoferóis em função da concentração de DDOS e da composição da solução acetona:água na extração por saponificação à 0°C	104
Figura 25: Fator de concentração dos tocoferóis totais em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se solução acetona:água 92,5%.	108
Figura 26: Fração de sólidos removidos em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se solução acetona:água 92,5%.	108
Figura 27: Recuperação de tocoferóis em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se solução acetona:água 92,5%.	110
Figura 28: Fator de concentração dos tocoferóis totais em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação	110
Figura 29: Fração de sólidos removidos em função da temperatura e da concentração do DDOS empregando-se acetona na extração por saponificação.	112
Figura 30: Recuperação de tocoferóis em função da temperatura e da concentração do DDOS empregando-se acetona na extração por saponificação	112
Figura 31: Fração de sólidos removidos em função dos sólidos passíveis de remoção para DDOS a 5% com saponificação seguida de cristalização em diversos solventes à -20°C	115

Figura 32: Fator de concentração dos tocoferóis em função dos sólidos removidos para DDOS a 5% com saponificação seguida de cristalização em diversos solventes à -20°C	116
Figura 33: Fator de concentração dos tocoferóis em função da concentração do DDOS em acetona e hexano com saponificação seguida de cristalização em diversos solventes à -20°C	117
Figura 34: Sólidos removidos em função da concentração do DDOS em acetona e hexano com saponificação seguida de cristalização em diversos solventes à -20°C	118
Figura 35: Percentagem de sólidos removidos em função dos sólidos passíveis de remoção por extração líquido-líquido em hexano e etanol seguido de cristalização em hexano e etanol-27°C	120
Figura 36: Fator de concentração dos tocoferóis em função da percentagem de sólidos por extração líquido-líquido em hexano e etanol seguido de cristalização em acetona a -27°C	121

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1: Produção, consumo , exportação e estoque final da soja em grãos no período de 1995 a 1999 (mil toneladas métricas).....	5
Tabela 2: Produção, consumo , exportação e estoque final de óleo soja no Brasil no período de 1995 a 1999 (mil toneladas métricas).....	6
Tabela 3: Parâmetros para a desodorização de óleo de soja.....	9
Tabela 4: Composição média do óleo de soja bruto e refinado.....	10
Tabela 5: Especificações para o óleo de soja refinado estabelecidas pelo National Soybean Processors Association.....	10
Tabela 6: Características e composições do DDOS.....	12
Tabela 7: Teor de tocoferóis totais em óleo de soja em diversas etapas do refino.....	14
Tabela 8: Composições em ácidos graxos totais do óleo de soja bruto e do DDOS.....	15
Tabela 9: Solubilidade dos ácidos graxos presentes no DDOS.....	16
Tabela 10: Nomenclatura de compostos tocoferóis e tocotrienóis que ocorrem na natureza.....	22
Tabela 11: Vantagens e desvantagens do uso de antioxidantes naturais em relação aos antioxidantes sintéticos.....	24
Tabela 12: Composição de alguns concentrados de tocoferóis atualmente comercializados.....	32
Tabela 13: Histórico da IDR de vitamina E estabelecida pela NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES dos EUA.....	37
Tabela 14: Atividade biológica dos diversos tocoferóis.....	38
Tabela 15: Ingestão diária recomendada de vitamina E estabelecida pela NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES dos EUA.....	39
Tabela 16: Lista de alimentos e limite máximo permitido para uso de tocoferóis regulamentado pela legislação brasileira.....	40
Tabela 17: Solubilidade de sais de cálcio de ácidos graxos.....	50
Tabela 18: Solventes e concentrações das diversas soluções DDOS empregadas nos ensaios de cristalização nas temperaturas de -20 e -80°C.....	66
Tabela 19: Solventes e misturas azeotrópicas empregadas nos ensaios de extração de tocoferóis por cristalização isotérmica.....	67

Tabela 20: Principais características físicas e químicas e a composição percentual das três amostras de DDOS avaliadas	77
Tabela 21: Tocoferóis totais e individuais das três amostras de DDOS determinados por CLAE em coluna de sílica Si-60	78
Tabela 22: Principais características físicas e químicas e composição percentual do DDOS	80
Tabela 23: Composição percentual dos tocoferóis e esteróis do DDOS por cromatografia gasosa e por CLAE em coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300	81
Tabela 24: Composição em porcentagem dos ácidos graxos totais do DDOS	82
Tabela 25: Influência do teor de Ca(OH)_2 no fator de concentração e na recuperação dos tocoferóis empregando-se DDOS 20%, solução acetona:água na concentração 92,5 de acetona a 0°C.	101
Tabela 26: Tocoferóis totais e individuais determinados por CLAE* dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação para avaliação da influência da composição da solução Acetona:Água.	107
Tabela 27: Influência da temperatura na extração dos tocoferóis por saponificação empregando-se solução acetona:água na concentração 95% de acetona.	111
Tabela 28: Tocoferóis totais e individuais determinados por CLAE* dos concentrados obtidos por saponificação solução acetona:água na concentração 92,5% a -20°C.	113
Tabela 29: Seleção dos melhores resultados obtidos para os valores do Fator de Concentração (FC) dos ensaios realizados no estudo.	123

RESUMO

O destilado da desodorização do óleo de soja, o DDOS, um subproduto do refino deste óleo, é formado por uma mistura complexa de compostos incluindo os tocoferóis. Portanto, é usado como matéria-prima para a obtenção de concentrados de tocoferóis ou vitamina E, para uso farmacêutico, cosmético e alimentício. Assim sendo este trabalho de pesquisa teve por objetivo o desenvolvimento de procedimentos para obtenção de um concentrado de tocoferóis a partir do DDOS. No decorrer do estudo empregou-se várias técnicas para a obtenção do concentrado de tocoferóis: extração por cristalização isotérmica em diversos solventes e misturas azeotrópicas destes; emprego da saponificação com hidróxido de cálcio; saponificação seguida de cristalização isotérmica em diversos solventes e extração líquido-líquido seguida de cristalização. O DDOS estudado apresentou-se como uma fonte potencial para a extração de tocoferóis, com cerca de 11% de tocoferóis totais e o γ -tocoferol representando cerca de 62% do total. O método de cristalização isotérmica (-20°C) com DDOS 20% e acetona resultou em concentração dos tocoferóis próxima ao valor teórico (1,35), porém a remoção de sólidos (27,8%) apresentou-se pouco eficiente. A mistura azeotrópica Etanol:Metil Etil Cetona empregada nas mesmas condições, proporcionou uma concentração dos tocoferóis (1,25) próxima ao valor teórico e 37,7% de sólidos removidos. O mesmo método conduzido a -80°C , DDOS a 10% e uso de acetona, apresentou uma alta taxa de remoção de sólidos (64,4%) e o maior fator de concentração dos tocoferóis (1,47). Com o uso de hexano e DDOS a 15 e 20% obteve-se uma elevada porcentagem de sólidos removidos, acima de 70%, porém, com baixo fator de concentração. No método de extração por saponificação avaliou-se a influência do hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), da composição da solução acetona:água, da percentagem de DDOS e da temperatura na

extração dos tocoferóis. Os processos com Ca(OH)_2 na concentração de 15g/L à 0°C e solventes com 85 a 92,5% de acetona resultaram na maior influência da saponificação na extração dos tocoferóis. Na avaliação da influência da composição do solvente acetona:água na saponificação (Ca(OH)_2 a 15g/L), os ensaios com emprego solvente com acetona na faixa de 90 a 95%, conduzidos a 0°C e com DDOS a 20 e 25% resultaram em um fator de concentração duas vezes superior ao dos demais ensaios. A influência da temperatura na saponificação foi mais acentuada para a relação acetona:água 92,5%, nas condições de temperatura a -20°C e DDOS a 20%, obteve-se um concentrado com 26,5% de tocoferóis. Das diversas concentrações de Ca(OH)_2 avaliadas, a mais eficiente foi 16g/L, apresentando fator de concentração 2,5 e 51% de sólidos removidos. O método de extração empregando-se a saponificação com Ca(OH)_2 (1% m/v) seguida de cristalização a -20°C, com acetona e DDOS a 5%, obteve-se 72% de sólidos removidos e fator de concentração 2,5, ambos superiores ao obtido com hexano e metanol. O método de extração líquido-líquido foi conduzido com solução hexânica de DDOS (25% m/v) e solução de etanol a 50% com 1% de KOH, na relação (solução hexânica/solução etanólica) 1,00:1,93 (v/v), seguido de cristalização à -27°C. Obteve-se 68,4% de sólidos removidos, porém, baixo fator de concentração dos tocoferóis (1,52). Dentre todos os métodos propostos, o mais indicado, em termos de fator de concentração de tocoferóis, foi a saponificação com Ca(OH)_2 (15g/L), solução de acetona:água a 92,5%, concentração de DDOS a 20% e temperatura a -20°C, resultando em um concentrado com cerca de 26% de tocoferóis.

Palavras-chave: Vitamina E, Extração (Química), Óleo de soja.

SUMMARY

The deodorizer distilled, a refining by product of soybean oil, the DDOS, is a highly complex compounds mixture, including the tocopherols. That is the reason it is largely used as a raw material to obtain tocopherols or vitamin E concentrates, as much as in chemist, cosmetic and food industries. The main objective of this present research work was the development of methods to obtain a tocopherol concentrate. Several techniques have been employed for tocopherol extraction as follow: isothermal crystallization with different solvents and their azeotropic mixtures, saponification with calcium hydroxide, saponification plus isothermal crystallization. The DDOS evaluated contained about 11% tocopherols, mainly γ -tocopherol, being a suitable source of this compound. In the extractions by isothermal crystallization at -20°C with 20% DDOS in acetone, have given a tocopherol concentration factor close to theoretical value (1,35), whereas the removed solids rate was quite low (27,8%). Regarding the azeotropic mixture of solvents, ethanol:methyl-ethyl-cetone, under the same conditions, also, showed results close to theoretical value, with concentration factor of 1,25 for and 37,7% removed solids. The crystallization method, but at -80°C with 10% of DDOS, including acetone, have shown a very high rate of removed solids (64,4%) and also the highest concentration factor (1,47). The same process, but employing hexane plus and DDOS at 15 and 20% also indicated a very high percentage of removed solids (above 70%), but a low concentration factor. In the use of saponification method the influence of $\text{Ca}(\text{OH})_2$; acetone and water solutions; percentage of DDOS and extraction temperature have been evaluated. The process using solvents with 85 to 92,5% of acetone at 0°C resulted in highest saponification influence in tocopherol extraction. Also the saponification with

a 15g/L Ca(OH)_2 at 0°C plus DDOS at 20 and 25% in acetone (90 and 95%) produced a concentration factor twice as much as the other methods. Among several concentrations of Ca(OH)_2 evaluated the most efficient was 16g/L showing a concentration factor of 2,5. The temperature influence in saponification was higher at -20°C, 92,5% acetone plus 20% DDOS, resulting in a final product with 26,5% tocopherol. The method employing saponification with Ca(OH)_2 (1%w/v) followed by crystallization at -20°C, 5% DDOS and acetone produced a high solids removing result (72%) and concentration factor (2,51), better than hexane and methanol. The liquid-liquid extraction method was carried out through hexane DDOS solution (25%w/v) plus ethanol solution at 50% with 1% of KOH, in the following preparation: hexane/ethanol at 1,00/1,93. Next step, isothermal crystallization at -27°C° was of good efficiency in solids removing (68,4) but low concentration factor (1,52). The studies have demonstrated that the most efficient method to obtain tocopherol concentrate was saponification with Ca(OH)_2 (15g/L) of a 20% DDOS in a 92,5% acetone:water solution at -20°C°, which carried out to a final concentrate of 26% tocopherol.

KEU WORDS: Vitamin E, Tocopherols, Deodorizer Distillate, Soybean Oil, Extraction.

1 - INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais produzidos para fins alimentícios passam por processos de refino que consistem basicamente em degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização. Os subprodutos resultantes das diversas etapas de refino, desde que eficientemente recuperados e processados adequadamente podem alcançar alto valor comercial.

Um dos subprodutos do refino do óleo de soja, o destilado da desodorização (DDOS), que corresponde de 0,1% a 0,4% da massa do óleo original, é composto por ácidos graxos, esteróis, tocoferóis, ésteres de esteróis, hidrocarbonetos, compostos originados da quebra de ácidos graxos, aldeídos, cetonas dentre outros.

Este material é comercializado com base no seu conteúdo em tocoferóis, na faixa de 0,8 a 10% , possuindo valor tanto pela sua atividade em vitamina E, quanto pelas propriedades antioxidantes.

Os tocoferóis são extremamente importantes na nutrição humana e animal por apresentarem atividade de vitamina E. Além disso, possuem aplicação tecnológica em alimentos pois são antioxidantes naturais, prevenindo ou retardando a rancidez oxidativa de óleos e também de alimentos com alto teor de lipídeos.

Somando-se a isto, há uma tendência atual no aumento da preferência ao uso de antioxidantes e vitaminas naturais. A vitamina E natural leva a vantagem em relação à produzida sinteticamente por possuir potência biológica mais elevada.

Atualmente o destilado da desodorização é exportado como um subproduto e retorna ao Brasil na forma de um produto de alto valor comercial, os concentrados de tocoferóis ou vitamina E, para uso pela indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e de rações.

A produção nacional de soja em grãos em 98/99 atingiu a média de 29,5 milhões de toneladas métricas. Processou-se em 1998, aproximadamente 7,5 milhões de toneladas de óleo bruto a partir desta leguminosa (AGRIANUAL, 1999).

A dimensão do volume do destilado da desodorização do óleo de soja no país permite a produção de tocoferóis em quantidade suficiente para suprir a demanda interna por vitamina E.

O Brasil, embora seja um país potencialmente rico em fontes de tocoferóis, não dispõe de tecnologia adequada para sua produção industrial. A tecnologia para recuperação de tocoferóis a partir do destilado da desodorização pertence a empresas multinacionais e é mantida como segredo industrial ou patenteada pelas mesmas.

A disponibilidade no país de matéria-prima de baixo custo torna de interesse econômico sua transformação para a produção de tocoferóis justificando assim a pesquisa para sua obtenção.

Assim sendo, este trabalho de pesquisa teve por objetivo o desenvolvimento de procedimentos viáveis para obtenção de um concentrado de tocoferóis a partir do destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) e caracterização do concentrado obtido.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Produção de Soja e Seus Derivados

A soja percorreu um longo caminho até chegar aos dias de hoje, sendo originária da China onde já era conhecida desde 2000 a.C. Passaram-se alguns milênios até apresentar importância como alimento no ocidente, sendo que atualmente a soja consiste em uma das maiores fontes mundiais de óleo comestível de origem vegetal (FUNDAÇÃO CARGIL).

O histórico resumido da soja no Brasil inicia-se com o registro do primeiro plantio em 1882, na Bahia. Em 1889 o Instituto Agrônomo de Campinas - S.P. apresentou o primeiro artigo técnico desta cultura. Após muitas décadas, em 1941 a soja finalmente entrou na estatística agrícola do Rio Grande do Sul e em 1945 no estado de São Paulo. Já no ano de 1950, a produção nacional da soja em grãos foi de 34.429 toneladas e o início da produção de óleo de soja data de 1952, em uma fábrica de Pelotas - RS (HASSE, 1996).

De acordo com o mesmo autor, o cultivo da soja deu origem a uma dupla modernização do Brasil, primeiramente fazendo-o voltar-se para dentro de si mesmo, iniciando a exploração de grandes regiões no interior do país principalmente nos cerrados do Centro-Oeste. Por outro lado, esta cultura obrigou o país a se organizar melhor para operar eficientemente no mercado internacional.

A soja revolucionou a agricultura brasileira, fortaleceu e diversificou a agroindústria, gerando um complexo empresarial que engloba propriedades agrícolas, indústrias e estabelecimentos comerciais. Também sustentou a ampliação da

suinocultura e da avicultura, além de motivar a modernização da infra-estrutura de transporte e portuária, abrindo oportunidade de empregos e gerando substanciais recursos ao país (FUNDAÇÃO CARGIL).

Desde 1973, quando ocorreu o "boom" dos preços da soja no mercado internacional e por vários anos seguidos com preços altos, a produção mundial de soja cresceu substancialmente, estimando-se em 154 milhões de toneladas a safra de 1998/99 (SOJA, 1999). Desse total, os Estados Unidos participam com 50% e o Brasil, o segundo colocado, com cerca de 19%. No Brasil, passamos de uma produção de 26,8 milhões de toneladas em 1996/97, para cerca de 31 milhões de toneladas em 1997/98, como se vê na **Tabela 1**.

As previsões de oferta e demanda mundiais para o complexo soja, em 1999, apontam no sentido de estoques mundiais recordes. Se for efetivada a produção mundial prevista em 156 milhões de toneladas para um consumo estimado em 150 milhões de toneladas, os estoques mundiais poderão ultrapassar o valor de 25 milhões de toneladas, conseqüentemente imprimindo uma tendência baixista aos preços de todo o complexo (PEETZ, 1998; SOYA BLUEBOOK PLUS, 1998).

Quando se fala em produção de soja em grãos e óleo de soja, os valores são da ordem de grandeza de bilhões de dólares, haja visto ser o Brasil o segundo produtor mundial deste grão (AGRIANUAL, 1999).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Óleos Vegetais (ABIOVE), as exportações brasileiras do Complexo da Soja movimentaram em 1998 cerca de US\$4,8 bilhões. Montante este, embora inferior ao recorde de US\$5,7 bilhões de 1997, apresenta-se como o segundo melhor da história no país (PEETZ, 1998).

Tabela 1: Produção, consumo , exportação e estoque final da soja em grãos no período de 1995 a 1999 (mil toneladas métricas).

		1995/96	1996/97	1997/98	1998/99 *
PRODUÇÃO	Mundial	124.957	131.680	156.500	153.952
	Estados Unidos	59.243	64.837	74.224	76.877
	Brasil	24.150	26.800	31.000	29.500
CONSUMO	Mundial	129.857	134.210	150.324	149.057
	Estados Unidos	40.318	42.497	48.538	47.911
	Brasil	21.702	20.560	22.250	22.275
EXPORTAÇÃO	Mundial	32.051	38.873	40.086	37.471
	Estados Unidos	23.165	23.999	23.677	23.133
	Brasil	3.633	8.340	9.300	8.400
ESTOQUE FINAL	Mundial	8.593	6.856	10.559	15.600
	Estados Unidos	4.993	3.576	5.700	11.705
	Brasil	276	266	1.325	515

*Valor estimado

Fonte: AGRIANUAL (1999)

Com base na produção do óleo bruto de soja (**Tabela 2**) podemos estimar a disponibilidade do resíduo da desodorização do óleo existente no país, que consiste na matéria-prima para a extração de vitamina E dentre outros compostos. Se for levado em consideração que este resíduo representa no mínimo 0,1% do óleo bruto original, ter-se-ia no ano de 1998/99 pelo menos cerca de 3.800 toneladas de matéria-prima.

Tabela 2: Produção, consumo, exportação e estoque final de óleo soja no Brasil no período de 1995 a 1999 (mil toneladas métricas).

	1995/96	1996/97	1997/98	1998/99 *
PRODUÇÃO	3.749	3.502	3.805	3.804
CONSUMO	2.600	2.660	2.685	2.560
EXPORTAÇÃO	1.350	1.076	1.275	1.365
ESTOQUE FINAL	198	164	209	324

Fonte: AGRIANUAL (1999)

2.2 - Refino do Óleo de Soja

O óleo de soja bruto, assim como a maioria dos óleos de outras fontes vegetais, possuem compostos indesejáveis que podem ser prejudiciais à estabilidade oxidativa e à qualidade final do produto. Dentre estas impurezas podemos citar as principais que são: ácidos graxos livres, glicerídeos parciais, fosfolipídeos, esteróis, açúcares, compostos oxidados, umidade, pigmentos e cêras. Para a eliminação de todas estas impurezas emprega-se o refino do óleo que consiste numa sequência de operações (ERICKSON,1983).

O refino químico é o mais usado, por ser um processo bastante conhecido e versátil podendo ser aplicado a uma grande gama de óleos. Inicia-se com a etapa de degomagem com água seguida da neutralização alcalina, branqueamento e desodorização (KIM et al., 1985).

Na etapa da degomagem ocorre a remoção dos fosfatídeos hidratáveis e de mucilagens. Em seguida, a neutralização com

soda cáustica remove os ácidos graxos livres, metais, clorofilas e outros pigmentos, os fosfatídeos não hidratáveis residuais e parte dos tocoferóis, formando uma borra que é removida por centrifugação. O óleo neutro é, então, lavado para a remoção dos sabões residuais e em seguida centrifugado (GUNSTONE,1983).

A etapa seguinte é o branqueamento onde são removidos os pigmentos como clorofilas, carotenóides, além de fosfolipídeos, peróxidos e sabões. Emprega-se terra branqueadora que no fim da etapa é separada do óleo por filtração (GUNSTONE,1983).

A próxima etapa, a desodorização, tem por finalidade remover os compostos voláteis responsáveis pelo sabor e odor indesejáveis do óleo de soja, ocorre a remoção também dos ácidos graxos livres, pesticidas, pigmentos, tocoferóis e esteróis (FORSTER e HARPER, 1983).

Dentre os compostos que conferem sabor e odor indesejáveis ao óleo podemos citar os aldeídos, cetonas ácidos graxos de cadeia curta e média, peróxidos e glicerídeos parciais (NAUDET e CECCHI,1970).

O processo de desodorização de gorduras vegetais surgiu quando a disponibilidade de gordura animal superou a demanda. Houve, então, a necessidade de se aprimorar a técnica de remoção do forte odor e sabor dos óleos vegetais, tornando-os mais adequados ao consumo. Surgiu, então, a base do processo até hoje empregado, que consiste na combinação de alto vácuo com alta temperatura e vapor de arraste, onde o material indesejável é separado dos glicerídeos pouco voláteis (GUNSTONE, 1983).

O princípio da desodorização baseia-se no fato dos compostos voláteis indesejáveis presentes no óleo, remanescentes das etapas anteriores do refino, possuírem pressão parcial de vapor que provavelmente se iguala ou excede àquela dos ácidos graxos como palmítico e oleico (GUNSTONE, 1983).

Assim, a remoção do odor e sabor tende a acompanhar a redução do teor de ácidos graxos livres presentes no óleo para a faixa de 0,01 a 0,03%, quando então o óleo é considerado desacidificado. Em geral, o teor de ácidos graxos livres não pode ser reduzido abaixo de 0,005%, pois neste ponto as condições de processo favorecem a hidrólise dos triglicerídeos, produzindo assim continuamente mais ácidos graxos livres (GUNSTONE, 1983; PATTERSON, 1989).

O processo de desodorização do óleo de soja consiste em destilação por arraste com vapor à temperatura superior a 200°C e a pressão inferior a 10 mm de Hg, durante 3 a 8 horas (DUDROW, 1983). O resíduo deste processo é denominado destilado da desodorização do óleo de soja, ou simplesmente DDOS, como será citado daqui em diante.

RUSSEL (1996) menciona a dificuldade em se padronizar as condições para a desodorização devido as diferenças nos modelos dos equipamentos, porém enfatiza que a operação seja feita na faixa de temperatura de 240-250°C para evitar a destilação de compostos que não se deseja remover. Os demais parâmetros estão apresentadas na **Tabela 3**.

Na etapa de desodorização ocorrem uma série de fenômenos físicos e químicos como a hidrólise de triglicerídeos, conjugação de duplas ligações, isomerização, decomposição

térmica de produtos da oxidação e de pigmentos, destilação não só de voláteis, mas de ácidos graxos livres, glicerídeos parciais e esteróis. Ocorre também o arraste de óleo neutro pelo vapor, baixando o rendimento, e a remoção de parte dos tocoferóis, reduzindo a estabilidade oxidativa do óleo (MAZA et al.,1992; GAVIN, 1978).

Tabela 3: Parâmetros para a desodorização de óleo de soja.

PARÂMETROS	PROCESSO	
	Batelada	Contínuo ou Semi Contínuo
Pressão Absoluta	1-6 mm Hg	1-6 mm Hg
Temperatura	240-250 °C	240-250 °C
Tempo de residência na temperatura máxima	3-6 h	15-120 min.
Vapor (% massa do óleo)	5-15%	1-5%

Fonte: RUSSEL (1996)

O tratamento térmico envolvido na desodorização é drástico o suficiente para degradar pigmentos termolábeis, como os carotenóides, acarretando um branqueamento térmico do óleo. A **Tabela 4** apresenta a composição média do óleo de soja bruto em comparação ao óleo de soja refinado, onde se pode observar as alterações promovidas pelo processo de refino.

O processo de desodorização é avaliado pelas características apresentadas pelo óleo. Na **Tabela 5** estão apresentadas as especificações para o óleo de soja refinado estabelecidas pelo National Soybean Processors Association.

Tabela 4: Composição média do óleo de soja bruto e refinado.

Componentes (%)	Óleo Bruto	Óleo Refinado
Triglicerídeos	95-97	Mínimo 99
Matéria insaponificável	1,6	0,3
Esteróis	0,33	0,13
Tocoferóis	0,15-0,21	0,11-0,18
Hidrocarbonetos	0,014	0,01
Ácidos graxos livres	0,3-0,7	0,05
Ferro (ppm)	1-3	0,1-0,3
Cobre (ppm)	0,03-0,05	0,02-0,04

Fonte: SALUNKHE, 1992.

Tabela 5: Especificações para o óleo de soja refinado estabelecidas pelo National Soybean Processors Association.

ATRIBUTOS	VALORES
Cor LOVIBOND	20 amarelo / 2,0 vermelho máximo (cubeta 5 ¼ “)
Ácidos Graxos Livres	máximo 0,05%
Teste de Frio	mínimo 5 ½ h a 0°C
Umidade e Voláteis	máximo 0,10%
Matéria Insaponificável	máximo 1,5%
Índice de Peróxido	máximo 2,0
Estabilidade	mínimo de 8 h p/ índice de peróxido =35 meq/Kg

Fonte: GUNSTONE, 1983.

A recuperação dos destilados da desodorização é necessária para o controle da poluição e também por serem fontes de esteróis e tocoferóis que podem ser extraídos para a produção de concentrados (GUTFINGER e LETAN,1974b; KEHSE,1976).

Vários são os sistemas empregados para a recuperação do destilado, todos eles tendo como objetivo economizar energia e maximizar a eficiência da recuperação. De um modo geral, o destilado é comprimido por um termocompressor a 50-60 mm Hg de modo a facilitar sua condensação, passando a seguir por uma ou mais torres de resfriamento podendo ser resfriado com água ou mesmo com o destilado já condensado. A eficiência de recuperação pode chegar a 98% de tocoferóis e 95% de esteróis, dependendo do sistema usado (GUTCHO, 1979; WOERFEL,1981).

2.3 - Composição do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja

O destilado da desodorização do óleo de soja, comercialmente denominado DDOS, é formado por uma mistura complexa de compostos como podemos observar pela **Tabela 6**.

As diferenças observadas na composição do DDOS ocorrem devido aos diversos sistemas empregados para a desodorização e variações nos parâmetros do processo e sistemas utilizados na recuperação do destilado. Na desodorização, gotas de óleo são arrastadas pelo vapor de saída havendo uma perda de triglicerídeos da ordem de 0,6% (DUDROW, 1983; GAVIN,1981).

Os tocoferóis são o grupo de compostos de maior interesse para este estudo, sua concentração no DDOS varia de cerca de 7 a 15% , dependendo das condições em que a desodorização foi realizada.

Tabela 6: Características e composições do DDOS.

CARACTERÍSTICAS	VALORES					
	A	B	C	D	E	F
Peso Específico (g/ml)	0,9116	–	–	–	–	–
Sólidos Totais (%)	95,26	–	–	–	–	–
Acidez (g ácido oleico/100g)	37,09	44,8	–	–	–	50,4
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	159,40	120,2	–	–	–	–
Ácidos graxos totais (%)	58,13–65,50	–	60,0–62,1	–	–	50,8
Ácidos graxos livres (%)	37,09	44,8	36,0	39,7	33,0	–
Matéria insaponificável (%)	26,10–36,46	58,1	–	–	–	23,7
Tocoferóis Totais (%)	8,50	12,74	7,6–8,7	12,4	14,5	–
α -Tocoferol (%)	1,14	0,68	1,0–1,1	2,4	–	–
β -Tocoferol (%)	–	0,18	0,2–0,4	–	–	–
δ -Tocoferol (%)	2,75	4,73	2,0–2,4	2,5	–	–
γ -Tocoferol (%)	4,62	7,16	4,2–5,0	7,7	–	–
Esteróis Totais (%)	17,05	11,39	–	18,6	14,5	8,0
Campesterol (%)	4,17	2,13	–	–	–	–
Estigmasterol (%)	3,55	3,88	–	–	–	–
β -Sistosterol (%)	9,33	5,38	–	–	–	–
Triglicerídeos (%)	–	–	4,0	–	16,7	17,2
Diglicerídeos (%)	–	–	–	–	16,2	–
Monoglicerídeos (%)	–	–	–	–	5,1	–
Hidrocarbonetos (%)	4,4	–	3,5–4,1	–	–	11,6

Fontes: (A) Augusto (1988), (B) Ramamurthi e Mccurdy (1993), (C) Contreras e Barata (1984), (D) Woerfel (1981), (E) Sheabar e Neeman (1987), (F) Ruiz-Mendez et al. (1995).

O teor original de tocoferóis do óleo bruto é reduzido gradualmente no decorrer das etapas de refino. De acordo com a literatura consultada, o valor das perdas, expresso em tocoferóis totais, varia muito. Por outro lado, a maioria dos autores concordam que o processo de refino não altera significativamente a relação entre a concentração dos isômeros (**Tabela 7**).

GUTFINGER e LETAN (1974a) estudaram a variação do teor de tocoferóis totais durante as diversas etapas do refino de óleo de soja e obtiveram os seguintes valores médios em μg de tocoferóis totais por grama de óleo: bruto, 1132; degomado, 1116; neutralizado, 977; branqueado, 863 e desodorizado 726. Os mesmos autores avaliaram a concentração dos isômeros dos tocoferóis no óleo bruto original e no óleo refinado.

HARRIS (1962) relata que o óleo de soja bruto possui 1590 μg de tocoferóis por grama de óleo. Após a hidrogenação este valor cai para 1515 μg de tocoferóis/g e finalmente o óleo desodorizado apresenta 995 μg de tocoferóis/g de óleo.

Segundo SWERN (1964a) a perda de tocoferóis durante o processo de refino para obtenção do óleo comestível é da ordem de 6% do teor de tocoferóis total, ocorrendo principalmente nas etapas de refino alcalino e branqueamento. Na etapa de desodorização as perdas dependem das condições do processo como temperatura e vácuo, podendo ser alta o suficiente para haver necessidade de reincorporação de tocoferóis ao óleo refinado

CONTRERAS (1984) estimou que para cada tonelada de óleo desodorizado pode-se obter de 1 a 2 Kg de DDOS, com um rendimento de 0,1 a 0,3 Kg de tocoferóis, baseando-se na

perda média de tocoferol durante a desodorização de 11 a 22 mg/100g e uma porcentagem média de tocoferol no DDOS de apenas 6,68%.

Tabela 7: Teor de tocoferóis em óleo de soja em diversas etapas do refino.

TOCOFERÓIS	ÓLEO DE SOJA			
	Bruto ^a	Refinado ^a	Branqueado ^b	Desodorizado ^b
Totais (µg/g óleo)	1129-1452	726-773	845,9	760,4
α (%)	7,0-11,0	8,2-12,4	6,25	5,75
γ (%)	65,2-69,9	62,0-65,0	48,86	44,06
δ (%)	28,6-21,3	25,6-29,7	29,47	26,23

Fontes: a-GUTFINGER E LETAN (1974a), a-NOGALA-KALUCKA et al.(1993)

Os ácidos graxos representam outra classe de compostos presentes no DDOS que segundo NOGALA-KALUCKA et al. (1993), faz-se necessário analisar sua interdependência qualitativa e quantitativa em relação aos tocoferóis para se estabelecer um método adequado para o fracionamento destes compostos.

A composição em ácidos graxos do óleo de soja bruto e do DDOS encontra-se na **Tabela 8**, além dos compostos citados também estão presentes no DDOS, embora em concentração muito baixa os seguintes ácidos graxos: C8:0 , C10:0 e C14:0 (NOGALA-KALUCKA et al., 1993).

Os ácidos graxos predominantes tanto no óleo de soja bruto, quanto no DDOS são, em ordem decrescente de concentração, o linoleico, o oleico e o palmítico, representando os principais compostos a serem separados do DDOS para a obtenção do concentrado de tocoferóis (AUGUSTO,1988).

Tabela 8: Composições em ácidos graxos totais do óleo de soja bruto e do DDOS.

ÁCIDO GRAXO	PORCENTAGEM			
	Óleo de Soja Bruto		DDOS	
	A	B	C	D
Láurico (12:0)	-	< 0,1	3,38	0,2
Mirístico (14:0)	0,06	<0,5	0,78	0,2
Palmítico (16:0)	9,7	7,0 - 12,0	19,39	15,8
Estearico (18:0)	3,4	2,0 - 5,0	4,82	3,5
Oleico (18:1)	26,1	19,0 - 30,0	21,95	18,0
Linoleico (18:2)	51,3	48,0 - 58,0	40,23	55,9
Linolênico (18:3)	8,4	8,3 - 8,8	-	5,7
Araquídico (20:0)	-	<1,0	tr	0,2
Eicosenóico (20:1)	0,3	<1,0	7,56	-
Behênico (22:0)	0,3	<0,5	-	0,4
Linocérico (24:0)	-	-	-	0,2

Fontes: (a) NOGALA-KALUCKA et al. (1993), (b) SWERN (1964c), (c) AUGUSTO (1988), (d) RAMAMURTHI e McCURDY (1993).

A **Tabela 9** apresenta algumas características de solubilidade de ácidos graxos que estão presentes no DDOS. Os dados apresentados permitem fazer uma estimativa de como estes ácidos graxos se comportariam nos diversos processos de extração apresentados no trabalho em discussão.

Tabela 9: Solubilidade dos ácidos graxos presentes no DDOS.

ÁCIDO GRAXO	TEMPERATURA (°C)	SOLUBILIDADE (g/100g solvente)			
		Hexano	Acetona	Etanol (95%)	Metanol
Ácido Linoleico	-70	0	0,35	0	0,39
	-50	3	3,3	4,5	3,3
	-40	14,3	8,6	11,1	9,9
	-30	53	27,2	42,5	48,1
	-20	170	147	208	233
	-10	990	1200	1150	1850
Ácido Oleico		Hexano	Acetona	Etanol	Metanol
	-60	0	0,061	0	0,03
	-40	0,1	0,53	0,7	0,29
	-30	1,2	1,4	2,2	0,86
	-20	9,1	5,11	9,5	4,02
	-10	44,4	27,4	47,5	31,6
	0	100	159	235	250
	10	720	870	1470	-
Ácido Palmítico		Hexano	Acetona	Etanol (99,4%)	Metanol
	-30	0	0,04	0	-
	-20	0	0,1	0	-
	-10	0	0,27	0	-
	0	0	0,66	1,9	-
	10	0,5	1,94	3,2	-
	20	3,1	5,38	7,2	-
Ácido Esteárico	-20	0	0,005	0	0,011
	-10	0	0,023	0	0,031
	0	0	0,21/0,11	0,42	0,09
	10	0	0,8/0,54	1,09	0,26
	20	0,5	1,54	2,25	0,1

Fonte: Fatty Acid Data Book, 1987.

Os esteróis são compostos que também estão presentes no DDOS e para o tecnologista tem pouca importância devido ao fato de serem relativamente inertes, e de pouco contribuir com alguma propriedade característica dos óleos. Entretanto, sua extração do óleo apresenta grande interesse para a indústria farmacêutica devido a ser material fonte para a síntese de hormônios sexuais e vitamina D (SWERN 1964c).

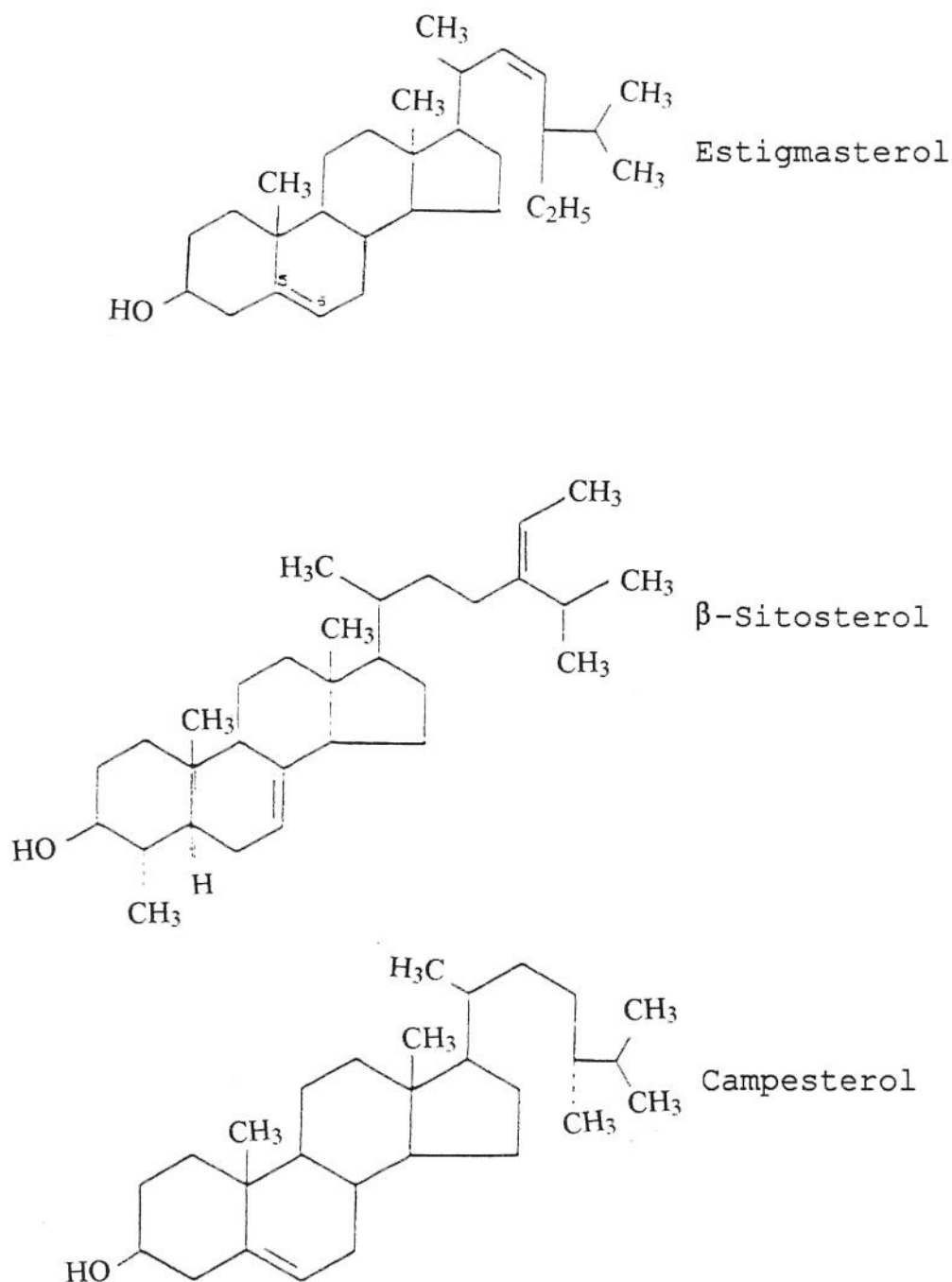
Segundo o mesmo autor, a recuperação dos esteróis pode ser realizada na matéria insaponificável do DDOS empregando-se cristalização fracionada. Os esteróis ocorrem nos óleos tanto na forma livre, quanto como ésteres dos ácidos graxos e também na forma de glicosídeos.

O refino alcalino dos óleos remove uma porção destes esteróis. Outra parte é apreciavelmente removida na etapa de desodorização, constituindo-se, então, o DDOS outra fonte apreciável de esteróis, cuja concentração é igual ou cerca de quase o dobro das dos tocoferóis. Assim sendo, os esteróis, depois dos ácidos graxos, ocupam o segundo lugar em prioridade de remoção para obtenção de um concentrado de tocoferóis (AUGUSTO, 1988).

Os esteróis de óleos vegetais apresentam-se na forma de misturas, sendo que no caso do óleo de soja o β -sitosterol predomina, estando também presentes o campesterol e o estigmasterol perfazendo cerca de 0,42% da composição do óleo bruto (SWERN, 1964c). A **Figura 1** apresenta a estrutura química dos principais esteróis presentes no óleo de soja e no DDOS.

Com relação à matéria insaponificável do óleo bruto, a fração de esteróis corresponde a 60%. Dentre os esteróis, 20% são campesterol, 20% estigmasterol, 53% β -sitosterol e

os 7% restantes equivalem a uma mistura de Δ^5 -avenasterol e Δ^7 -estigmastenol (SWERN, 1964c).



Fonte: STECHER (1968).

Figura 1: Estrutura química dos principais esteróis presentes no óleo de soja e no DDOS.

Na matéria insaponificável do óleo bruto de soja também encontra-se outra classe de compostos denominada álcoois triterpênicos, que consistem de compostos com estrutura de cinco anéis de ciclohexanos condensados contendo 30 átomos de carbono. Os álcoois triterpênicos correspondem a 14% da matéria insaponificável estando presentes a β -amirina, o cicloartenol, o 24-metileno cicloartenol e o ciclobranol (SWERN, 1964c).

O mesmo autor cita que os hidrocarbonetos representam outra classe de compostos orgânicos encontrados na matéria insaponificável do óleo de soja bruto, sendo o esqualeno ($C_{30}H_{50}$), o mais importante, um hidrocarboneto altamente insaturado. Embora sua estrutura assemelhe-se a de um carotenóide, o composto não apresenta cor devido a fato de suas ligações duplas não serem conjugadas. Esta classe de compostos representa de 5 a 22mg/100g do óleo de soja e é concentrada na etapa da desodorização do óleo, quando são removidos juntos com outros compostos voláteis.

O DDOS contém cerca de 8,8% de hidrocarbonetos, sendo esta mistura composta por 50% de esqualeno, 4,2% de compostos com 29 a 31 átomos de carbono e o restante correspondendo a compostos com número de carbonos inferior a 29 e superior a 31 (EVANS et al., 1964).

2.4 - Tocoferóis

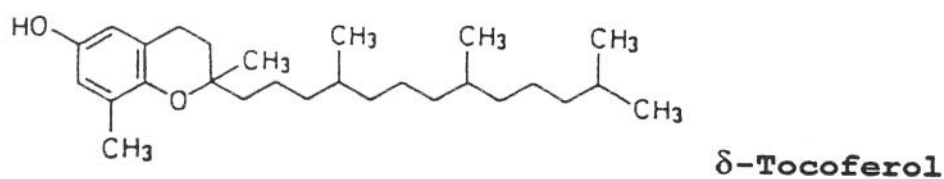
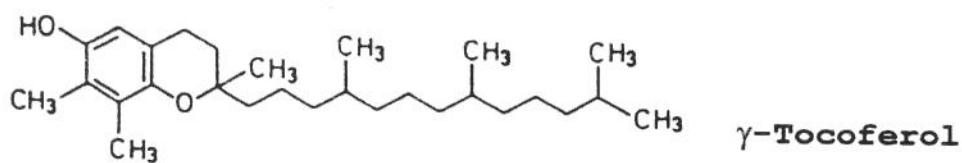
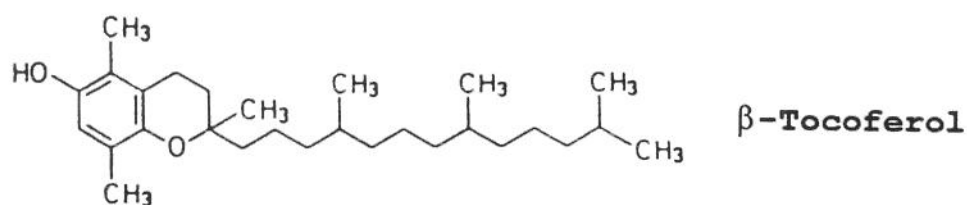
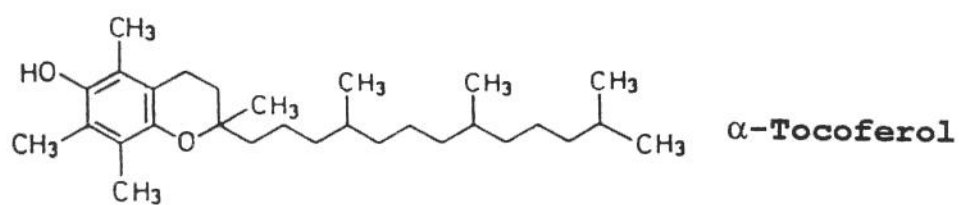
A vitamina E foi descoberta em 1922 por Evans e Bishop, que demonstraram que uma dieta deficiente em certos lipídeos resultava em infertilidade em ratos. Então caracterizaram e denominaram como vitamina E esta classe de compostos lipossolúveis englobando 4 isômeros tocoferóis e 4 isômeros tocotrienóis (MACHLIN,1982).

Os tocoferóis encontrados na natureza pertencem a dois grupos distintos de compostos, os pertencentes ao grupo dos tocoferóis possuem uma cadeia lateral do fitol e o grupo dos tocotrienóis possuem estrutura similar com dupla ligação nos carbonos 3', 7' e 11' na cadeia lateral (KUTSKY,1973).

Os tocoferóis e tocotrienóis ocorrem como uma variedade de isômeros que diferem em número e localização do grupo metila no anel cromanol como apresentado nas **Figuras 2 e 3**. (TOMASSI e SILANO,1986).

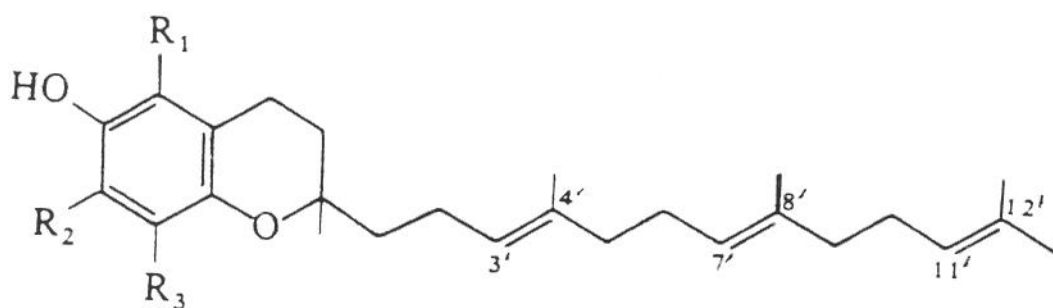
A configuração do α -tocoferol natural, designado (d)- α -tocoferol é 2R, 4R' e 8R (RRR- α -tocoferol), o α -tocoferol sintético é denominado (d,l)- α -tocoferol (MACHLIN,1980 e 1982).

A nomenclatura sugerida pela IUPAC-IUB Comissão on Biochemical Nomenclature e atualmente usada para tocoferóis e tocotrienóis está apresentada na **Tabela 10** (DESAI,1981).



Fonte: TOMASSI e SILANO (1986)

Figura 2: Estrutura química dos tocoferóis.



Onde:

α -Tocotrienol : R1 = R2 = R3 = CH3

β -Tocotrienol : R1 = R3 = CH3, R2 = H

γ -Tocotrienol : R1 = H2, R2 = R3 = CH3

δ -Tocotrienol : R1 = R2 = H, R3 = CH3

Fonte: TOMASSI e SILANO (1986)

Figura 3: Estrutura química dos tocotrienóis.

Os quatro tocoferóis e os quatro tocotrienóis foram descobertos em plantas e produtos vegetais, estando os tocoferóis presentes em maior abundância que os tocotrienóis. Ainda não está elucidado o porque da ausência de tocotrienóis em alguns tecidos e a predominância do α -tocoferol ou o β e γ tocoferol em outros tecidos (WHITTLE et al., 1966; SLOVER 1971).

Tabela 10: Nomenclatura de compostos tocoferóis e tocotrienóis que ocorrem na natureza.

Nome Comum	Designação Estereoquímica	Abreviatura
α -tocoferol	5,7,8-trimetiltocol	α -T
β -tocoferol	5,8-dimetiltocol	β -T
γ -tocoferol	7,8-dimetiltocol	γ -T
δ -tocoferol	8-metiltocol	δ -T
α -tocotrienol	5,7,8-trimetiltocotrienol	α -T3
β -tocotrienol	5,8-dimetiltocotrienol	β -T3
γ -tocotrienol	7,8-dimetiltocotrienol	γ -T3
δ -tocotrienol	8-metiltocotrienol	δ -T3

Fonte: DESAI (1980)

2.4.1 - Propriedades Físico-Químicas e Estabilidade dos Tocoferóis

Os tocoferóis apresentam-se na forma de um óleo viscoso à temperatura ambiente. São insolúveis em água, solúveis em óleos e em diversos solventes de lipídeos tais como acetona, álcoois, clorofórmio, éter, benzeno e hexano (BALL, 1988).

Apresentam os seguintes pontos de fusão: α -tocoferol, 2,5°C a 3,5°C; acetato de α -tocoferol, 26,5°C a 27,5°C, succinato de α -tocoferol, 76°C a 77°C e γ -tocoferol, -3°C a -2°C (KOFER et al. 1962).

A rotação ótica dos tocoferóis naturais é de pequena magnitude e dependente da natureza do solvente. O α -tocoferol possui poder rotatório de 0,32 em etanol a 25 °C (MACHLIN, 1980).

O espectro na região do ultra violeta apresenta absorção máxima entre 292 a 298 nm em etanol. A acilação do grupo hidroxila fenólico desloca a absorção máxima para comprimentos de onda menores de 276 a 285 nm. Na região do infra vermelho o espectro mostra vibração de estiramento comum do grupo -OH (2,8 a 3,0 μ m) (SEBRELL e HARRIS, 1972).

Os tocoferóis são lentamente oxidados pelo oxigênio atmosférico. Por outro lado esta oxidação é acelerada com exposição à luz (radiação UV), calor e álcali e na presença de sais de ferro e cobre. Na ausência de oxigênio são estáveis ao calor até 200°C e não são afetados por ácido sulfúrico e clorídrico até 100°C. Os ésteres derivados dos tocoferóis como o acetato de α -tocoferol e succinato de α -tocoferol apresentam maior estabilidade em relação ao oxigênio, íons metálicos, luz e calor, sendo portanto esta a forma de maior interesse comercial (AMES, 1972 e MACHLIN, 1982).

2.4.2 - Função Antioxidante dos Tocoferóis

Os tocoferóis possuem aplicação tecnológica em alimentos como antioxidantes naturais. Embora eficazes, os antioxidantes sintéticos não são universalmente aceitos devido ao fato de sua segurança não estar totalmente comprovada (SCHULER, 1990).

Os aditivos naturais para alimentos, incluindo os antioxidantes, de um modo geral, são os mais preferidos pelos consumidores, pois os mesmos, geralmente associam produtos naturais ao baixo risco de toxidez em comparação aos sintéticos. A **Tabela 11** resume as principais vantagens

e desvantagens do uso de antioxidantes naturais em relação aos antioxidantes sintéticos (VALENZUELA e NIETO, 1996) .

Tabela 11: Vantagens e desvantagens do uso de antioxidantes naturais em relação aos antioxidantes sintéticos.

Antioxidantes Sintéticos	Antioxidantes Naturais
Baixo custo	Alto custo
Amplo espectro de uso	Uso mais restrito
Atividade de média a alta	Ampla faixa de atividade
Maiores cuidados sobre a segurança de uso	Considerados como inócuos
Baixa solubilidade em água	Amplo espectro de solubilidade
Decréscimo de interesse	Aumento de interesse

Fonte: VALENZUELA e NIETO, 1996

A lista de antioxidantes permitidos em alimentos é pequena se comparada a outra classe de aditivos e está sujeita a modificações com a conclusão de diversos estudos toxicológicos (SCHULER, 1990).

A rancidez oxidativa desenvolve-se em alimentos que contém óleos ou gorduras e ocorre quando o oxigênio atmosférico reage com a fração insaturada dos ácidos graxos para formar peróxidos, hidroperóxidos e que finalmente se degradam formando compostos carbonílicos. Os produtos da reação como os aldeídos, ácidos, cetonas e álcoois conferem odor e sabor desagradáveis ao alimento e dependendo de sua intensidade, tornam-no inaceitável ao consumo (WITTING, 1975).

Os tocoferóis possuem um grupo hidroxila fenólico essencial para sua ação antioxidante, que basicamente

consiste em interromper a reação em cadeia dos radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio ao radical hidroperóxido. O radical resultante derivado do tocoferol é relativamente estável e cessa a reação em cadeia. Do mesmo modo, os tocotrienóis têm atividade antioxidante similares aos respectivos tocoferóis (CLARK et al., 1990).

O α -tocopherol apresenta atividade antioxidante, mas os isômeros γ e δ são mais eficazes. O concentrado de tocoferóis mais apropriado para a ação antioxidante deve conter a soma de δ e γ tocoferol superior a 80% da concentração de tocoferóis totais segundo DOUGHERTY (1988).

A atividade antioxidante dos tocoferóis apresenta a seguinte sequência : δ -T > γ -T > β -T > α -T , sendo inversa a atividade vitamínica de acordo com SHERWIN (1976).

A temperatura e luminosidade podem influenciar a ordem da atividade antioxidante para os diferentes tocoferóis. BURGEIOIS (1981), cita que em níveis de 200 ppm ocorre a seguinte ordem de ação antioxidante:

$\alpha > \gamma > \beta > \delta$ na faixa de 20 a 60°C

$\delta > \gamma > \alpha > \beta$ na faixa de 80 a 120°C

A atividade antioxidante dos tocoferóis depende muito do alimento ao qual é adicionado, da concentração usada, da presença e disponibilidade de oxigênio e metais pesados e também da presença de diversos agentes sinérgicos (VALENZUELA e NIETO, 1996).

Segundo os mesmos autores, o ácido cítrico e o EDTA atuam como agente quelante de metais, que presentes, mesmo em

traços, agiriam como catalisadores da reação oxidativa. O ácido ascórbico, palmitato de ascorbila e extrato de alecrim por sua vez, regeneram o tocoferol revertendo-o da forma oxidada para a forma reduzida

Tem sido observado que a atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos não aumenta linearmente com o aumento da concentração do composto e a valores altos exercem ação pró-oxidante (SCHULER, 1990).

Os tocoferóis em concentrações elevadas e na presença de sais de ferro ou cobre, formam um radical hidroperóxido que atua como um agente pró-oxidante. Este efeito é observado até em baixas concentrações de α -tocopherol, o que não ocorre com os isômeros γ -tocopherol e δ -tocopherol na faixa usual de concentração empregada nos alimentos. Isto indica que para efeito de ação antioxidante em alimentos deve-se empregar o γ -tocopherol e δ -tocopherol, e a concentração de α -tocopherol deve estar na faixa de 50 a 500 mg/Kg. Assim, os concentrados naturais de vitamina E devem ser preferencialmente escolhidos em relação aos concentrados sintéticos que possuem alto teor de α -tocopherol (VALENZUELA e NIETO, 1996).

2.4.3 - Aplicações dos Tocoferóis em Alimentos

Diversos foram os estudos realizados para avaliar a ação antioxidante dos tocoferóis em alimentos e determinar os parâmetros para sua aplicação eficiente.

Um concentrado com 80% de tocoferóis totais, composto por 9,3% de α -tocopherol, 55,6% de γ -tocopherol e 31,5% de δ -tocopherol, foi aplicado na proporção de 0,02% (m/m)

durante a salga em salmão. O concentrado de tocoferóis apresentou boa eficiência na manutenção da estabilidade oxidativa do produto, porém, em nível inferior a uma mistura dos antioxidantes sintéticos, butil hidroxi anisol (BHA) e butil hidroxi tolueno (BHT), aplicada na mesma concentração (TOYAMA e SHIMAZY , 1973).

Estudos realizados com batatas fritas, massas alimentícias e "cream crackers" demonstraram que a adição de 200 ppm de tocoferóis é suficiente para manter a estabilidade destes alimentos durante seu período de comercialização (DOUGHERTY, 1988).

DUXBURY (1988), descreve a avaliação do efeito antioxidante em embutidos contendo carne suína de uma mistura de tocoferóis e palmitato de ascorbila empregada na concentração de 0,1% em relação à matéria graxa do alimento. Observaram uma eficiente inibição da oxidação, similar ao uso de uma combinação de BHA/BHT a 0,02% em relação a matéria graxa.

SIX (1994), relata dados sobre a avaliação de um produto comercial preparado a base de concentrado de tocoferol (35%) e extrato natural de alecrim dispersos em óleo. A mistura de α -tocopherol e extrato de alecrim (0,05%+0,02%) apresentou elevado poder antioxidante em óleo de sardinha, assim como, na sua carne triturada e congelada. O produto retardou a oxidação em 5 dias em comparação ao uso isolado de ambos compostos.

O mesmo autor relata que o uso de tocoferol em conjunto com ácido cítrico e pentapolifosfato de sódio em óleos para fritura, como palma e canola, dobrou a estabilidade oxidativa destes óleos. Também exercem ação sinérgica sobre os

tocoferóis, o palmitato de ascorbila e alguns fosfolipídeos, que apresentaram atividade antioxidante superior ao BHA e BHT em gordura vegetal e animal , molhos para salada e recheios com chocolate.

O efeito antioxidante de tocoferóis em óleos durante o aquecimento por micro ondas foi estudado por YOSHIDA et al. (1993). Relataram que a concentração ótima dos diversos isômeros, para aumentar a estabilidade oxidativa do óleo, foi a seguinte: 100 ppm para α , 150 a 200 ppm para o γ e 500 ppm para o δ -tocoferol. Também verificaram que concentrações acima de 500ppm não resultaram em aumento da ação antioxidante.

CLARCK e colaboradores (1990) pesquisaram a ação antioxidante de um concentrado comercial de tocoferóis contendo 9% de α -tocoferol, 1% de β -tocoferol, 45% de γ -tocoferol e 15% de δ -tocoferol em gorduras de diversas fontes como óleo de peixe (menhaden), suínos e frango. A estabilidade destas gorduras aumentou em cinco a dez vezes, atingindo o valor máximo com um teor de 1000 pmm de tocoferóis.

SHUKUYUKI (1992), cita em sua patente, o emprego de tocoferóis naturais para evitar alteração de cor em carnes vermelhas após descongelamento. Um preparado contendo de 1 a 20% de tocoferóis dissolvido em óleo comestível ou aplicado nos cortes de carne na forma de "spray" contendo CO₂ ou N₂ e seguido de congelamento com ar forçado. O produto foi mantido congelado a -30°C por 15 dias e após descongelado manteve sua cor original durante 4 dias.

LAERMER e ZAMBETTI (1992) estudaram o uso de α -tocoferol como estabilizante de polímeros para embalagens de alimentos. Relataram que o emprego de α -tocoferol apresenta uma série de

vantagens como bom estabilizante a ser usado no processamento, bom efeito sinérgico com outros aditivos, excelente estabilizante de cor, baixa perda com emprego de temperaturas até 300°C, baixa taxa de migração para o alimento além de ter status GRAS.

ORFAN et al. (1993), em patente americana, descrevem o uso como agente antioxidante de concentrado de tocoferóis contendo 7 a 20% de α -tocoferol, até 3% de β -tocoferol, 18 a 32% de δ -tocoferol e 45 a 75% de γ -tocoferol. Este concentrado foi adicionado diretamente a base de gomas de mascar visando aumentar sua estabilidade

Os tocoferóis naturais, produzidos comercialmente, têm aplicação tecnológica em gorduras animais, óleos vegetais, pescados, alimentos desidratados, concentrados de flavorizantes naturais, massas alimentícias, molhos para saladas, batatas fritas, snacks e uma grande diversidade de alimentos (SCHULER, 1990).

O mesmo autor cita que estes antioxidantes comerciais, geralmente, são constituídos por all-rac- α -tocoferol puro, por misturas dos diversos isômeros em diferentes proporções e também na forma de misturas sinérgicas compostas por tocoferóis, palmitato de ascorbila, fosfolipídeos, ácido cítrico e outros.

Estes produtos podem apresentar-se também na forma concentrada como uma mistura de γ e δ -tocoferol, o α -tocoferol também pode estar presente, porém em menor porcentagem, como mostra a **Tabela 12**. A concentração dos tocoferóis totais varia de 30 a 80%, o restante sendo triglicerídeos (SCHULER, 1990).

Tabela 12: Composição de alguns concentrados de tocoferóis atualmente comercializados.

COMPONENTES	CONCENTRADO DE TOCOFERÓIS		
	COVIOX-T70 ^a	VITAMIN E 4-50 ^b	VITAMIN E 4-80 ^b
d- α -Tocoferol	9 %	25%	53,7%
d- β -Tocoferol	1%	25%	13,5%
d- γ -Tocoferol	45%	—	—
d- δ -Tocoferol	15%	—	—
Tocoferóis Totais	70%	50%	67,2%
Veículo	Óleo	Óleo	Óleo

Fontes: a-HENKEL; b-EASTMAN CHEMICAL COMPANY (1989 e 1992)

A dosagem normalmente empregada para atingir a ação antioxidante ideal não confere odor, cor e sabor estranho ao produto final. Como antioxidante os tocoferóis apresentam uma certa vantagem com relação aos similares sintéticos com relação à estabilidade ao calor, pois não são voláteis ou destilados pelo vapor nas condições normais de cozimento dos alimentos.

2.4.4 - Metabolismo e Função da Vitamina E em Humanos

A vitamina E sofre poucas reações metabólicas após sua ingestão, sendo absorvida e depositada nos tecidos na forma esterificada. Quando administrada na forma de éster, esta sofre hidrólise completa, pela enzima estearase, antes da absorção da mucosa duodenal. Do intestino, a vitamina E na forma de álcool é transportada pelos capilares linfáticos e circula pela linfa e sangue ligada a lipoproteínas, sendo levada a todos os tecidos do organismo (MACHLIN,1980).

Esta vitamina encontra-se distribuída praticamente por todo organismo, estando presente em maior concentração nas frações celulares mais ricas em lipídeos, como o tecido adiposo e adrenal, que contém 150 e 132µg/g de d-α-Tocoferol respectivamente (MACHLIN,1980).

O mecanismo de ação desta vitamina no organismo humano não está totalmente elucidado e há várias teorias para explicá-lo sendo a mais aceita a teoria antioxidante, onde a vitamina E atua como aceptor de radicais livres na proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica (WITTING,1974).

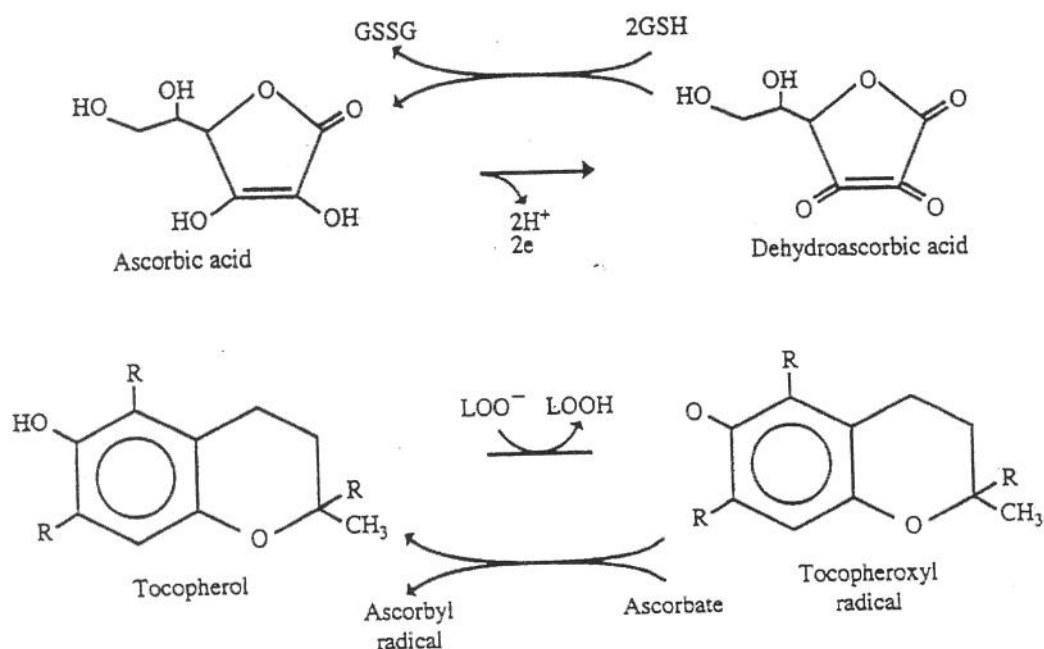
Os radicais livres são formados continuamente no uso normal do oxigênio pelo organismo como na respiração. Geralmente há um equilíbrio natural entre o teor de radicais livres formados no organismo e o teor de antioxidantes para protegê-lo contra sua ação. Os agentes poluentes do ar ambiente, fumaça de cigarro, radiações diversas, agrotóxicos e drogas variadas originam radicais livres no organismo humano (JACOB,1994).

A oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, altera a sua estrutura e função, além do material genético e enzimas diversas presentes no citoplasma. Como consequência surgem uma série de enfermidades ou síndromes degenerativas tais como: artrites, câncer, isquemia, disfunção pulmonar e renal, aterosclerose, esclerose múltipla, diabetes, mal de Parkinson's, além do envelhecimento precoce do organismo, de um modo geral (HORWITT,1960 e 1962).

Uma grande gama de reações promove a defesa do organismo contra a ação deletérea dos radicais livres. Antioxidantes de vital importância são continuamente sintetizados pelo organismo como NADPH e glutathione. Certos micronutrientes, como o ácido

ascórbico, agem como sequestradores dos oxi-radicais em meio aquoso como o plasma sanguíneo e fluido intracelular. A vitamina E e a coenzima Q, exercem função antioxidante na fase lipídica. A reação pareada apresentada na **Figura 4** esclarece o efeito sinérgico do ácido ascórbico na ação antioxidante dos tocoferóis (JACOB,1994).

BOGUTH (1969) enfatiza que a vitamina E é considerada o principal antioxidante do organismo, fundamentalmente para os tecidos com alto teor de ácidos graxos polinsaturados (cérebro e sistema nervoso central) e naqueles onde há intenso contato com o oxigênio (pulmões).



Onde: GSSG - glutathiona oxidada
 GSH - glutathiona reduzida
 $LOO^\cdot$ - radical livre
 LOOH - lipídeo

Fonte: (JACOB,1994).

Figura 4: Esquema da reação de oxi-redução do ácido ascórbico e tocoferol.

2.4.5 - Aspectos Nutricionais e da Legislação

A vitamina E só foi mundialmente considerada um nutriente essencial para os humanos em 1966. Sua "ingestão diária recomendada" (IDR) foi primeiramente estabelecida em 1968, como mostra a **Tabela 13**, sendo reavaliada e atualizada posteriormente (MACHLIN,1980).

A vitamina E natural (RRR- α -tocoferol ou d- α -tocoferol), derivada dos óleos vegetais constitui-se em um único estereoisômero. O composto sintético (all-rac- α -tocoferol ou d,l- α - tocoferol), por sua vez, é uma mistura de oito estereoisômeros, de difícil separação, apenas um deles sendo o d- α -tocoferol. Os isômeros remanescentes por possuírem diferente configuração molecular apresentam menor atividade biológica. A **Tabela 14** apresenta a atividade biológica dos diversos tocoferóis (HORWITT,1976).

Tabela 13: Histórico da IDR de vitamina E estabelecida pela NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES dos EUA.

ANO DE PUBLICAÇÃO	IDR	
	Mulheres *	Homens *
1968	25 UI	30 UI
1974	12 UI	15 UI
1980	8 mg TE	10 mg TE
1989	8 mg TE	10 mg TE

* acima de 18 anos

TE - 1mg de equivalente α -tocoferol = 1mg de d- α -tocoferol

UI - 1 Unidade Internacional de vitamina E = 1mg de d-l- α -tocoferil acetato.

Fonte: MACHLIN,1980

Diversos estudos demonstraram a potência biológica mais elevada das formas naturais de vitamina E. As hemácias, plasma sanguíneo, pulmões e cérebro apresentam retenção maior das formas naturais de vitamina E, preferencialmente da espécie d- α -tocoferol (LANDVICK,1992).

Segundo a NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES dos EUA (1989), a recomendação feita para a ingestão diária varia com o sexo, idade e peso corporal , estando apresentada na **Tabela 14**.

Tabela 14: Atividade biológica dos diversos tocoferóis.

TOCOFERÓIS	ATIVIDADE (UI/mg)
d,l- α -tocoferol acetato	1,00
d,l- α -tocoferol	1,10
d- α -tocoferol acetato	1,40
d- α -tocoferol	1,49
l- α -tocoferol	0,50
d,l- β -tocoferol	0,30
d,l- γ -tocoferol	0,15
d,l- δ -tocoferol	0,01
d- δ - tocoferol	0,05

Fonte: HORWITT (1976) e VALENZUELA e NIETO (1996) .

O U.S. Department of Agriculture's Food Safety e o FDA regulamentam o teor de tocoferóis a ser usado em alimentos. Em setembro de 1993, entrou em vigor, a regulamentação para o limite máximo de aplicação em 300ppm de tocoferóis naturais, baseado no conteúdo de matéria graxa do alimento (USDA, 1993).

Tabela 15: Ingestão diária recomendada de vitamina E estabelecida pela NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES dos EUA.

CATEGORIA	IDADE (anos)	PESO (Kg)	VITAMINA E (UI / dia)
Bebês	0 - 0,5	6	4,5
	0,5 - 1,0	9	6,0
Crianças	1 - 3	13	9,0
	4 - 6	20	10,5
	7 - 10	28	10,5
Homens	11 - 14	45	15,0
	15 - 18	66	15,0
	18 +	70	15,0
Mulheres	11 - 14	46	12,0
	15 +	55	12,0
Gestantes	—	—	15,0
Lactantes	—	—	8,0

Fonte: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1989.

Os tocoferóis possuem "status" GRAS (generally recognized as safe), isto é, considerado como seguro, permitindo o uso de altos teores do composto de origem natural, com a finalidade de estender a vida de prateleira de alimentos ricos em gorduras, especialmente as de origem animal.

Pela legislação brasileira os tocoferóis são classificados como antioxidantes e o seu uso é regulamentado pelo Ministério da Saúde, conforme apresentado na **Tabela 16**.

Tabela 16: Lista de alimentos e limite máximo permitido para uso de tocoferóis regulamentado pela legislação brasileira.

ALIMENTO	LIMITE MÁXIMO
	(g/100g ou g/100ml)
Alimento à base de Cereais Processados	0,03*
Coco Ralado	0,03*
Creme Vegetal	0,03
Gomas de Mascar	0,03**
Leite de Coco	0,03
Margarina	0,03
Óleos e Gorduras	0,03
Produtos de Cacau	0,03
Sopas e Caldos	0,05

*Calculado sobre o teor de matéria graxa.

**Calculado sobre o peso da base gomosa.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988.

2.5 -Métodos para Obtenção do Concentrado de Tocoferóis

RUBEL (1969) ressalta que o DDOS é constituído por uma mistura complexa de compostos e que a separação dos tocoferóis requer o emprego de tratamentos químicos e físicos. Assim sendo o autor, que realizou uma extensa revisão sobre o assunto, faz a seguinte classificação dos principais métodos empregados para a extração dos tocoferóis: extração fracionada, tratamentos químicos, cromatografia e a combinação de várias técnicas.

2.5.1 - Extração Fracionada

a) Extração Líquido-Líquido

De um modo geral os lipídeos, incluindo os ácidos graxos, na temperatura acima de seu ponto de fusão, são miscíveis em todas as proporções com vários solventes orgânicos como hidrocarbonetos, ésteres, éteres, álcoois, cetonas e solventes clorados. A gordura e seus derivados são por sua vez completamente insolúveis em água, exceto em casos especiais (SWERN, 1964b).

Segundo o mesmo autor, a extração líquido-líquido é considerada uma técnica simples, versátil e não dispendiosa, além de facilitar a análise das espécies extraídas, porém requer uma grande quantidade de solventes.

O emprego de grandes volumes de solventes, sua recuperação e as perdas a eles associadas devem ser avaliadas economicamente. Além disto a seletividade dos solventes comuns como o etanol, em relação aos ácidos graxos livres, esteróis, tocoferóis, mono, di e triglicerídeos, é limitada. Portanto, no caso do DDOS, que contém alta acidez, grandes porções dos outros compostos presentes na mistura são arrastados juntamente com os ácidos graxos (HARTMAN, 1971).

RUBEL (1969) descreveu um método para a extração de tocoferóis empregando extração líquido-líquido em duas etapas. Na primeira delas usava-se solventes polares e apolares em uma determinada proporção de modo que uma fração maior de ácidos graxos e mono e diglicerídeos fosse dissolvida no solvente polar. Enquanto que a fase do solvente

apolar, ou extrato, continha maior concentração de tocoferóis, esteróis, ésteres de esteróis, di e triglicerídeos e hidrocarbonetos. Em uma segunda etapa, à partir do extrato apolar, rico em tocoferóis, efetuou-se outra extração de modo que os solventes e a proporção dos mesmos fosse tal que os tocoferóis e esteróis fossem extraídos pela fração polar e os compostos remanescentes permanecessem no solvente apolar.

De um modo geral os ácidos graxos, mono, di e triglicerídeos, tocoferóis, esteróis, são solúveis, em várias proporções, tanto em solventes polares quanto apolares. Deve-se levar em conta, também, que estes solventes possuem um certo grau de miscibilidade entre si, e o que se deseja são duas fases imiscíveis, que se separem rapidamente e que em sua interface não sejam formadas emulsões estáveis. Devido a isto, a escolha do solvente e das proporções empregadas tem papel fundamental no sucesso da partição RUBEL (1969).

AUGUSTO (1988), citou que a partição líquido-líquido do DDOS entre hexana e etanol alcalino consistiu em uma operação rápida e simples, pouco deteriorante dos tocoferóis e de baixo custo, podendo ser realizada à temperatura ambiente, portanto, consistindo em técnica adequada para pré purificar a matéria-prima original removendo quase totalmente os ácidos graxos.

b) Cristalização Fracionada

A cristalização fracionada por resfriamento é considerada um método eficiente em substituição a outras técnicas como a

saponificação, pois evita a exposição dos tocoferóis à altas temperaturas e álcalis. Com exceção da destilação molecular a cristalização é o procedimento mais adequado para a separação dos tocoferóis dos esteróis (ZANDI e MCKAY, 1976).

A solubilidade dos lipídeos e seus derivados em solventes orgânicos decresce com a redução da temperatura. Uma vez que muitas gorduras e ácidos graxos possuem diferenças acentuadas em sua solubilidade, à temperatura na qual determinado composto precipita irá variar de substância para substância (SWERN, 1964b).

O fator mais agravante na obtenção de uma separação eficiente é o efeito de intersolubilização que os compostos presentes na gordura apresentam. Assim os dados de solubilidade para o composto puro pode não ser aplicado para misturas destes. Mas mesmo assim os dados de solubilidade de compostos puros em vários solventes a diversas temperaturas são pré requisitos essenciais no delineamento de métodos de separações (ELVERS et al. 1993; SWERN, 1964b).

De um modo geral, a solubilidade de gorduras e seus derivados em solventes orgânicos diminui com o aumento da cadeia carbônica e aumenta com o aumento do número de ligações duplas. Assim há suficiente diferença entre a solubilidade dos ácidos graxos saturados e dos ácidos oleico, linoleico e outros ácidos graxos polinsaturados para permitir uma separação eficiente empregando-se a cristalização fracionada. O principal uso desta técnica é no preparo de ácidos graxos puros, se a temperatura for baixa o suficiente, até os ácidos graxos polinsaturados podem cristalizar e serem separados (SWERN, 1964b).

As características do processo de cristalização fracionada, tais como, solventes, proporção entre solvente e matéria prima, tempo, temperatura e número de etapas de extração, irão depender do grau de impurezas da matéria prima. Esta técnica, geralmente, só traz resultados satisfatórios quando empregada como uma etapa final da purificação, quando, por exemplo, deseja-se separar os tocoferóis dos esteróis (REICHARDT, 1990; RUBEL 1969).

Os ácidos graxos podem ser removidos dissolvendo-se o DDOS em solventes tais como, metanol, etanol, isopropanol, hexano ou acetona, posteriormente resfriando-se a mistura à -20°C ou temperatura inferior, por tempo suficiente para a obtenção do maior teor de precipitado possível. A remoção do solvente, rico em tocoferóis, pode ser feita por filtração desde que à mesma temperatura da cristalização (RUBEL, 1969).

Um outro método, descrito pelo mesmo autor, empregou uma solução de metanol:água (5 a 10% de água) à 4°C. A remoção máxima de esteróis foi obtida após 24h, sendo a mistura posteriormente filtrada, para a separação dos esteróis da solução mãe, rica em tocoferóis.

SHEABAR e NEEMAN (1987), empregaram extrações sucessivas por cristalização do DDOS em hexano e acetona para a separação de tocoferóis e esteróis. O método empregado resultou em um concentrado contendo 35% de tocoferóis, para tanto, necessitou de um grande volume de solventes, especialmente acetona.

c) Destilação Molecular

A destilação molecular foi extensivamente desenvolvida e considerada uma técnica prática e eficiente. Este método de separação é baseado na diferença de massa molecular dos compostos a serem separados envolvendo a destilação à pressões da ordem de 0,001 mm Hg, com curta exposição a temperatura de cerca de 210°C, condições nas quais os tocoferóis não são degradados (MACHLIN, 1980).

Segundo o mesmo autor, este processo envolve equipamento dispendioso para se obter as condições de alto vácuo, consome bastante tempo e o destilado resultante pode conter contaminantes como carotenóides e esteróis.

As vitaminas A, E e os esteróis são produzidos comercialmente empregando-se esta técnica que consiste na evaporação da matéria-prima aquecida sob alto vácuo (10^{-3} a 10^{-4} mm de Hg de pressão absoluta). As moléculas separadas são coletadas em um condensador situado próximo a superfície de evaporação (MACHLIN 1980).

MARES (1987), em sua patente, descreve o processo para a obtenção de um concentrado de tocoferóis com a seguinte composição: 19 a 36% de α -tocoferol , 4 a 28% da mistura de β e δ -tocoferol , 1,5 a 13% de γ -tocoferol , 9 a 13% de fitosteróis e 4 a 6% de ácidos graxos livres. O processo empregado foi a destilação molecular em duas etapas seguida de cristalização à baixa temperatura em metanol.

d) Extração Supercrítica

O processo de extração com fluidos supercríticos em escala industrial teve início na década de 70 na Alemanha e desde então tem apresentado importantes características que o destaca dos demais processos tais como: tecnologia limpa que não deixa resíduos; emprego de solventes não tóxicos; manutenção das propriedades originais da matéria-prima; extração de produtos de alta qualidade; maior eficácia que os processos convencionais; obtenção de produtos finais com grau de pureza superior (SUTTER et al., 1994).

Segundo os mesmos autores, esta técnica tem sido atualmente utilizada para processos de extração nas indústrias farmacêutica e alimentícia também. Dentre as vantagens apresentadas em relação aos processos convencionais de extração como líquido-líquido, destilação molecular e cromatografia de adsorção uma das mais importante é a separação do solvente do material extraído sem deixar resíduos. Atualmente os defensores desta técnica afirmam que ela virá substituir a destilação molecular.

Algumas considerações foram feitas por FISHER (1989) sobre as limitações do uso da extração supercrítica como alto custo operacional devido ao uso de equipamento para a manutenção de alta pressão além do conhecimento incompleto sobre os fenômenos termodinâmicos que ocorrem no processo. Devido ao fator alto custo operacional faz-se necessário uma análise da viabilidade econômica do processo principalmente em função do tipo de produto acabado que se deseja obter.

O princípio desta extração baseia-se no emprego de um gás pressurizado (sub ou supercrítico) como solvente, o que resulta em altas taxas de transferência de massa devido às propriedades favoráveis de transporte destes fluídos (STUART et al., 1994).

Esta técnica que explora o alto poder de solubilização dos agentes de extração à temperaturas e pressões próximo do ponto crítico destes, pode ser descrita em duas etapas. Na primeira etapa denominada solubilização, a matéria-prima é colocada em contato com o solvente na pressão e temperatura próxima de seu ponto crítico. Na etapa de precipitação, o agente extrator é separado do extrato por redução da pressão ou outro meio físico (CORRÊA et al., 1994).

Um dos solventes mais adequados para ser empregado nesta técnica é o dióxido de carbono por ser atóxico e não inflamável. Além disto apresenta-se inerte sob condições subcríticas/supercríticas e sua pressão crítica é moderada, reduzindo assim, os custos. Outra característica importante é seu baixo ponto de ebulição, facilitando a separação após a extração e evitando degradação térmica do produto acabado (STUART et al., 1994).

Na década de 40, HICKMAN (1945) já avaliava as vantagens apresentadas pela extração com fluidos supercríticos. Porém, enfatizava que a escassez de dados experimentais sobre o equilíbrio de fases de diversas substâncias puras, assim como de misturas, juntamente com as peculiaridades do processo que ocorre a altas pressões, dificultando o emprego de modelos termodinâmicos tradicionais, consistiria em um fator de entrave para a aplicação comercial deste processo a curto prazo.

Posteriormente, em uma patente americana, foi descrito um método para extração de tocoferóis do DDOS, com propano na sua temperatura crítica. A mistura DDOS e solvente, quando aquecida até próximo de sua temperatura crítica separava-se em duas fases líquidas uma das quais continha os tocoferóis na forma concentrada. Este método produziu um material com o dobro da concentração de tocoferóis que o DDOS empregado (EMBREE e KUHRT, 1946).

OHGAKI e KATAYAMA (1986), em sua patente britânica, descreveram um método para a extração de tocoferóis onde a matéria prima foi posta em contato com o solvente, CO_2 , em estado subcrítico. A separação dos tocoferóis foi efetuada por meio de aquecimento da mistura acima da sua temperatura crítica.

JOHNSON e FRITZ (1989), destacaram a extração com fluido super crítico dentre as técnicas de extração mais recentes. Citaram que o dióxido de carbono a temperaturas na faixa de 30 a 400°C e pressão de 1000 a 50.000 psi poderia ser empregado no fracionamento de ácidos graxos. Os aspectos mais atraentes desta tecnologia seriam a baixa temperatura empregada, podendo ser aplicados a compostos termolábeis e o fato do fluido ser o CO_2 , considerado um material não poluente.

Método semelhante foi estudado por LEE et al. (1991) para a extração de tocoferóis do DDOS. Empregaram CO_2 na faixa de temperatura de 35 a 70°C com pressão de 200 a 400 bar, usando método de batelada com um único estágio. A concentração inicial dos tocoferóis de 13% subiu para 40%. Os autores ressaltaram a necessidade do emprego de múltiplos estágios em contracorrente

para otimizar o processo de extração empregado.

ESPÓSITO e PESSOA (1998) realizaram um estudo sobre a solubilidade do α -tocoferol em dióxido de carbono supercrítico para suprir carência de dados sobre propriedades termodinâmicas de compostos de fórmula complexa.

2.5.2 - Tratamentos Químicos

a) Esterificação

Este método emprega a reação de esterificação dos ácidos graxos livres presentes no DDOS com metanol e sua posterior remoção por destilação. Geralmente, o catalizador empregado para a esterificação é o ácido clorídrico. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos possuem ponto de ebulição mais baixo, facilitando sua remoção (MARKLEY, 1968).

O mesmo autor mencionou que a mistura líquida resultante desta reação consiste em uma solução alcoólica contendo além dos ésteres dos ácidos graxos, glicerol, o ácido empregado, esteróis e tocoferóis. Após sucessivas operações de lavagem com água, destilação e filtração, obtém-se um concentrado rico em tocoferóis.

Em uma patente britânica (POTTS, 1943), há a descrição de um método no qual o autor submeteu o destilado da desodorização à esterificação com metanol ou etanol na presença de um catalisador esterificante. Os estéres formados e os compostos que não reagiram foram removidos por destilação resultando em um concentrado de tocoferóis.

McFARLANE e PARKER (1943), em patente canadense, descreveram um método para a obtenção de concentrado de tocoferóis que consistia na dissolução do destilado da desodorização em éter de petróleo seguido do tratamento com H_2SO_4 concentrado, onde o sobrenadante rico em tocoferóis foi recuperado, lavado com uma solução alcalina diluída seguido da destilação do solvente, obtendo-se um óleo livre de esteróis e rico em tocoferóis.

BAXTER e TAYLOR (1944), citaram em sua patente que para separar e recuperar o α -tocoferol dos outros isômeros empregaram inicialmente a esterificação dos tocoferóis com anidrido succínico, onde o outros isômeros exceto o α , foram esterificados. O α -tocoferol foi, então, separado por tratamento com etanol diluído contendo KOH e éter de petróleo.

WILLGING (1986), em patente americana, relatou um método para a purificação de tocoferóis convertendo-o em éster de boro, removendo as impurezas por destilação seguida da hidrólise do éster. O produto resultante contendo 72% de tocoferóis foi, então, aquecido com H_3PO_3 a $200^\circ C$ por 2 horas sob 2 a 3 mm de Hg. O produto obtido da reação foi destilado e o resíduo lavado com água por 30 minutos, originando um concentrado com 96% de tocoferóis.

b) Processo com Uréia

A extração de tocoferóis por este método fundamenta-se na formação de complexos de inclusão entre os ácidos graxos e

a uréia, que se apresentam na forma de cristais, podendo ser removidos da solução mãe por filtração ou decantação.

MAZA (1992), em patente americana, descreveu um método de separação de tocoferóis do desodorizado empregando uréia. O desodorizado contendo 89,2% de ácidos graxos livres, foi aquecido na faixa de 55 a 60°C, e adicionado a uma solução de uréia em metanol. Esta mistura foi aquecida a 60°C sob agitação ocasional durante 16 horas, seguida de resfriamento a 20-25°C, na qual foi feita a separação do complexo uréia-ácido graxo presente na forma de cristais. A fase líquida remanescente foi submetida ao mesmo tratamento originando uma mistura rica em tocoferóis e esteróis.

SAMPATH (1986), descreveu em sua patente um processo semelhante ao citado no parágrafo anterior, a extração de tocoferóis, realizando resfriamento a 0°C para a separação do complexo com uréia. O ajuste do pH para 5,8 foi efetuado com ácido cítrico e o solvente removido por destilação. O óleo remanescente foi solubilizado em CHCl_3 , e os tocoferóis extraídos originando um concentrado com 75% destes.

c) Saponificação

A reação mais simples que ocorre com um ácido graxo é a neutralização para a formação de sais. A produção de um sal metálico de ácido graxo consiste na substituição do hidrogênio do grupo carboxila por um metal. Isto pode ser efetuado de diversos modos como a ação de uma base (hidróxido ou óxido) sobre o ácido graxo ou saponificação de glicerídeos ou outros ésteres de ácido graxo com uma base ou óxido metálico (MARKLEY, 1968).

Os sais de metais alcalino terrosos e metais pesados com ácido graxo de alta massa molecular são produzidos comercialmente e têm aplicações industriais específicas principalmente na fabricação de graxas lubrificantes (SWERN, 1964b).

Os sais metálicos de cálcio podem ser produzidos pela ação direta do hidróxido de cálcio sobre os triglicerídeos (MARKLEY, 1968). A reação apresentada a seguir, refere-se a obtenção do estearato de cálcio à partir de seu triglicerídeo:



A obtenção deste sal, também pode ocorrer diretamente pela neutralização dos ácido graxo com o hidróxido de cálcio como indica a reação a seguir, onde se emprega o ácido esteárico



A borra resultante da neutralização dos ácidos graxos com os metais alcalinos terrosos, como o hidróxido de cálcio, pode ser empregada na fabricação de sabões, pelo método Krebitz, por conversão do sabão de cálcio em sabão de sódio, por aquecimento com solução de carbonato de sódio (HARTMAN, 1971).

ABDURAKHIMOV et al., (1969) relatam um método econômico de saponificação empregando hidróxido de cálcio que consiste no seguinte: concentração do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na faixa de 7 a 10%, usando 50% de excesso, temperatura de reação de 80°C, tempo de reação sob agitação de 1 hora.

A saponificação pode ser usada para separar tocoferóis dos triglicerídeos e ácido graxo a ele associados. Os tocoferóis são muito instáveis à álcali especialmente na presença de oxigênio, Deste modo emprega-se antioxidantes para evitar perdas (RUBEL, 1969).

O mesmo autor cita que na remoção da fração insaponificável pode ocorrer a formação de emulsões, tornando a separação incompleta. As desvantagens deste método são que a matéria insaponificável resultante ainda contém muitos contaminantes, a necessidade de se usar uma grande quantidade de álcalis e o baixo rendimento em tocoferóis.

A **Tabela 17** apresenta certas características de solubilidade de sais de cálcio de ácidos graxos, que estão presentes no DDOS. Os dados apresentados permitem fazer uma avaliação dos diversos processos de extração empregando saponificação com o hidróxido de cálcio.

Tabela 17: Solubilidade de sais de cálcio de ácidos graxos.

SOLVENTE	SOLUBILIDADE (g/100g solvente)		
	Oleato de Cálcio	Palmitato de Cálcio	Estearato de Cálcio
Água	0,66 - 0,92 ^a	0,28 ^a	0,42 ^a
Acetona	2,26 ^c	insolúvel ^b	insolúvel ^b
Etanol	insolúvel ^b	insolúvel ^b	insolúvel ^b
Metanol	0,3 ^c	-	-

(a) valores a 20°C, Fonte: WEAST (1971)

(b) Fonte STECHER (1968)

(c) valores a 15°C, Fonte: SIEDEL (1965)

Um método de saponificação à frio, foi proposto inicialmente para a extração das vitaminas A e D do óleo de fígado de bacalhau, apresentando excelente resultado. Compreende a reação do óleo com uma solução aquosa concentrada do álcali que ocorre exotermicamente com a adição de uma quantidade adequada de etanol. A proporção destes reagentes quando bem balanceada resulta em reação exotérmica intensa e completa em curto tempo (MARKLEY, 1968).

MOURAL e colaboradores (1989), relataram a obtenção de um concentrado de tocoferóis por meio de solubilização do destilado da desodorização em etanol, seguido da adição de Ca(OH)_2 mantendo-se a mistura sob refluxo por 8 horas sob nitrogênio. A fase etanólica foi separada da fase sólida e o processo repetido por mais 3 vezes. As fases etanólicas foram juntadas e resfriadas com CO_2 resultando em um material cristalizado com 34,7 gramas de esteróis e do filtrado foram recuperados 25g de tocoferóis.

SHEABAR e NEEMAM (1987), empregaram tratamento alcalino com NaOH, previamente à cristalização fracionada, com a função de separar os ácidos graxos livres dos compostos a serem cristalizados. Relataram que o uso do NaOH resultou em perda de tocoferóis devido provavelmente à sua instabilidade em meio alcalino, além do fato dos sais formados agirem como emulsificantes, arrastando parte dos tocoferóis para a fase aquosa.

Os sais de cálcio derivados dos ácidos graxos presentes no DDOS, podem ter diversos usos industriais (STECHEER, 1968):

Palmitato de Cálcio:

- agente espessante para óleos lubrificantes
- impermeabilizante para tecidos e graxas lubrificantes
- inibidor de corrosão por hidrocarbonetos alogenados

Oleato de Cálcio:

- agente espessante para graxa lubrificante
- impermeabilizante para concreto
- emulsificante para benzeno e querosene
- agente texturizante de cêras

Estearato de Cálcio:

- impermeabilizante de tecidos, cimento, estuque e explosivos
- estabilizante de resinas polivinílicas
- lubrificante
- componente de lápis de cera
- em grau alimentício pode ser usado como aditivos para alimentos e para produtos farmacêuticos.

Várias patentes citam o uso do oleato, palmitato, e estearato de cálcio, provenientes dos ácidos graxos do DDOS, na nutrição animal. SASAOKA e colaboradores (1990), citaram o modo de preparo de uma ração para ruminantes empregando palmitato e estearato de cálcio. KIMURA et al (1994), relataram o uso de oleato de cálcio na alimentação de bovinos e destacaram a alta qualidade da carne obtida, principalmente com relação à textura macia.

2.5.3 - Cromatografia

A cromatografia de adsorção permite o preparo de tocoferóis individuais relativamente puros sendo empregada para o DDOS que foi sujeito a um tratamento prévio para a remoção dos ácidos graxos (DESAI, 1980).

O DDOS pré-tratado é, dissolvido preferencialmente em solventes polares, com no máximo seis átomos de carbono, e em seguida, passado por uma resina básica. Os tocoferóis e algum resíduo de impureza ácida, são seletivamente adsorvidos pela resina, os outros compostos presentes, como esteróis, glicerídeos, hidrocarbonetos, álcoois superiores, pigmentos e quaisquer compostos neutros ou básicos, não são adsorvidos e assim separados dos tocoferóis. Posteriormente, a resina é lavada empregando-se o mesmo solvente usado na adsorção com o objetivo de remover resíduos dos compostos não adsorvidos (RUBEL, 1969).

O mesmo autor cita que os tocoferóis podem ser eluídos da resina empregando-se uma solução na concentração 2 a 10%, de um ácido orgânico ou inorgânico, do mesmo solvente empregado na adsorção. O solvente eluído da resina apresenta-se rico em tocoferóis além de conter algumas impurezas ácidas

Segundo RUBEL (1969), o grau de pureza obtido está diretamente ligado ao tipo de resina e eluentes usados, além da eficiência do pré-tratamento dado ao DDOS. Generalizando, adsorventes fortes resultam em menor teor de contaminantes, mas proporcionam maiores perdas, ao passo que adsorventes fracos não removem suficientemente os compostos interferentes.

2.5.4 - Combinação de Várias Técnicas

A combinação de diversas técnicas é a mais indicada, pois nenhum dos procedimentos isolados apresentam bom rendimento. A maioria dos procedimentos é empregada apenas para concentrar os tocoferóis já presentes naturalmente no DDOS, não alterando a razão entre os isômeros. O processo industrial para obtenção do concentrado de tocoferóis irá

depende da qualidade do produto final desejado, como teor de impurezas, biopotência, etc (AMES, 1972).

HICKMAN (1945), em uma patente americana, descreveu que partindo de um desodorizado contendo 3,6% de tocoferóis empregou inicialmente destilação para remoção de impurezas voláteis, a seguir usou alto vácuo para a remoção da estearina, obtendo um material com 41,6% de tocoferóis. A seguir este material foi hidrogenado e posteriormente dissolvido em metanol e mantido a -50°C , o precipitado resultante foi removido e o filtrado destilado para a remoção do solvente resultando em um concentrado contendo 78,7% de tocoferóis. O mesmo pesquisador, em outra patente, descreveu processo semelhante onde a primeira etapa consistia na hidrogenação e posteriormente os tocoferóis foram separados do produto da hidrogenação por cristalização em acetona a -50°C (HICKMAN, 1948).

CAWLEY (1945), descreveu em uma patente, a obtenção do concentrado de tocoferóis a partir da hidrogenação do destilado empregando 5% do catalisador Ni-Raney nas condições de 100 a 110°C , 50 lb de pressão inicial por 3 horas. O material hidrogenado foi solubilizado em acetona e mantido a -35°C por 12 h. Posteriormente os sólidos foram removidos por filtração. O solvente do filtrado foi destilado originando um material com concentração de tocoferóis três vezes superior à da matéria prima empregada.

Outro método, citado na mesma patente, empregou desodorizado do óleo de algodão. A matéria prima foi reduzida por meio de uma mistura de HCl, Zn e SnCl_2 , sob agitação e aquecimento de 40 a 50°C . Após, o sobrenadante remanescente

foi coletado e destilado, a fração obtida a 170°C foi descartada. A fração coletada a 200°C e 0,001 mm Hg foi hidrogenada e posteriormente dissolvida em acetona e filtrada. O filtrado foi submetido a resfriamento a -20°C/2h seguido de remoção do solvente por destilação, obtendo-se, assim, o concentrado de tocoferóis.

TAKAGI e KAI (1980), descreveram em uma patente alemã, a obtenção de concentrado de tocoferóis, cuja matéria-prima apresentava teor inicial de 19,4% de tocoferóis. Empregaram primeiramente a esterificação com um álcool polihídrico até a redução do índice de acidez de 68,8 para 0,5. Posteriormente submeteram o produto a hidrogenação seguida de extração fracionada com solução etanol:água, obtendo-se um produto final contendo 91% de tocoferóis totais.

RAMAMURTHI e McCURDY (1993) realizaram a separação de tocoferóis e esteróis dos ácidos graxos por meio de esterificação prévia dos ácidos graxos pela enzima lipase imobilizada e metanol. Posteriormente o material esterificado foi submetido à destilação fracionada.

HUNT e SCHWARZER (1996), em sua patente, descrevem que para a extração de tocoferóis foi empregado inicialmente a esterificação dos ácidos graxos livres com metanol, seguida da trans esterificação dos glicerídeos usando como catalisador hidróxido de zinco. Posteriormente os ésteres dos ácidos graxos foram removidos por destilação. Os tocoferóis e esteróis remanescentes foram separados por cristalização dos esteróis empregando-se uma mistura de solventes e baixa temperatura.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Matéria - Prima

A matéria prima utilizada como fonte de tocoferóis foi o destilado da desodorização de óleo de soja (DDOS).

Com relação à amostragem, foi realizada a coleta de DDOS de três diferentes empresas refinadoras de óleo e efetuada uma posterior seleção da amostra com base no maior teor de tocoferóis totais e menor diversidade de impurezas. De um volume inicial de 5 a 10 kg DDOS, foram retiradas amostras homogêneas em quantidade suficiente para realizar as análises de caracterização e processo completo de extração e concentração dos tocoferóis. Posteriormente foi recebido um novo lote de 50 kg de DDOS da fonte selecionada, quando foi realizada a sua caracterização quanto aos aspectos físicos e químicos, sendo depois usado durante todo o estudo.

3.1.2 - Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau P.A. e de acordo com as especificações requeridas pelos métodos analíticos empregados.

3.1.3 - Instrumental

Além da vidraria e utensílios comumente existentes em laboratório foram utilizados para as determinações analíticas e execução dos experimentos os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo líquido marca Varian modelo 5.000 com detetor de fluorescência marca Varian modelo 2790 e integrador marca Varian modelo 4290.
- Cromatógrafo gasoso marca PERKIN ELMER , modelo Sigma 3B com detetor de ionização de chama e integrador marca PERKIN ELMER modelo LCI-100.
- Espectrofotômetro BECKMAN, modelo DV-70.
- Banho termostatzado LAUDA CSC com temperatura regulável de -30 a 150°C.
- Programador de temperatura LAUDA 3M.
- Centrífuga FANEM , modelo 204-NR, rotação de 0-6000rpm.
- Estufa FANEM , modelo 315-SE.
- Evaporador BÜCHI modelo 28600-18.

3.2 - Métodos Analíticos

- **Determinação do peso específico:** método 28.003 descrito na A.O.A.C. (1980).
- **Determinação de matéria insaponificável:** método 28035 da A.O.A.C (1980).
- **Determinação de índice de saponificação:** métodos 28025 a 28026 da A.O.A.C. (1980).
- **Determinação de ácidos graxos totais:** métodos 28030 a 28035 da A.O.A.C. (1980).
- **Determinação de ácidos graxos livres** - método 28029 da AOAC (1980).

- **Determinação de resíduo de evaporação:** o resíduo de evaporação das amostras foi determinado por gravimetria segundo uma adaptação do método 28.002 da A.O.A.C.(1980). Aliquotas de amostras de extratos de DDOS em solvente foram evaporadas até massa constante em estufa a 70°C.

- **Determinação da composição em ácidos graxos:** efetuada por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos graxos segundo o método Ce 1-62 da AOCS (1989). Obtenção dos ésteres metílicos de acordo com método de HARTMAN e LAGO (1973). A identificação foi efetuada por comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos e a quantificação foi realizada por normalização interna. Realizada pelo Laboratório de Óleos e Gorduras do DTA-FEA-Unicamp.

Condições de análise:

- Coluna de aço inoxidável de 4 m de comprimento com diâmetro de 1/8", empacotada com 10% de Silar 10 C em Chromosorb W-HP (100-120 mesh).

 - Temperatura : -coluna - 175 °C
 -injetor - 225 °C
 -detector - 225 °C

 - Fluxo de nitrogênio: 25 mL/min
-
- **Determinação de tocoferóis totais** - método CONTRERAS & STRONG, 1982a , 1982b.

 - **Determinação de α -tocoferol , outros tocoferóis e esteróis por cromatografia em fase gasosa:** segundo método número Ce 3-74 da A.O.C.S. (1989) e executadas pelo Laboratório da HENKEL de São José dos Campos - SP.

- **Determinação de α -tocoferol e outros tocoferóis por cromatografia líquida de alta eficiência:**

- a) as determinações de α , β , γ e δ -Tocoferol foram efetuadas segundo método descrito por HOFFMANN-LA ROCHE (1988), realizadas pelo Laboratório do Centro de Química - ITAL

Condições:

- Coluna de Si-60 de 30 cm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro interno
- fase móvel : mistura de 3% de dioxano em n-hexano com vazão de 0,5 mL/min
- detector de fluorescência (λ de excitação de 293 nm, λ de emissão de 326 nm)

As curvas do padrão externo foram elaboradas individualmente, para cada isômero, a partir de soluções estoque em hexano preservadas da oxidação por BHT. Para cada ensaio foi efetuado o preparo das soluções padrão na concentração previamente estipulada, dentro da faixa de linearidade da curva do padrão, para cada isômero. A identificação dos picos dos tocoferóis foi realizada por comparação com os tempos de retenção de padrões e a quantificação por comparação de áreas.

- b) as determinações de α , $\gamma + \beta$ e δ -Tocoferol foram efetuadas na Universidade de Santiago do Chile nas condições:

- Coluna Macro Sphere 300 C18 5 μ , 4,6 mm de diâmetro interno e 15 mm de comprimento.
- Eluente: metanol e acetonitrila 50/50.

3.3 - Procedimento Experimental para Obtenção do Concentrado de Tocoferóis

3.3.1 - Monitoramento do Processo

As amostras obtidas nas diversas fases dos processos empregados para extração e concentração dos tocoferóis foram avaliadas quanto ao teor de resíduo de evaporação e tocoferóis totais empregando os métodos citados no **item 3.2**.

3.3.2 - Parâmetros para a Avaliação dos Ensaios

A partir dos valores do teor de tocoferóis totais e do teor de resíduo de evaporação das amostras (denominado simplesmente de sólidos), obtidos nas diversas fases dos processos empregados para a concentração dos tocoferóis, determinou-se os seguintes parâmetros:

Fator de Concentração dos Tocoferóis (**FC**)

$$FC = \frac{\text{concentração de tocoferóis totais no concentrado}(\%)}{\text{concentração de tocoferóis totais inicial}(\%)} \quad \text{equação 1}$$

Percentagem de Sólidos Removidos (**%SR**)

$$\%SR = \frac{\% \text{ sólidos inicial} - \% \text{ sólidos no extrato de tocoferóis}}{\% \text{ sólidos inicial}} \quad \text{equação 2}$$

Percentagem de Tocoferóis Totais Recuperados (**%TTR**)

$$\% TTR = \frac{\text{massa de tocoferóis totais na amostra}}{\text{massa de tocoferóis totais inicial}} \times 100 \quad \text{equação 3}$$

3.3.3 - Extração por Cristalização Isotérmica

Na extração dos tocoferóis empregando-se o método de cristalização isotérmica à baixa temperatura foram avaliadas a influência do solvente, da concentração de DDOS e da temperatura.

Os experimentos conduzidos à -20°C seguiram o fluxograma apresentado na **Figura 5** e foram efetuados na unidade de cristalização apresentada na **Figura 6** as etapas de resfriamento e cristalização ocorreram com agitação.

Para cada experimento em particular foram programadas as rampas de resfriamento com o auxílio de um equipamento programador de temperatura acoplado ao banho termostatizado.

A etapa de resfriamento e cristalização isotérmica a -20°C , foram conduzidas com agitação lenta para acelerar a nucleação e promover a formação dos cristais de ácidos graxos, esteróis e outros componentes do DDOS passíveis de cristalização na faixa de temperatura utilizada. O vaso de cristalização, constituído por um béquer de 1,0 litro, foi protegido da luz com folha de alumínio.

Os ensaios nos quais a cristalização isotérmica ocorreu à -80°C seguiram procedimento semelhante ao apresentado na **Figura 5**. O tempo empregado no resfriamento e cristalização foi o necessário para que a amostra se apresentasse cristalizada mediante observação visual, variando entre 10 a 30 minutos. O esquema da unidade de cristalização usada

encontra-se na **Figura 7**, sendo que as etapas de resfriamento e cristalização ocorreram sem agitação.

A etapa de filtração foi realizada com o auxílio de um funil de vidro com placa porosa modificado, conectado a um sistema de trompa de vácuo. O copo do funil foi removido de modo que a placa porosa do funil ficasse totalmente exposta, permitindo, assim, na etapa final da filtração entrar em contato com o fundo do béquer e remover todo o fluido lá remanescente.

Este método de filtração, onde o filtro permaneceu imerso no vaso de cristalização, aspirando o filtrado para o recipiente coletor, permitiu que esta etapa do processo fosse realizada à mesma temperatura da cristalização, sem o risco de aquecimento da solução e fusão dos cristais formados durante o processo.

O material cristalizado remanescente no vaso de cristalização foi lavado diversas vezes, sempre com o solvente na temperatura empregada na etapa de cristalização. O número de repetições das lavagens e a quantidade de solvente empregada foi a necessária para que o filtrado se tornasse incolor.

O filtrado obtido de cada etapa de cristalização foi concentrado em evaporador e no material resultante efetuou-se a determinação de tocoferóis totais.

O monitoramento de cada etapa do processo foi realizado como descrito no **item 3.3.1**.

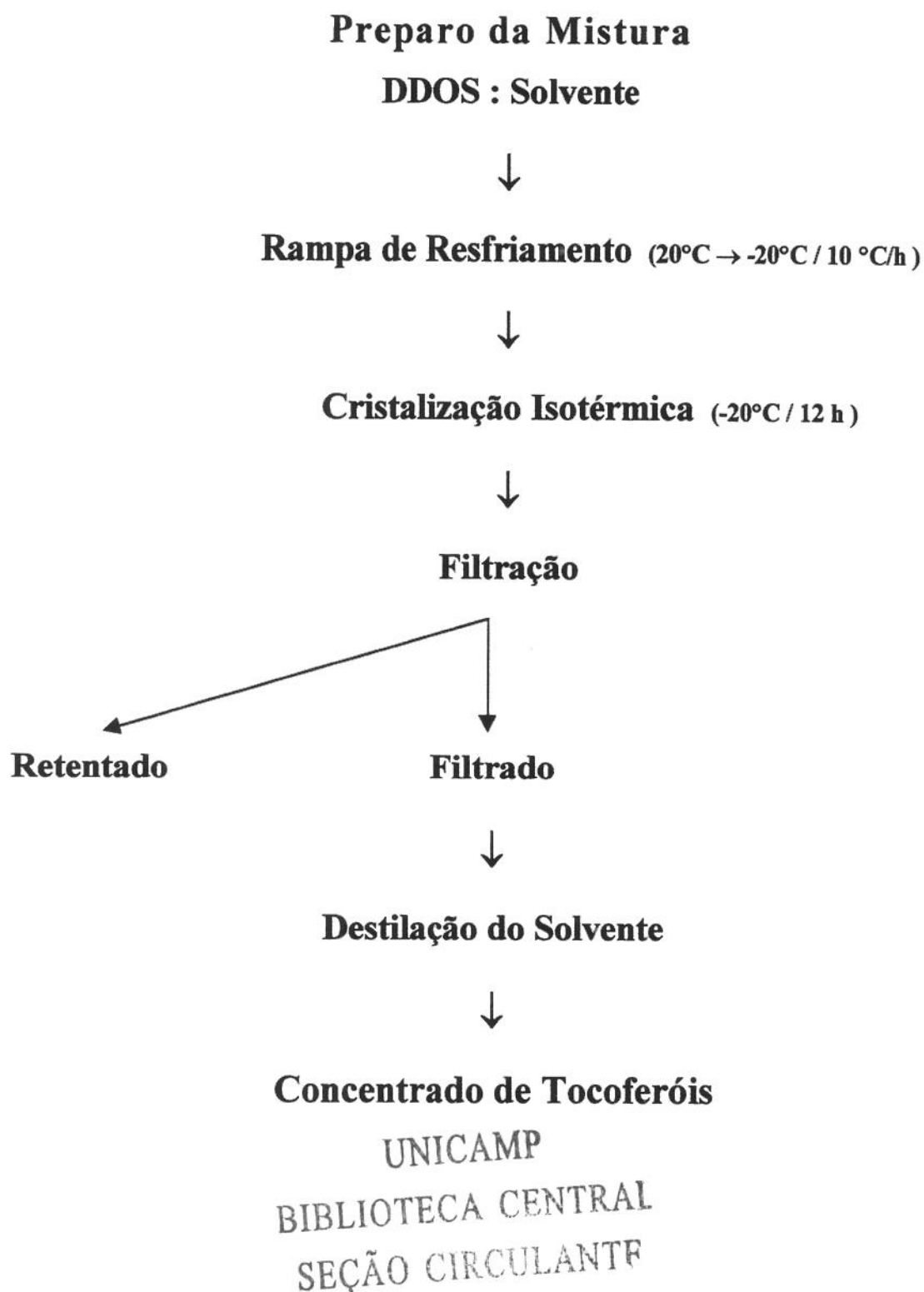


Figura 5: Fluxograma da extração de tocoferóis por cristalização isotérmica em solventes diversos.

A unidade de cristalização a baixas temperaturas, montada para a execução dos diversos experimentos conduzidos a -20°C , apresentada no esquema da **Figura 6** constitui-se basicamente de:

- a) Banho termostatzado
- b) Programador de temperatura
- c) Vaso de cristalização com capacidade de 1,0 litro
- d) Filtro de imersão
- e) Agitador movido a ar comprimido
- f) Recipiente coletor do filtrado
- g) Kitassato do sistema de vácuo
- h) Mangueira
- i) Termômetro

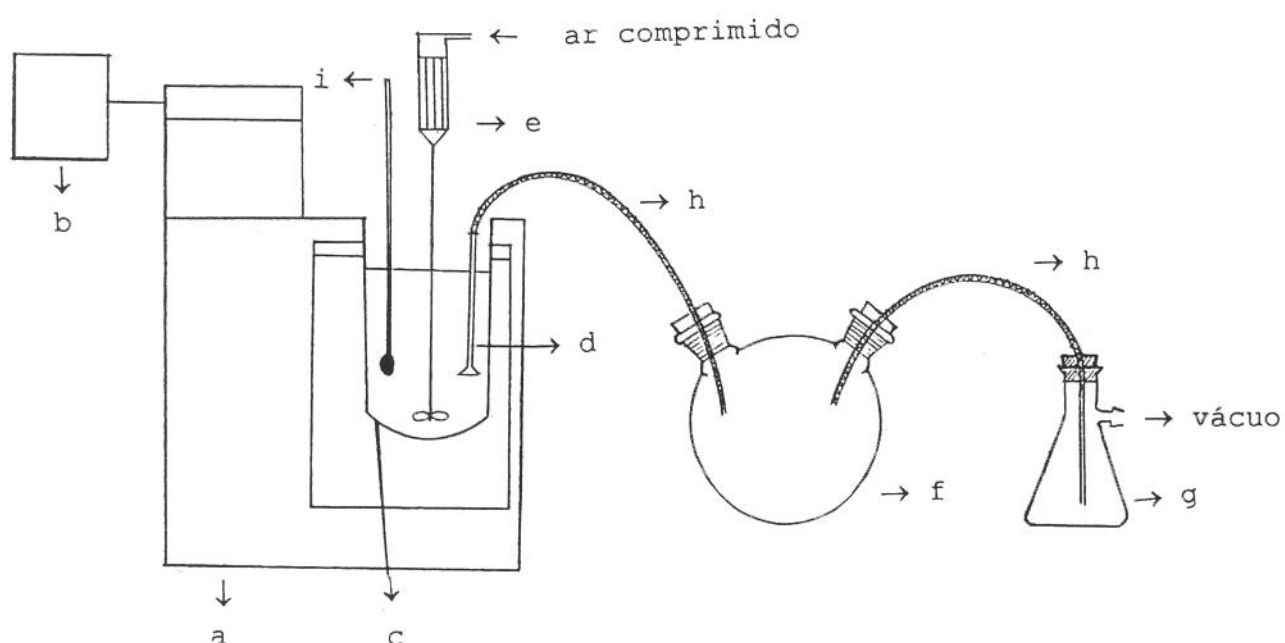


Figura 6: Esquema da unidade de cristalização para os ensaios a -20°C .

A unidade de cristalização empregada nos ensaios conduzidos à -80°C , constitui-se basicamente de:

- a) Recipiente de isopor
- b) Refrigerante - mistura de etanol comercial e gelo seco
- c) Mistura DDOS:Solvente
- d) Vaso de cristalização com capacidade de 200 ml
- e) Termômetro
- f) Filtro de imersão
- g) Mangueira
- h) Balão coletor do filtrado
- i) Kitassato do sistema de vácuo

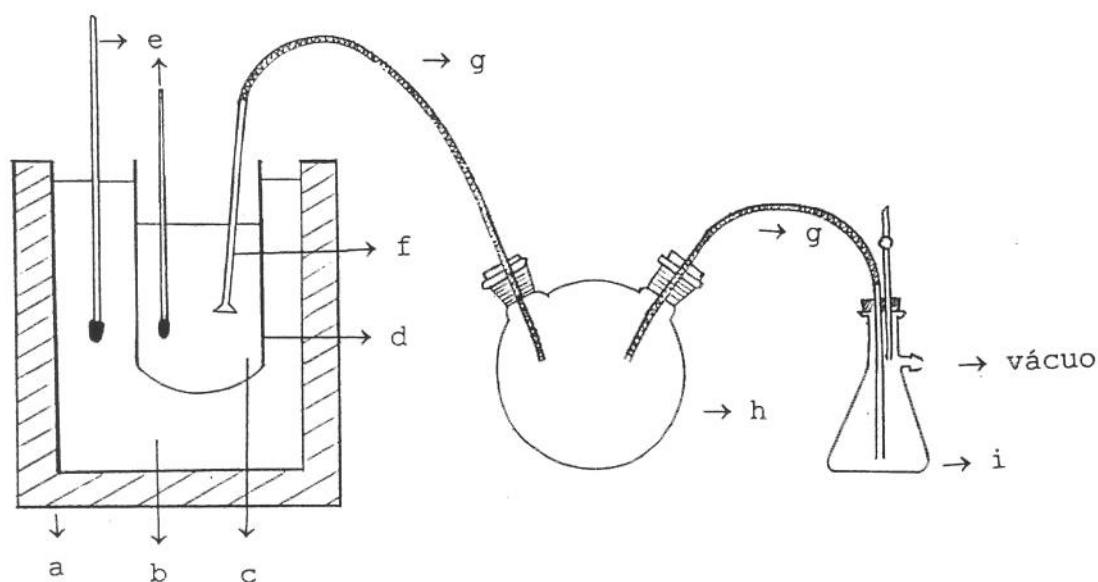


Figura 7: Esquema da unidade de cristalização para os ensaios a -80°C .

A **Tabela 18** apresenta os solventes empregados com as respectivas concentrações das soluções de DDOS, assim como as temperaturas nas quais os diversos ensaios foram efetuados. A **Tabela 19** apresenta os solventes e misturas azeotrópicas de solventes com os respectivos pontos de ebulição.

Tabela 18: Solventes e concentrações das diversas soluções DDOS empregadas nos ensaios de cristalização nas temperaturas de -20 e -80°C.

SOLVENTE	DDOS (% m/v)				
	-20 °C		-80 °C		
Acetona	16,7	20	10		
Etanol*	16,7	20	10		
Hexano	16,7	20	10	15	20
Metanol	16,7		10		
Isopropanol	20		—		
Mistura Azeotrópica	20		—		

* etanol anidro

Foram efetuados ensaios preliminares com as diversas misturas azeotrópicas de solventes, apresentadas na **Tabela 19** para a seleção das mais adequadas. As soluções de DDOS a 20% (m/v) em misturas azeotrópicas de solventes foram mantidas em freezer a -20°C por 72 horas, sendo efetuada a avaliação visual da mistura a cada 12 horas com relação à formação de cristais. As amostras que apresentaram formação de cristais no período avaliado foram, selecionadas para os ensaios na unidade de cristalização.

Tabela 19: Solventes e misturas azeotrópicas empregados nos ensaios de extração de tocoferóis por cristalização isotérmica.

SOLVENTES	RELAÇÃO (% massa)	PONTO DE EBULIÇÃO (°C)
Hexano : Acetona	41 : 59	49,8
Hexano : Álcool Isopropílico	78 : 22	61,0
Hexano : Etanol*	79 : 21	58,7
Hexano : Metil Etil Cetona	63 : 37	64,2
Hexano : Isobutanol	2,5 : 97,5	68,3
Etanol* : Metil Etil Cetona	34 : 66	74,8
Metil Etil Cetona : Álcool Isopropílico	68 : 32	77,5
Acetona	100	56,3
Álcool Isopropílico	100	82,4
Etanol*	100	79,0
Metanol	100	65,0
Hexano	100	69,0

* etanol anidro

Fonte: Elvers et al. (1993)

3.3.4 - Emprego da Saponificação na Obtenção de Concentrados de Tocoferóis

3.3.4.1 - Procedimento Básico para Efetuar a Extração de Tocoferóis do DDOS

A extração dos tocoferóis foi realizada de acordo com o fluxograma apresentado na **Figura 8**.

Para a execução dos experimentos foram preparadas soluções de DDOS a diferentes concentrações (5, 10, 15, 20, e 25% m/v) em acetona e em misturas acetona:água nas proporções em acetona de 98, 95, 92,5, 85 e 80% v/v.

A cada uma das soluções de DDOS foi adicionado hidróxido de cálcio de modo que sua concentração fosse 15g por litro de solução de DDOS. Após uma vigorosa agitação por 3 minutos, as amostras das diversas dispersões obtidas, foram resfriadas a diferentes temperaturas (-20, 0, 10 e 20°C) e, então, centrifugadas a 4000 rpm por 2 minutos sob refrigeração.

O sobrenadante foi removido e o teor de sólidos totais e de tocoferóis totais foi determinado segundo os métodos descritos no **item 3.2**.

Preparo da Dispersão

DDOS : Acetona : Hidróxido de Cálcio

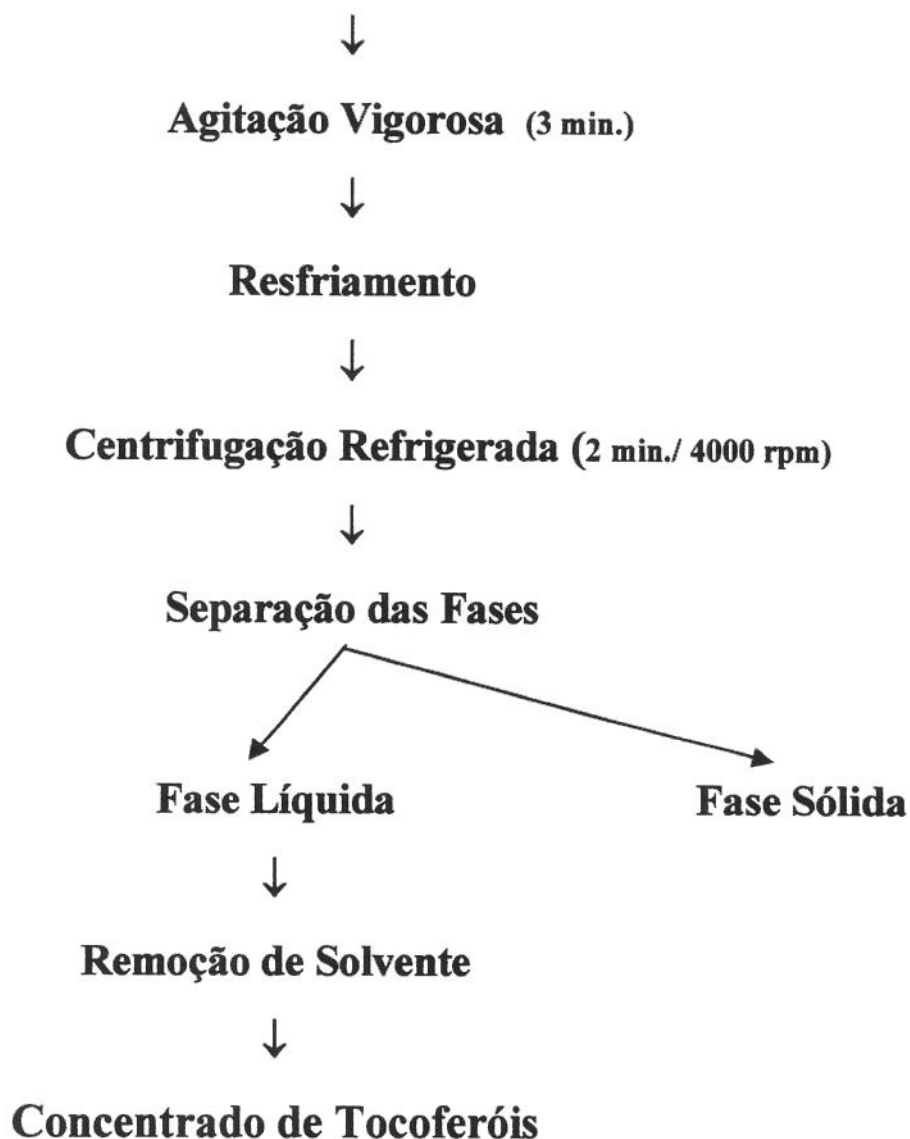


Figura 8: Fluxograma básico do processo de extração de tocoferóis por saponificação.

3.3.4.2 - Influência da Adição de Hidróxido de Cálcio na Extração dos Tocoferóis

O experimento para a avaliação da influência da saponificação na extração dos tocoferóis foi conduzido de acordo com a metodologia descrita no **item 3.3.4.1.**

Manteve-se fixa a temperatura a 0°C, variando-se a proporção de acetona na mistura acetona:água assim como a concentração do DDOS. Para os ensaios com saponificação empregou-se hidróxido de cálcio de modo que sua concentração na dispersão fosse 15g/L, como citado no **item 3.3.4.1.**

Os ensaios para a avaliação da influência do teor de Ca(OH)_2 usado na saponificação foram conduzidos como exposto no **item 3.3.4.1.**

Manteve-se fixa a temperatura a 0°C, a proporção de acetona na mistura acetona:água a 92,5%, a concentração DDOS a 20%, variando-se apenas a concentração de Ca(OH)_2 na dispersão.

3.3.4.3 Influência da Composição da Solução Acetona:Água na Extração dos Tocoferóis

O experimento para a avaliação da influência da composição da solução acetona:água na concentração dos tocoferóis foi conduzido de acordo com a metodologia descrita no **item 3.3.4.1.**

Manteve-se fixa a temperatura a 0°C, assim como a concentração hidróxido de cálcio na dispersão a 15g/L, variando-se a proporção de acetona na solução acetona:água, assim como a concentração do DDOS.

3.3.4.4 - Influência da Temperatura na Extração dos Tocoferóis

O experimento para a avaliação da influência da temperatura na extração dos tocoferóis foi realizado de acordo com a metodologia descrita no **item 3.3.4.1**.

Manteve-se fixa a concentração hidróxido de cálcio na dispersão a 15g/L, variando-se a temperatura, a proporção de acetona na solução acetona:água, assim como a concentração do DDOS.

3.3.5 - Emprego da Saponificação Seguida de Cristalização Isotérmica em Diversos Solventes

A extração dos tocoferóis foi realizada de acordo com o fluxograma apresentado na **Figura 9**.

O processo empregado foi executado em duas etapas: a primeira etapa consistiu na saponificação do DDOS em solução hexânica com hidróxido de cálcio. Na segunda etapa empregou-se o método de cristalização a baixa temperatura, empregando a unidade de cristalização como descrito no **item 3.3.3.1 e Figura 6**, para a obtenção do concentrado final de tocoferóis.

Para a execução dos experimentos foram inicialmente preparadas soluções de DDOS a diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20% m/v) em hexano.

A cada uma das soluções de DDOS, foi adicionada a mesma proporção (em volume) de água, seguida da adição de uma massa de hidróxido de cálcio, de modo que sua concentração na dispersão formada fosse 1% m/v, seguindo-se uma vigorosa agitação por 3 minutos.

Após a agitação as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos quando o sobrenadante, denominado 1^o extrato, foi removido. A fase sólida remanescente sofreu um processo de lavagem onde adicionou-se hexano na mesma proporção empregada no preparo das soluções de DDOS.

O sobrenadante denominado 2^o extrato foi removido e adicionado ao 1^o extrato, e da mistura dos extratos coletou-se alíquotas para as determinações do resíduo de evaporação e de tocoferóis como descritos no **itens 3.1.1.**

Posteriormente efetuou-se a remoção do hexano por meio de destilação para os casos onde o solvente empregado nas etapas posteriores à saponificação foram a acetona ou o metanol.

Em todos os casos avolumou-se a solução a 50 ml antes da cristalização isotérmica a -20°C. No filtrado obtido no final do processo de cristalização coletou-se alíquotas para a determinação do resíduo de evaporação e de tocoferóis como descritos no **itens 3.1.1.**

Apenas para o ensaio com DDOS na concentração de 5% foram feitas as determinações do resíduo de evaporação e de tocoferóis nas diferentes etapas do processo, para as outras concentrações de DDOS trabalhadas estas determinações foram efetuadas somente no filtrado do final do processo de cristalização.

Preparo da Dispersão

DDOS : Hexano : Hidróxido de Cálcio

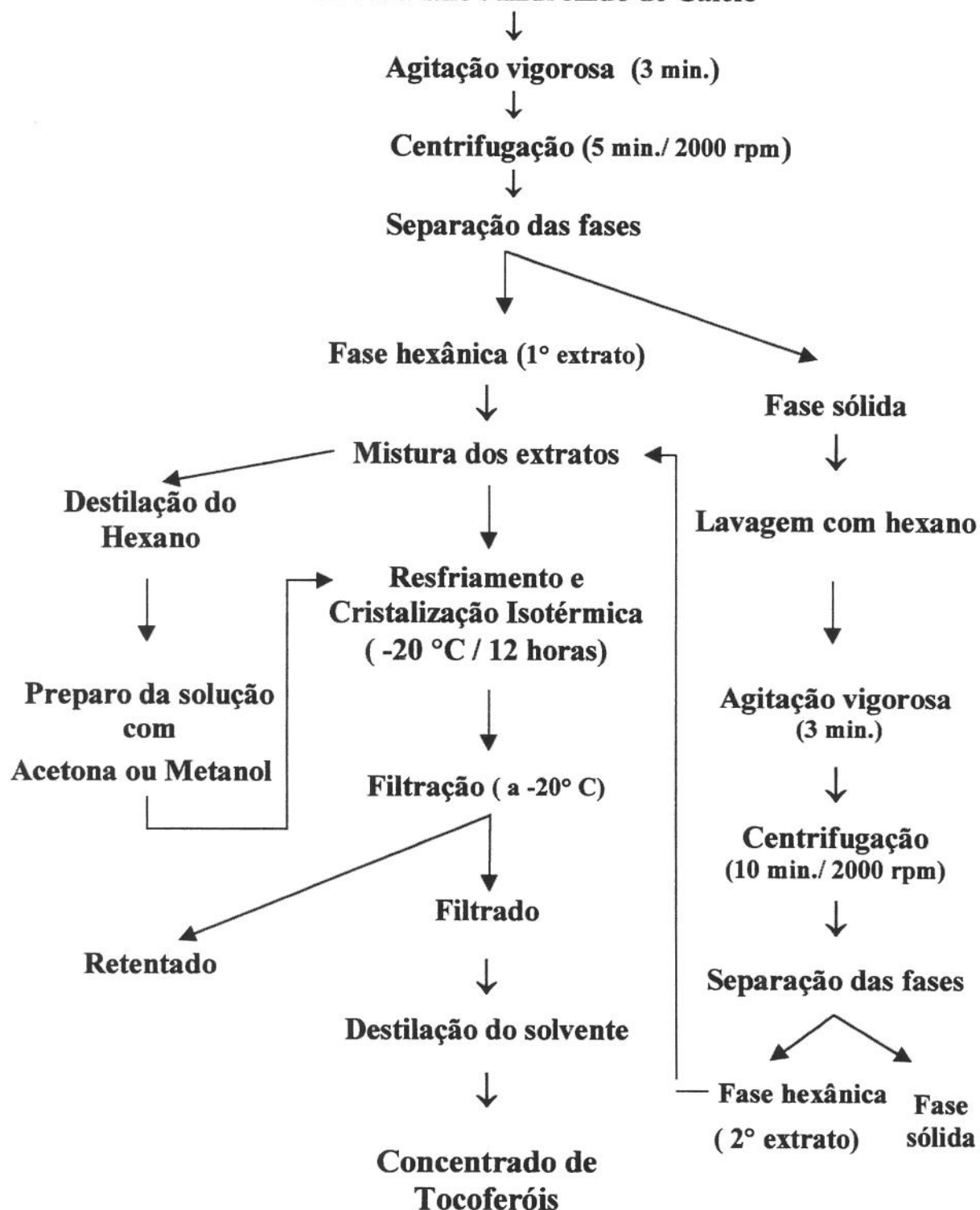


Figura 9: Fluxograma do procedimento para a extração por saponificação em hexano seguida de cristalização em hexano, acetona ou metanol.

3.3.6 - Emprego da Extração Líquido-Líquido Seguida de Cristalização Isotérmica

A extração dos tocoferóis foi realizada de acordo com o fluxograma apresentado na **Figura 10**. O processo empregado consistiu de duas etapas, na primeira etapa empregou-se a extração líquido-líquido, na qual ocorreu a partição do DDOS em dois solventes não miscíveis, hexano e etanol. O pré-concentrado (fase hexânica) obtido foi dissolvido em acetona quando então foi empregado o método de cristalização a baixa temperatura (-27°C) para obtenção do concentrado final de tocoferóis.

Para a execução da extração líquido-líquido foram preparadas soluções de DDOS a 25% (m/v) em hexano e soluções de etanol 50% (v/v) com 1% (m/v) de KOH. A relação entre as soluções hexano:etanol empregada na partição foi de 1,00:1,93 (v/v). Estes parâmetros foram adaptados de trabalho realizado por AUGUSTO (1988). A extração foi realizada em funil de separação. Após o descarte da fase etanólica, a fase hexânica foi lavada com uma solução de ácido cítrico 1% (m/v) para a neutralização de eventual resíduo de KOH.

Com o pré-concentrado obtido preparou-se uma solução (m/v) com acetona em quantidade necessária para obter volume final de 100ml para ser posteriormente submetida ao método de cristalização empregando a unidade de cristalização como descrito no **item 3.3.3.1** e na **Figura 6**.

O monitoramento de cada etapa do processo foi realizado como descrito no **item 3.3.1**.

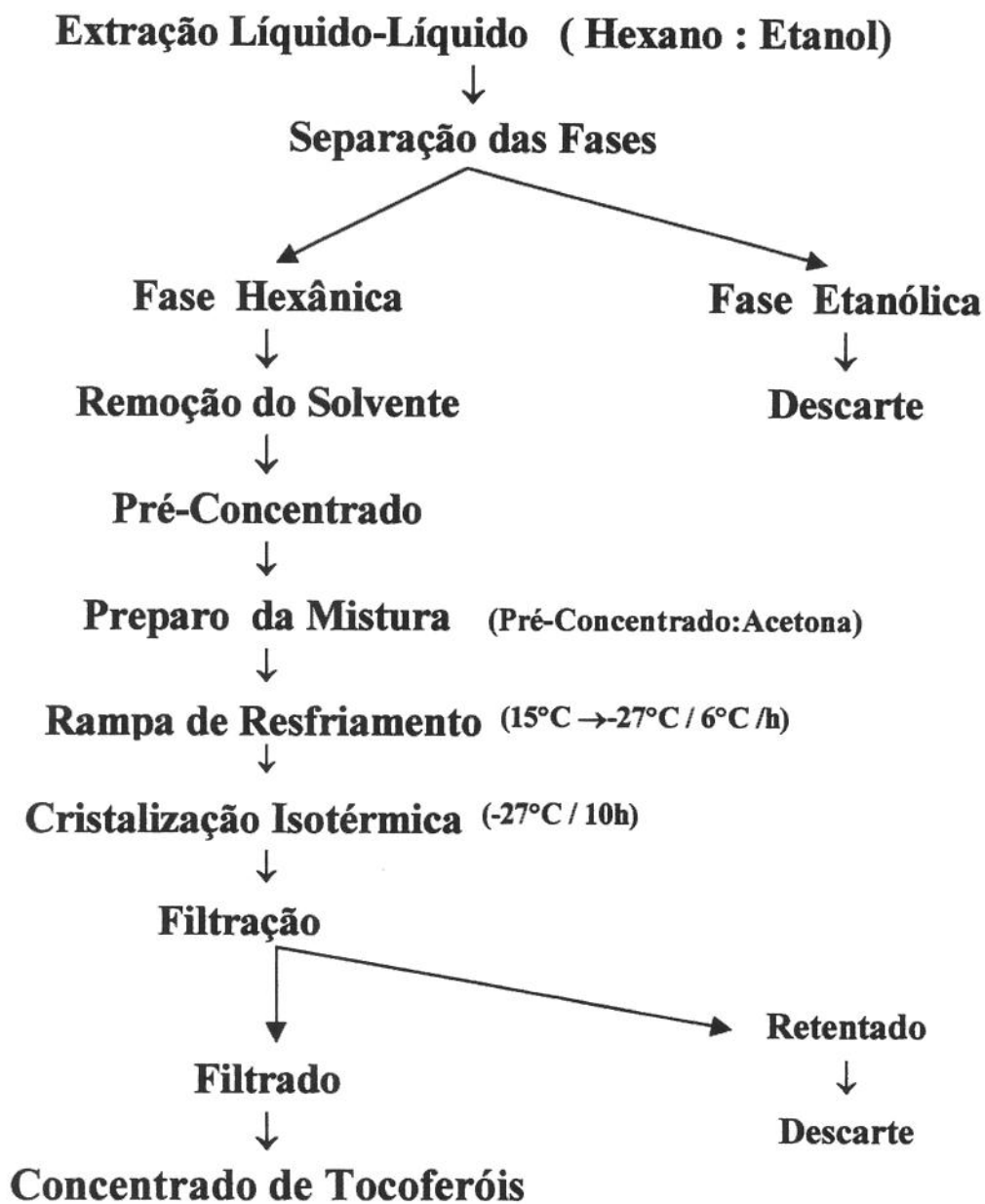


Figura 10: Fluxograma do processo de extração de tocoferóis por extração líquido-líquido seguida de cristalização em acetona.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Caracterização da Matéria - Prima

A caracterização inicial da matéria-prima foi realizada em amostras de cerca de 5 a 10 kg de desodorizados da destilação do óleo de soja (DDOS) provenientes de três diferentes empresas refinadoras.

As principais características físicas e químicas das amostras de DDOS e sua composição percentual constam da **Tabela 20**. Os valores representam a média aritmética e as respectivas estimativas de desvio padrão de quatro determinações.

Os resultados obtidos na determinação do teor de tocoferóis e seus isômeros estão compilados na **Tabela 21** e o **Anexo 1** apresenta os cromatogramas obtidos para as amostras A, B e C por CLAE cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de sílica Si-60 (ALMEIDA et al., 1994).

Observando-se a composição percentual apresentada na **Tabela 20** verifica-se uma acentuada diferença entre o teor de ácidos graxos livres e ácidos graxos totais nas amostras B e C. Isto pode ter ocorrido em função de maior arraste de óleo neutro no processo de desodorização para as amostras B e C em relação a amostra A .

O teor de matéria insaponificável na amostra C é equivalente ao seu teor de tocoferóis, indicando que a matéria insaponificável desta amostra é composta praticamente por tocoferóis.

Tabela 20: Principais características físicas e químicas e a composição percentual das três amostras de DDOS avaliadas.

CARACTERÍSTICAS	AMOSTRAS		
	A	B	C
Peso Específico (g/ml)	0,96 ± 0,00	0,91 ± 0,01	0,91 ± 0,01
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	154 ± 4	145 ± 1	174 ± 1
Resíduo de Evaporação (%)	95,9 ± 0,8	94,2 ± 1,6	96,2 ± 0,9
Ácidos graxos totais (%)	56,1 ± 0,8	65 ± 3	76 ± 3
Ácidos graxos livres (%)	53,4 ± 0,8	40,7 ± 0,9	34,1 ± 0,9
Matéria insaponificável (%)	27,1 ± 0,9	18,6 ± 0,4	3,5 ± 0,3

(* média e estimativa de desvio padrão de 4 determinações)

O valor obtido da diferença entre os teores de matéria insaponificável e tocoferóis totais equivale ao teor de substâncias "interferentes", tais como os esteróis, sujeitas à remoção para obtenção do concentrado de tocoferóis. Observa-se que a amostra B possui cerca de metade do teor destas substâncias "interferentes", em relação a amostra A, sendo esta uma característica importante a favor da amostra B como matéria-prima para a extração de tocoferóis.

De um modo geral, a maior diferença entre as amostras foi encontrada na composição em matéria insaponificável e no teor de ácidos graxos, apresentando a amostra C valores inferiores a A e B. O menor teor de matéria insaponificável foi refletido no teor e composição de tocoferóis, mostrado na **Tabela 21**, onde a amostra C, além de ter apresentado menor quantidade de tocoferóis totais, foi a única a possuir isômeros β em quantidade detectável pelo método empregado.

Tabela 21: Tocoferóis totais e individuais das três amostras de DDOS determinados por CLAE em coluna de sílica Si-60.

TOCOFERÓIS	AMOSTRAS					
	A		B		C	
	g/100g	%	g/100g	%	g/100g	%
Total	8,6 ± 0,5	100	9,30 ± 0,18	100	3,70 ± 0,12	100
α	0,50 ± 0,02	5,8	1,10 ± 0,12	11,8	0,30 ± 0,02	8,1
β	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2.	5,4
γ	5,7 ± 0,4	66,3	5,7 ± 0,1	61,3	2,20 ± 0,06	59,5
δ	2,40 ± 0,13	27,9	2,50 ± 0,04	26,9	1,00 ± 0,12	27,0

n.d.: não detectado, i.é, abaixo do limite de sensibilidade do método (0,1mg/100g) nas condições da análise.

As variações observadas na composição do DDOS provavelmente ocorreram devido, principalmente, aos diferentes sistemas empregados para desodorização e variações nos parâmetros do processo e métodos utilizados na recuperação do destilado. Os valores de tocoferóis obtidos nas amostras A e B estão mais próximos aos valores citados na literatura. O baixo teor de tocoferóis totais da amostra C sugere uma deficiência no sistema de desodorização que, possivelmente facilitou a contaminação do DDOS com óleo refinado.

As diferentes percentagens e distribuição de isômeros de tocoferóis nas amostras estudadas devem direcionar o uso destes produtos. Assim a amostra C foi a menos indicada para a recuperação de vitamina E, pois o teor de tocoferóis totais é

muito baixo, aproximadamente três vezes menor que a amostra B, o que resultaria em um baixo rendimento de extração.

A amostra A apesar de apresentar altos teores de tocoferóis totais, possui uma baixa concentração do isômero α , comprometendo seu uso como matéria prima para produção de vitamina E.

Dentre as três amostras estudadas, a amostra B foi a mais indicada para a produção de vitamina E, tanto pela alta concentração em tocoferóis totais, por sua maior percentagem em α -tocoferol assim como menor teor de substâncias insaponificáveis interferentes.

Assim sendo a amostra B foi a escolhida para a execução dos diversos experimentos para a obtenção do concentrado de tocoferóis.

Posteriormente foi recebido um novo lote de 50 kg de DDOS da fonte B , quando foi realizada novamente a sua caracterização quanto aos aspectos físicos e químicos e, composição percentual (**Tabela 22**), composição dos tocoferóis tanto por cromatografia em fase gasosa (**Anexo 2 e 3**), quanto por CLAE (**Anexo 4**) , assim como a composição em esteróis (**Tabela 23**) e composição em ácidos graxos (**Tabela 24 e Anexo 5 e 6**).

A composição percentual do DDOS, em termos de em tocoferóis, esteróis e ácidos graxos, encontra-se dentro da faixa de valores citados na literatura como apresentado na **Tabela 6**. Sendo assim, será possível a comparação dos resultados obtidos ao longo do estudo da extração dos tocoferóis com os valores apresentados na literatura.

Comparando-se os teores de tocoferóis e esteróis (**Tabela 23**) obtidos por cromatografia gasosa e o teor de matéria insaponificável (**Tabela 22**), observa-se que a última se compõem praticamente de tocoferóis e esteróis.

Tabela 22: Principais características físicas e químicas e composição percentual do DDOS.

CARACTERÍSTICAS	VALORES *
Peso Específico (g/ml)	$0,926 \pm 0,004$
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	157 ± 1
Resíduo de Evaporação (%)	$96,7 \pm 0,5$
Ácidos Graxos Totais (%)	62 ± 1
Ácidos Graxos Livres (%)	46 ± 1
Matéria Insaponificável (%)	25 ± 1

(* média e estimativa de desvio padrão de 3 determinações)

Comparando-se os valores obtidos da avaliação inicial da amostra B, com aqueles do lote recebido posteriormente, porém da mesma fonte refinadora, verifica-se que em relação a composição dos tocoferóis, ambas são semelhantes, respeitando as características inerentes ao processo industrial empregado.

Entretanto, observa-se que os valores para o índice de saponificação e o teor de ácidos graxos livres, apresentam-se cerca de 7% e 11%, respectivamente, superiores aos obtidos para a primeira amostra. O mesmo ocorre para a matéria insaponificável, cujo valor é cerca de 25% maior que o

apresentado inicialmente pela amostra B, indicando que o último lote de DDOS recebido, possa ter sido proveniente de processo de desodorização com parâmetros diferenciados. O aumento apresentado no teor de matéria insaponificável juntamente com a manutenção do valor inicial de tocoferóis implicará em remoção de um teor mais elevado de impurezas nas etapas de purificação posteriores à etapa de saponificação.

Tabela 23: Composição percentual dos tocoferóis e esteróis do DDOS por cromatografia gasosa e por CLAE em coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300.

COMPOSTOS	Cromatografia Gasosa		CLAE	
	g/100g DDOS.	% *	g/100g DDOS	% *
Tocoferóis Totais	11,23	100	9,50	100
α -Tocoferol	1,39	12,37	1,32	13,90
$\beta + \gamma$ -Tocoferol	6,93	61,73	5,89	61,97
δ -Tocoferol	2,91	25,90	2,29	24,13
Esteróis Totais	14,70	100	-	-
Campesterol	3,77	25,65	-	-
Estigmasterol	3,30	22,44	-	-
β -Sistosterol	7,63	51,88	-	-

* percentagem dos valores médios de cada isômero em 100g de tocoferóis totais e dos esteróis em 100g de esteróis totais.

A composição em tocoferóis individuais do DDOS usado ao longo deste estudo indica que o constituinte principal é o γ -tocoferol, uma vez que o isômero β apresenta-se na forma de traços. Assim sendo o γ -tocoferol representa cerca de 62% dos

tocoferóis presentes na amostra. Por outro lado, o isômero α , que possui maior atividade de vitamina E corresponde a apenas 14% do total.

Tabela 24: Composição em porcentagem dos ácidos graxos totais do DDOS.

ÁCIDOS GRAXOS		% NA FRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS	% NO DDOS*
Palmítico	(16:0)	17,7	11,0
Estearico	(18:0)	3,9	2,4
Oleico	(18:1)	25,2	15,6
Linoleico	(18:2)	42,2	26,2
Linolênico	(18:3)	4,0	2,5
Araquídico	(20:0)	0,3	0,2
Não identificado		6,7	4,2

* recalculado em relação à % ácidos graxos totais no DDOS

A composição de ácidos graxos do DDOS apresenta-se dentro da faixa reportada na literatura consultada (**Tabela 8**). Comparando-se a composição de ácidos graxos do DDOS em relação ao óleo de soja bruto verifica-se que o teor de ácido palmítico apresenta-se cerca de 60% superior para o primeiro. Isto pode indicar uma maior susceptibilidade de hidrólise dos triglicerídeos contendo este ácido ou então pode ser devido a oxidação ou polimerização dos poliinsaturados. Esta hipótese também esclarece a diminuição dos teores de ácido linoleico e linolênico, 25% e 37% respectivamente, em comparação ao óleo de soja bruto.

Da composição percentual do DDOS assim como sua composição em tocoferóis como apresentados nas **Tabelas 22 e 23** pode-se observar a alta porcentagem de impurezas que necessitam ser extraídas para a obtenção de um concentrado de tocoferóis.

Baseado nos dados apresentados nestas tabelas obteve-se a curva teórica da variação do fator de concentração dos tocoferóis (**Equação 1**) em função da remoção de sólidos (**Equação 2**) como apresentado na **Figura 11**.

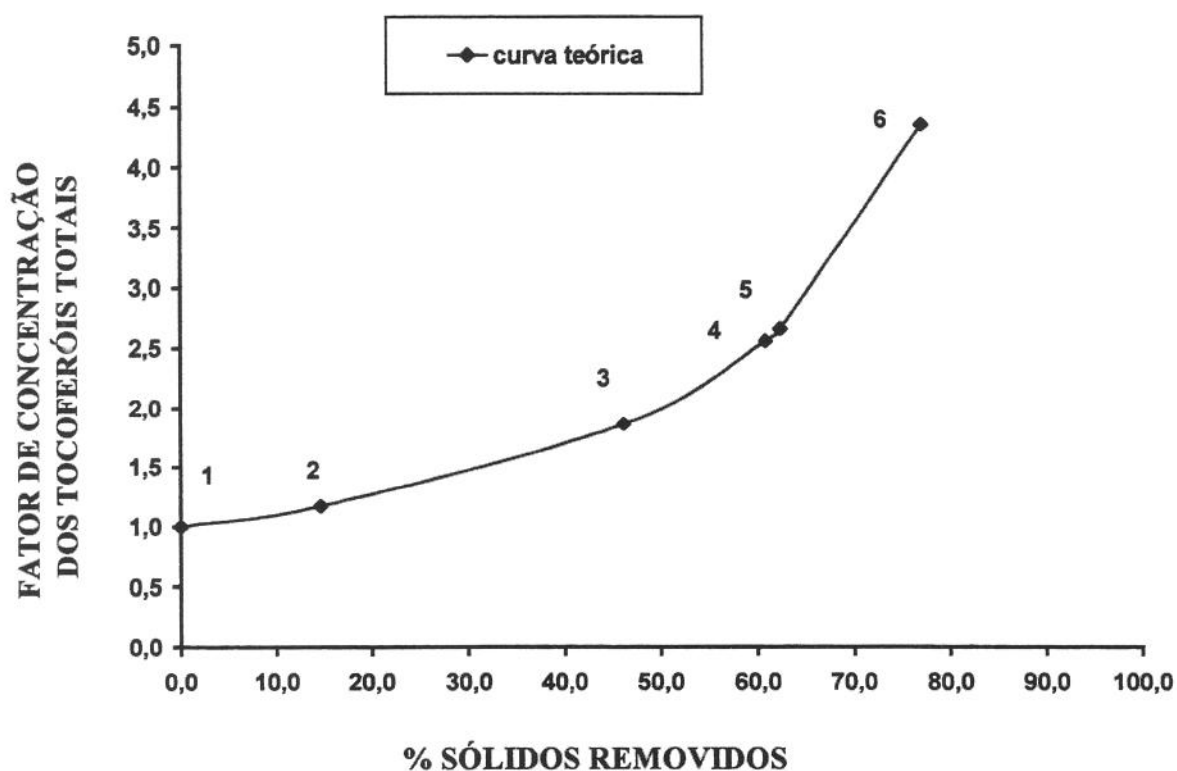


Figura 11: Fator de concentração teórico de tocoferóis totais resultante da remoção dos: sem extração (1); esteróis (2) , ácidos graxos livres (3), da soma dos ácidos graxos livres e esteróis (4), ácidos graxos totais (5), da soma dos ácidos graxos totais e esteróis (6) .

Isto é, a curva teórica mostra como aumentaria a concentração dos tocoferóis caso não houvesse perdas deste durante o processo de remoção dos diversos grupos de substâncias presentes no DDOS como ácidos graxos livres, esteróis, etc.

Denominou-se "sólidos" o teor de resíduo da evaporação, como citado no **item 3.2**, das amostras coletadas das fases líquidas (ricas em tocoferóis) resultantes da filtração e centrifugação, dos diversos procedimentos empregados para a obtenção dos concentrados de tocoferóis. Os valores denominados "percentagem de sólidos removidos", como apresentados em diversos gráficos, foram calculados segundo a **Equação 2** do **item 3.3.2**.

O gráfico aqui mencionado foi usado ao longo da discussão de diversos ensaios para avaliar sua eficiência na concentração dos tocoferóis.

4.2 - Extração de Tocoferóis por Cristalização Isotérmica

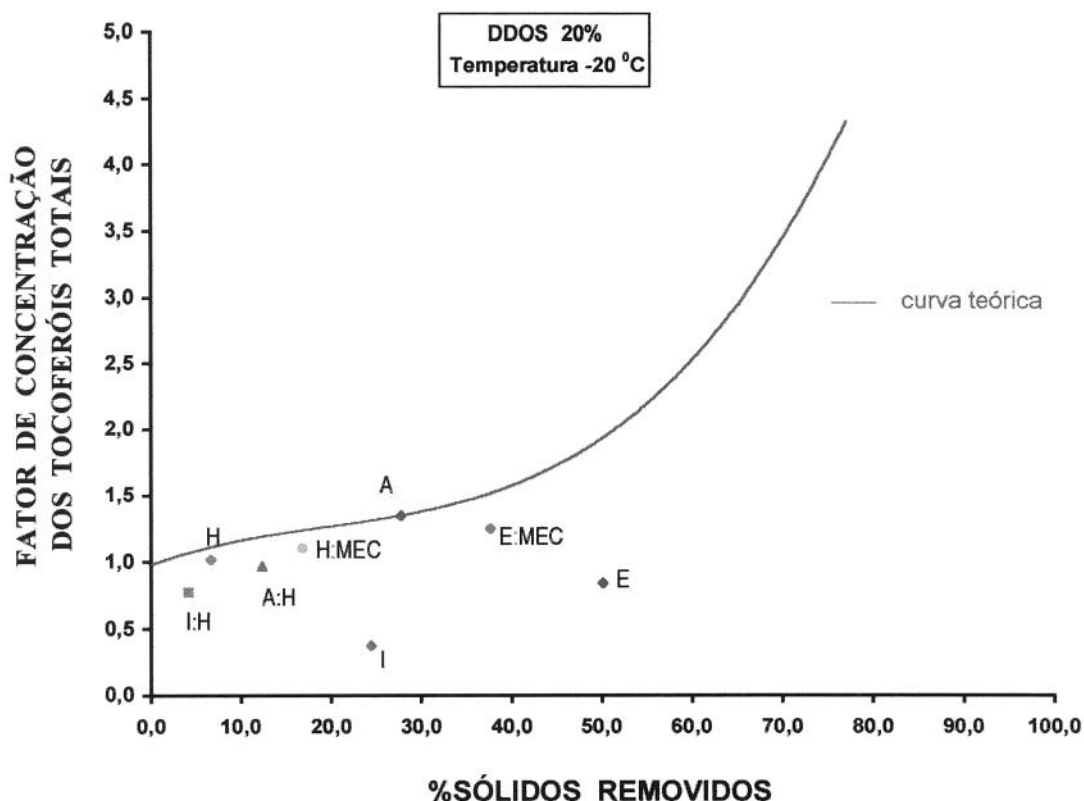
No estudo da extração dos tocoferóis por cristalização isotérmica foram avaliadas a influência do solvente, da concentração de DDOS e da temperatura. Os diversos experimentos foram conduzidos de acordo com o fluxograma apresentado na **Figura 5**.

As misturas azeotrópicas de solventes se apresentam como uma opção adequada à extração de tocoferóis devido ao seu baixo ponto de ebulição (**Tabela 19**). Além do mais, há pouca informação na literatura consultada, sobre o uso destes solventes na extração de tocoferóis do DDOS.

Dos testes preliminares realizados, como descrito no **item 3.3.3.1**, foram selecionadas as misturas azeotrópicas de solventes empregadas neste ensaio.

A **Figura 12** apresenta o fator de concentração em função da porcentagem de sólidos removidos para os ensaios que empregaram cristalização à -20°C , com DDOS na concentração 20% (m/v) em diversos solventes e misturas azeotrópicas de solventes.

Dentre as misturas azeotrópicas de solventes empregadas, apenas o Hexano:Metil Etil Cetona, resultou em uma concentração dos tocoferóis próxima à curva teórica, porém a fração de sólidos removidos apresentou-se muito baixa.



H – Hexano A – Acetona E – Etanol I - Isopropanol
 A : H - Acetona : Hexano E : MEC - Etanol : Metil Etil Cetona
 I : H- Isopropanol : Hexano H : MEC - Hexano : Metil Etil Cetona

Figura 12: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica a -20°C, em diversos solventes, com 20% de DDOS.

O maior percentual de sólidos removidos foi obtido com a mistura Etanol:Metil Etil Cetona, porém, com concentração dos tocoferóis inferior ao caso ideal. Pode-se comparar esta mistura azeotrópica, que apresentou cerca de 38% sólidos removidos, com a acetona, que tendo removido 10% a menos de sólidos apresentou fator de concentração superior, próximo ao valor teórico.

Os ensaios efetuados com os solventes hexano e acetona apresentaram concentração dos tocoferóis com valores muito próximos à curva teórica, porém, a remoção de sólidos mostrou-se pouco eficiente com o uso de hexano.

O inverso ocorre com relação ao etanol, cujo emprego resultou em maior porcentagem de sólidos removidos, porém, com elevada perda de tocoferóis. O uso do isopropanol como solvente neste experimento, revelou que, embora, seu valor de porcentagem de sólidos removidos seja semelhante ao dos solventes mais eficientes, como acetona por exemplo, ele apresentou uma elevada perda de tocoferóis, da ordem de 60% em relação ao valor inicial.

A **Figura 13** apresenta o fator de concentração em função da fração de sólidos removidos para os ensaios que empregaram cristalização à -20°C , com DDOS na concentração 16,7% (m/v) em diversos solventes.

O gráfico da **Figura 13** apresenta a seguinte ordem de solventes em função do incremento na porcentagem de sólidos removidos: hexano, acetona, etanol e metanol.

Os ensaios efetuados com os solventes hexano e acetona apresentaram desempenho semelhante ao visto nos experimentos com DDOS na concentração 20% (**Figura 12**), isto é, com concentração dos tocoferóis com valores muito próximos à curva teórica, porém, com remoção de sólidos ineficiente.

De um modo geral, os solventes acetona e hexano foram mais seletivos em relação ao tocoferol, isto é, proporcionam uma concentração dos tocoferóis com valores muito próximos à

curva teórica, entretanto a remoção de sólidos apresentou-se pouco eficiente. Etanol e metanol apresentaram maior porcentagem de sólidos removidos, porém, com elevada perda de tocoferóis. Provavelmente, decorrente de retenção física na massa dos compostos que cristalizaram.

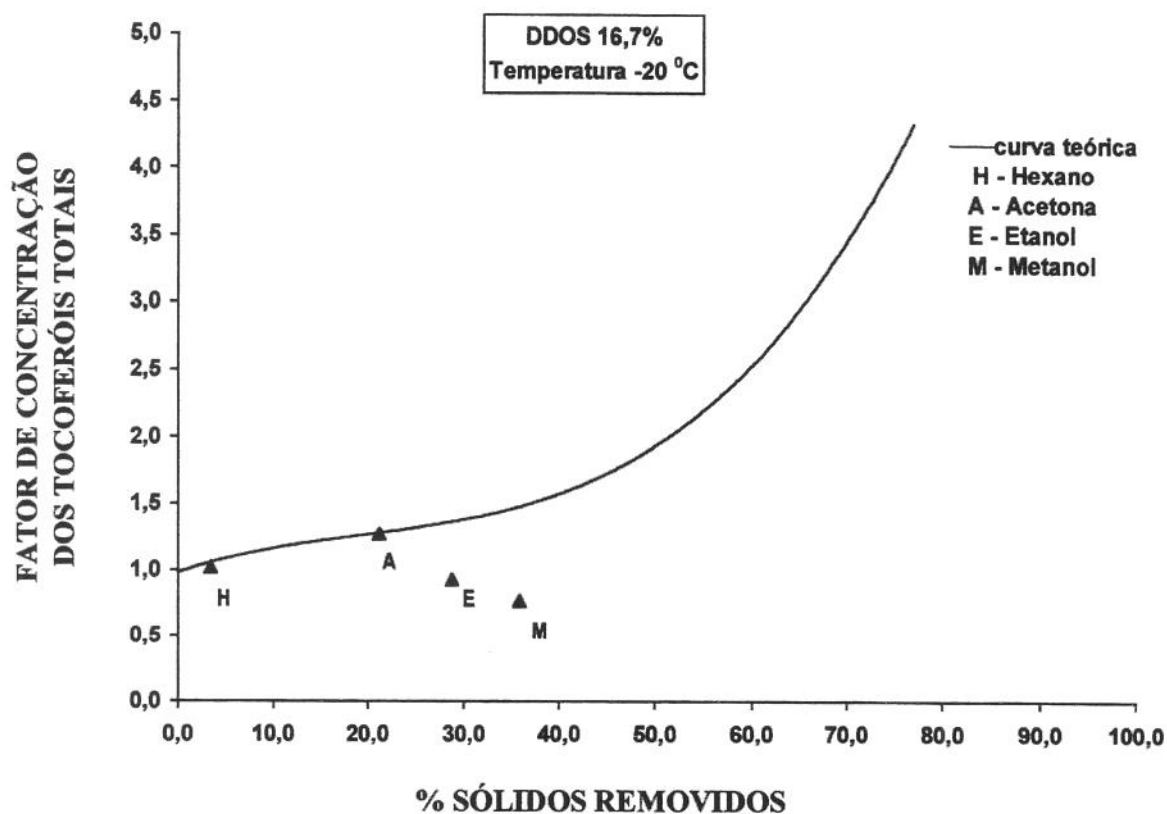


Figura 13: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -20°C, em diversos solventes, com 16,7% de DDOS.

Uma avaliação dos resultados da extração dos tocoferóis por cristalização, pode ser feita analisando-se o comportamento individual dos componentes do DDOS.

Os esteróis representam cerca de 15% do DDOS e são solúveis nas condições do ensaio (tipo de solvente e

temperatura) portanto, teoricamente permaneceriam em solução, juntamente com os tocoferóis.

Os ácidos graxos presentes no DDOS possuem características próprias de solubilidade, como apresentado na **Tabela 9**. Baseado nestes dados podemos fazer uma estimativa de como, teoricamente, estes compostos se comportariam nos diversos processos de extração em discussão.

O ácido linoleico, que representa aproximadamente 26% dos ácidos graxos presentes no DDOS (**Tabela 24**), possui alta solubilidade em qualquer dos solventes usados no experimento, inclusive para a faixa de concentração na solução DDOS (16,7g/100 mL). Assim sendo, este ácido graxo não cristalizaria nos ensaios efetuados a -20°C e, portanto, não seria removido do meio.

Com relação ao ácido oleico, o segundo colocado em concentração no DDOS (15,6%), possui solubilidade nos solventes usados muito inferior ao ácido linoleico.

O ácido palmítico, que perfaz cerca de 11% do DDOS, é insolúvel em hexano, etanol e metanol, nas temperaturas trabalhadas (-20°C e -80°C). Isto é, o ácido palmítico irá compor os sólidos removidos.

Em menor concentração apresenta-se o ácido esteárico (2,4%), que embora seja solúvel somente em acetona e metanol, a sua concentração na solução de DDOS é muito baixa, da ordem de mg/100g, contribuindo com uma pequena fração dos sólidos removidos.

De acordo com a solubilidade destes ácidos graxos em diversos solventes à diversas temperaturas, pode-se observar que a redução de temperatura para -20°C é eficiente para a remoção do ácido esteárico e palmítico, mas continuam em solução os ácidos linoleico e oleico.

A **Figura 14** apresenta o fator de concentração em função da porcentagem de sólidos removidos para os ensaios que empregaram cristalização conduzida à -80°C , com DDOS na concentração 10% (m/v) em diversos solventes.

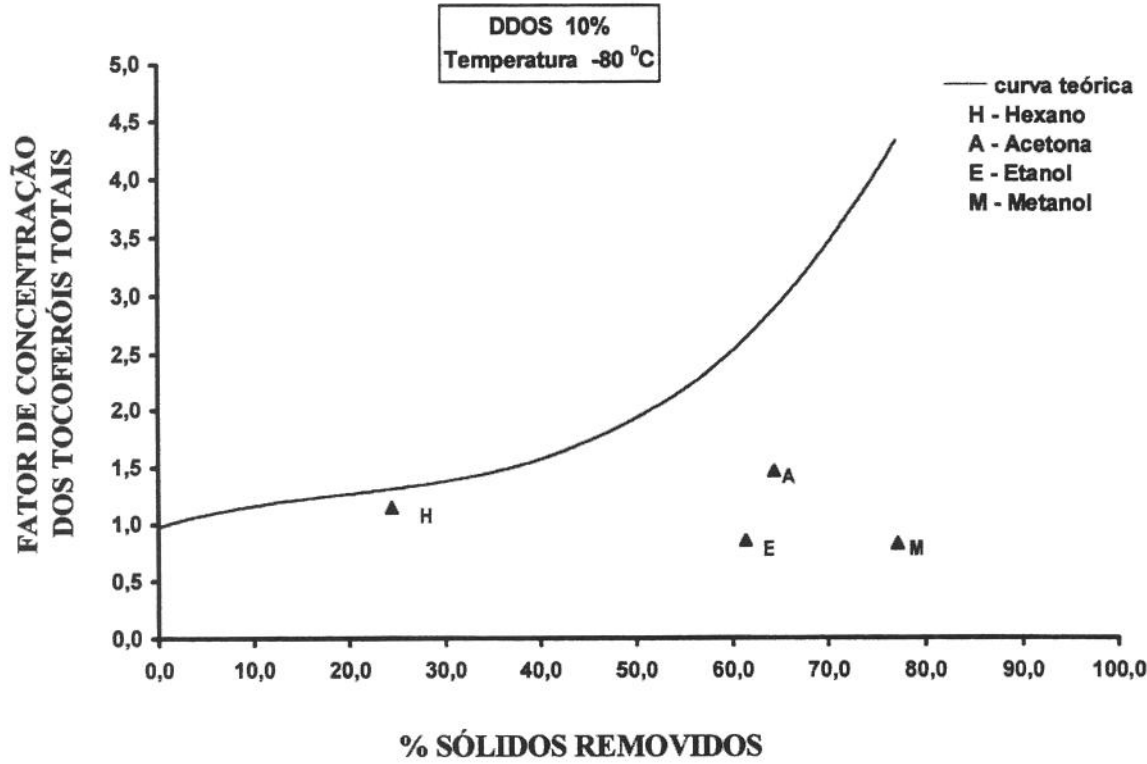


Figura 14: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -80°C , em diversos solventes, com 10% de DDOS.

Baseado nas características de solubilidade dos ácidos graxos apresentadas na **Tabela 9**, podemos fazer uma avaliação do processo de extração em discussão.

O ácido linoleico, que representa 26% da massa do DDOS, é insolúvel abaixo de -70°C em hexano e etanol, nos demais solventes sua solubilidade é muito baixa, inferior a 0,5g/100g. Assim, teoricamente, este composto cristalizaria na temperatura usada (-80°C), portanto apresentaria uma alta contribuição na remoção de sólidos.

Com relação ao ácido oleico, que representa 15,6% dos sólidos presentes no DDOS, possui características de solubilidade semelhantes ao ácido linoleico. Abaixo de -60°C é insolúvel em hexano e etanol e a solubilidade em acetona e metanol é muito baixa, da ordem de mg/100g solvente.

O ácido palmítico e o ácido esteárico, que perfazem 11% e 2,4% dos sólidos presentes no DDOS, respectivamente, também possuem características de solubilidade semelhantes ao ácido linoleico, porém abaixo de -20°C .

Nos experimentos realizados a -80°C os ácidos graxos presentes no DDOS, são praticamente insolúveis. Os dados experimentais tem comportamento semelhante ao esperado teoricamente para os solventes acetona, etanol e metanol, no que diz respeito à remoção de sólidos.

O hexano apresentou desempenho muito inferior aos outros solventes, com relação à remoção de sólidos ($< 25\%$), mas por outro lado proporcionou concentração dos tocoferóis mais próximo à curva teórica. Isto pode indicar uma seletividade deste solvente, isto é, separou com maior eficiência os tocoferóis da fração de ácidos graxos e esteróis, que permaneceu insolúvel, mesmo representando apenas 24,4% dos sólidos iniciais.

O uso de acetona, embora tenha propiciado uma alta taxa de remoção de sólidos (64,4%) e o maior fator de concentração dos tocoferóis, ainda está longe do caso ideal.

Observando-se o efeito da redução de temperatura de -20°C para -80°C , com o uso de acetona e etanol, pode-se notar que com a diminuição da temperatura, ocorreu aumento na remoção de sólidos e redução do fator de concentração dos tocoferóis em relação ao caso ideal, sugerindo a perda de tocoferóis no processo. Para a acetona houve maior remoção de sólidos em relação ao etanol, efeito inverso ao ocorrido nos ensaios à -20°C e DDOS na concentração 16,7% (**Figura 13**).

Desta maneira, observa-se que a cristalização apenas, não é um processo eficiente para remover os ácidos graxos mono e poliinsaturados, a não ser que se utilizem temperaturas muito baixas, havendo então, a necessidade de avaliar a viabilidade econômica do processo.

Os resultados dos experimentos apresentados nas **Figuras 13** e **14** sugerem que o uso de cristalização fracionada com um único ou múltiplos solventes em etapas subsequentes para a extração de tocoferóis apresentaria resultados mais satisfatórios. Empregando-se temperatura na faixa de 10 a -10°C , nas etapas iniciais do processo, conforme o solvente empregado, seriam removidos quase que a totalidade dos ácidos esteárico e palmítico, os demais ácidos graxos seriam removidos sob temperatura inferior como -20 ou -30°C (**Tabela 9**).

Nos diversos ensaios efetuados usando-se hexano, em qualquer temperatura ou concentração de DDOS empregadas, este solvente tem apresentado um comportamento singular, isto é,

conjugou uma baixa porcentagem de sólidos removidos com um fator de concentração próximo à curva teórica. Em virtude disto e baseando-se nos dados obtidos dos testes efetuados a -80°C , que apresentaram valores mais elevados para a porcentagem de sólidos removidos, foi executado o experimento cujos resultados encontram-se na **Figura 15**.

Os ensaios foram conduzidos com hexano à -80°C , empregou-se soluções de DDOS nas concentrações 10, 15 e 20 % (m/v). A **Figura 15** apresenta o fator de concentração em função da porcentagem de sólidos removidos.

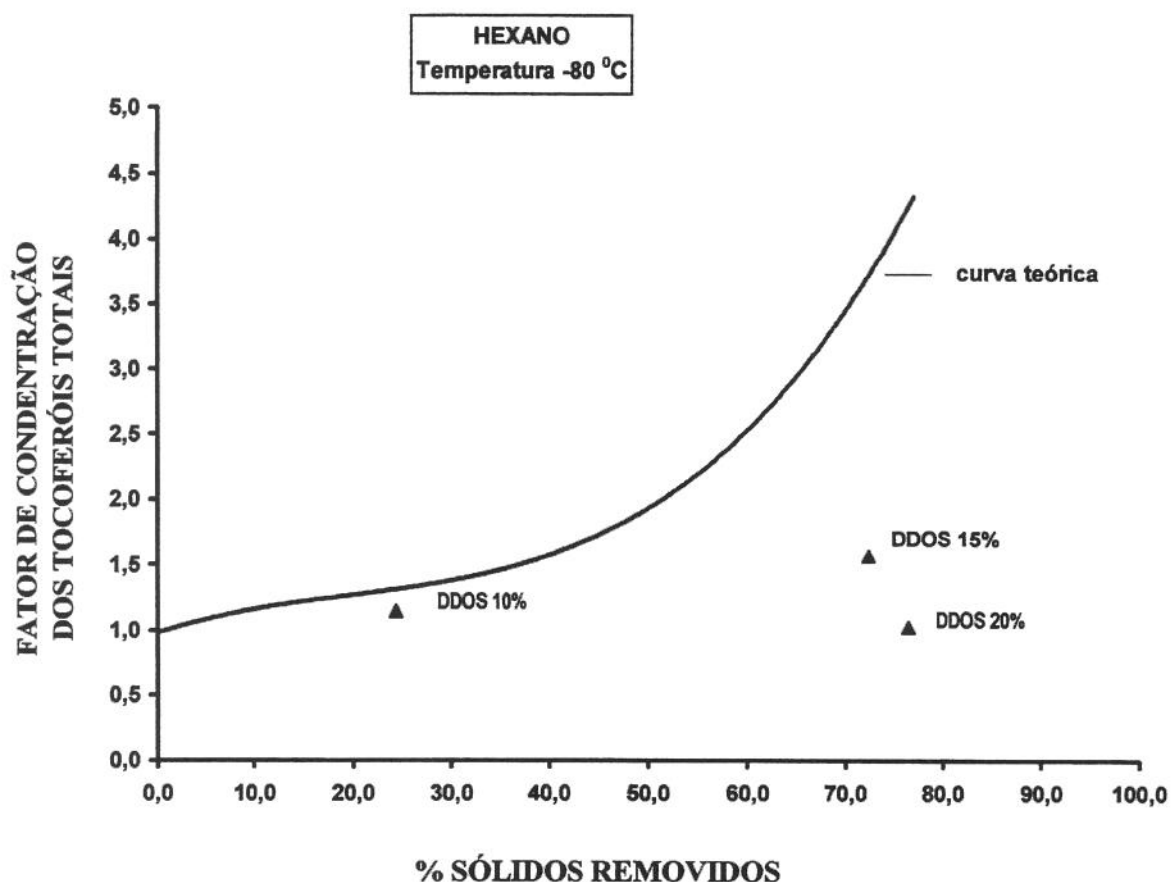


Figura 15: Fator de concentração dos tocoferóis em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -80°C , em hexano para diversas concentrações de DDOS.

Pela tabela de solubilidade dos ácidos graxos (**Tabela 9**) verifica-se que a -80°C a totalidade dos mesmos é insolúvel em hexano. Isto justifica a alta porcentagem de sólidos removidos, exceto para o teste com 10% DDOS, que seguiu a tendência já citada anteriormente.

Os ensaios com DDOS nas concentrações 15% e 20% apresentaram uma porcentagem de sólidos removidos acima de 70%. Neste caso, em particular, ocorreu não apenas a remoção dos ácidos graxos totais, uma vez que representam apenas 62% do DDOS, como provavelmente de uma fração da matéria insaponificável, incluindo os tocoferóis. Explicando, assim, o seu baixo fator de concentração em relação à curva teórica.

Na cristalização à -80°C o aumento na concentração do DDOS reduziu o fator de concentração dos tocoferóis provavelmente pelo maior teor de sólidos formados e removidos nas soluções com 15% e 20% de DDOS. Nestas concentrações pode ter ocorrido retenção de solvente entre os cristais formados resultando em perdas de tocoferóis.

4.3 - Emprego da Saponificação na Obtenção de Concentrados de Tocoferóis

4.3.1 - Influência da Adição de Hidróxido de Cálcio na Extração dos Tocoferóis.

A saponificação foi realizada utilizando-se $\text{Ca}(\text{OH})_2$ conforme descrito no item 3.3.4.2. Nas Figuras 16 a 19 são apresentados o fator de concentração em função da fração de acetona no solvente, para as soluções contendo 10, 15, 20 e 25% de DDOS, respectivamente. Nestas figuras é feita uma comparação entre os resultados obtidos para a extração dos tocoferóis na presença de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (com saponificação) e na sua ausência.

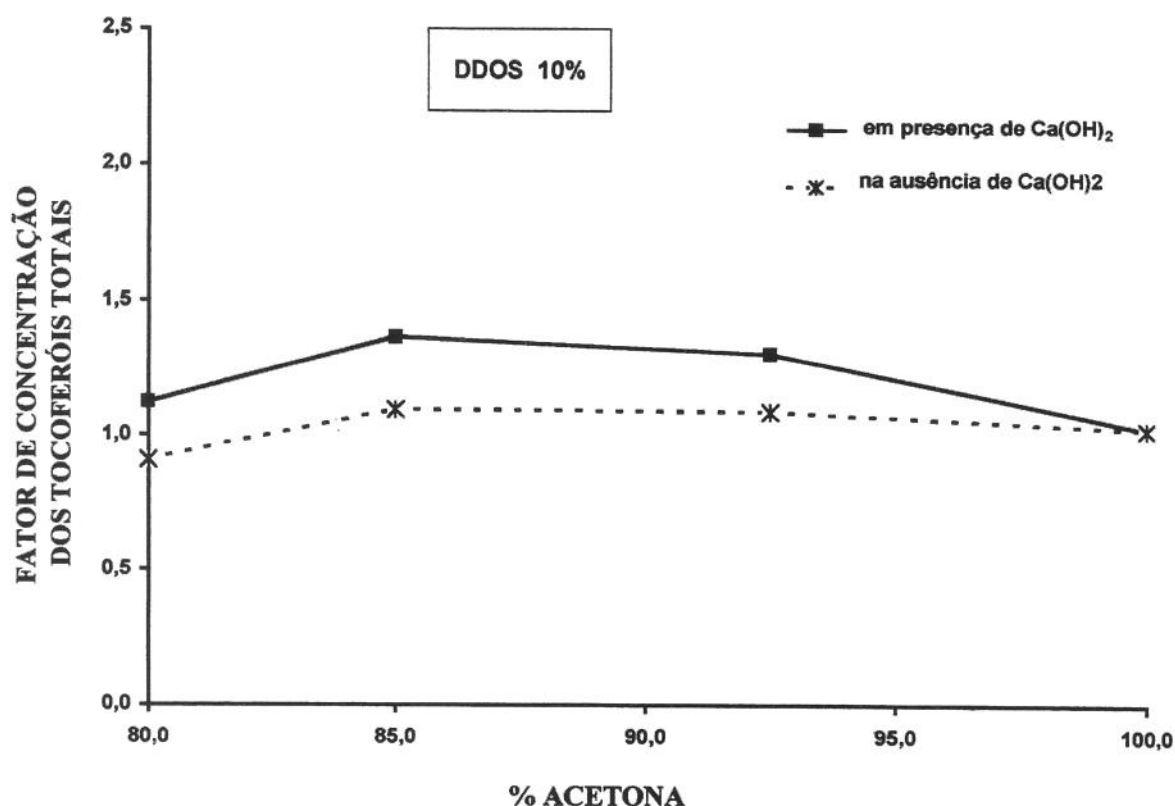


Figura 16: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ empregando-se solução com 10% de DDOS (% m/v) a 0°C .

Verificou-se que os ensaios efetuados com 10% e 15% de DDOS apresentaram comportamento semelhante. Isto é, para as

misturas de solventes com composição entre 80% e 92,5% de acetona, a saponificação permitiu uma maior concentração de tocoferóis (**Figura 16 e 17**) .

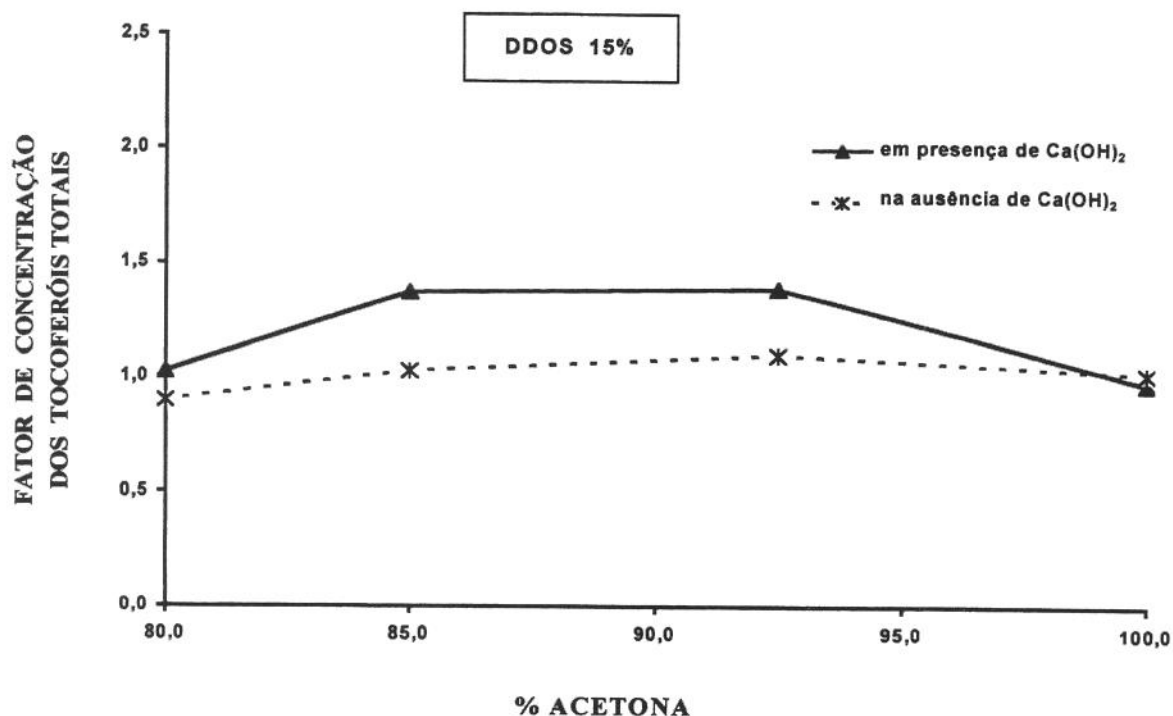


Figura 17: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 empregando-se solução com 15% de DDOS (% m/v) a 0°C .

Quando emprega-se 20% de DDOS nos ensaios, pode-se notar pela **Figura 18**, que o fator de concentração para a mistura contendo 80% de acetona e para acetona não é influenciado pela saponificação. Por outro lado, para os testes onde a mistura de solventes contendo 85% e 92,5% de acetona, a saponificação exerceu grande influência na concentração dos tocoferóis, como demonstrado pelo aumento no fator de concentração.

Pode-se dizer que os ensaios que apresentaram um efeito mais acentuado da saponificação na extração dos tocoferóis foram aqueles cujo solvente continha 92,5% de acetona e onde

se usou 20% e 25% de DDOS. Para estes ensaios o fator de concentração dos tocoferóis e as porcentagens de sólidos removidos mostram valores acentuadamente maiores nos testes com saponificação (**Figuras 16 a 20**). O inverso ocorreu com a porcentagem de tocoferóis recuperados, a saponificação reduziu drasticamente este valor (**Figura 21**).

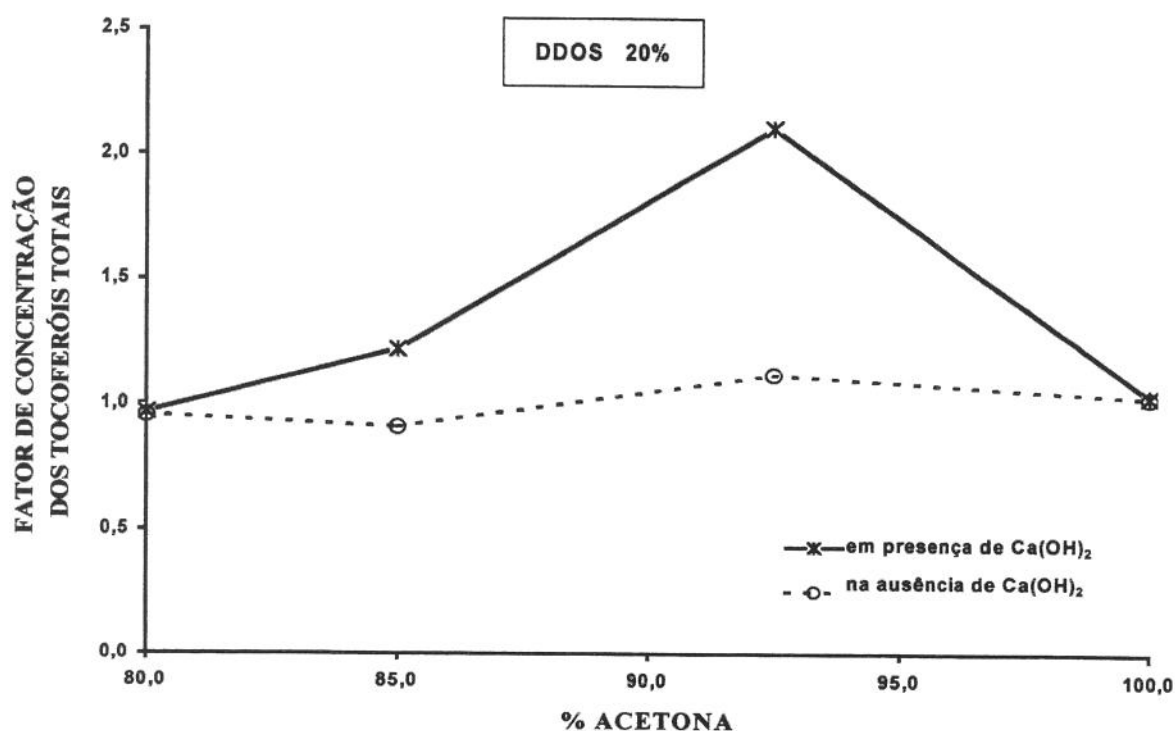


Figura 18: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 empregando-se solução com 20% de DDOS (% m /v) a 0°C .

Os gráficos das **Figuras 20 e 21** mostram que para os ensaios com saponificação com 92,5% de acetona, um aumento na concentração de DDOS resulta em aumento na remoção de sólidos e redução na porcentagem de tocoferóis recuperados durante a extração.

De um modo geral, o fator de concentração dos tocoferóis de todos os ensaios realizados sem saponificação não apresentou muita diferença com a variação da porcentagem de acetona usada na solução.

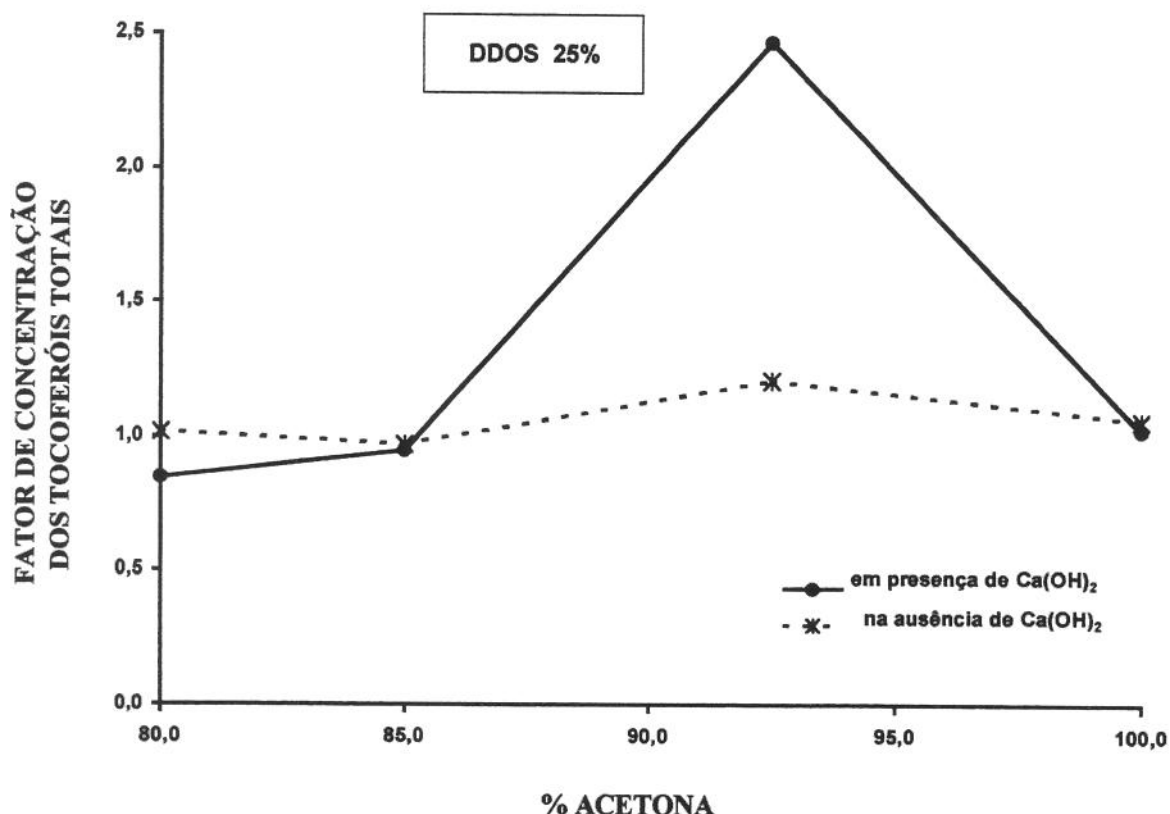


Figura 19: Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 empregando-se solução com 25% de DDOS (% m/v) a 0°C .

O uso da acetona pura como solvente fez com que não houvesse diferença entre os testes feitos com e sem saponificação para todos os ensaios com relação ao fator de concentração dos tocoferóis, e na maioria deles com relação à porcentagem de recuperação dos tocoferóis e porcentagem de sólidos removidos (**Figura 20 e 21**). A ausência de água na mistura dificultaria a formação dos sais de cálcio, somando-se ao fato dos lipídeos presentes no DDOS serem todos solúveis em acetona pura.

De todos os ensaios avaliados aquele com DDOS 25% e acetona 92,5% apresentou-se como o mais eficiente em termos de fator de concentração e remoção de sólidos.

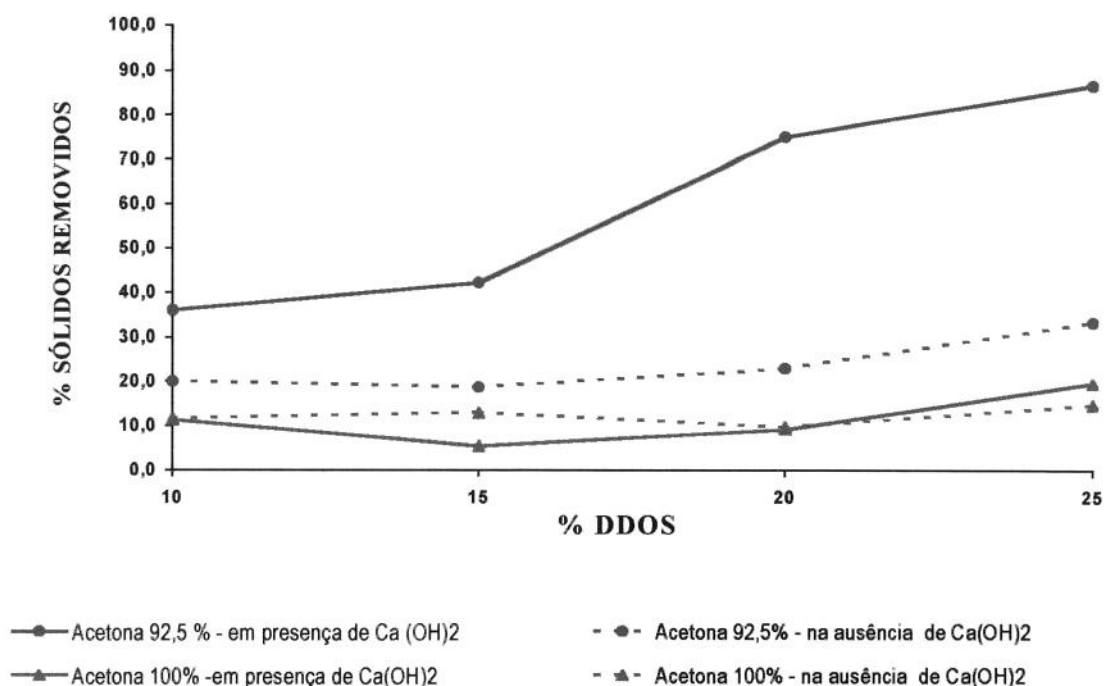


Figura 20: Fração de sólidos removidos em função da concentração de DDOS e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 , para solução acetona:água a 92,5% e acetona, a 0°C.

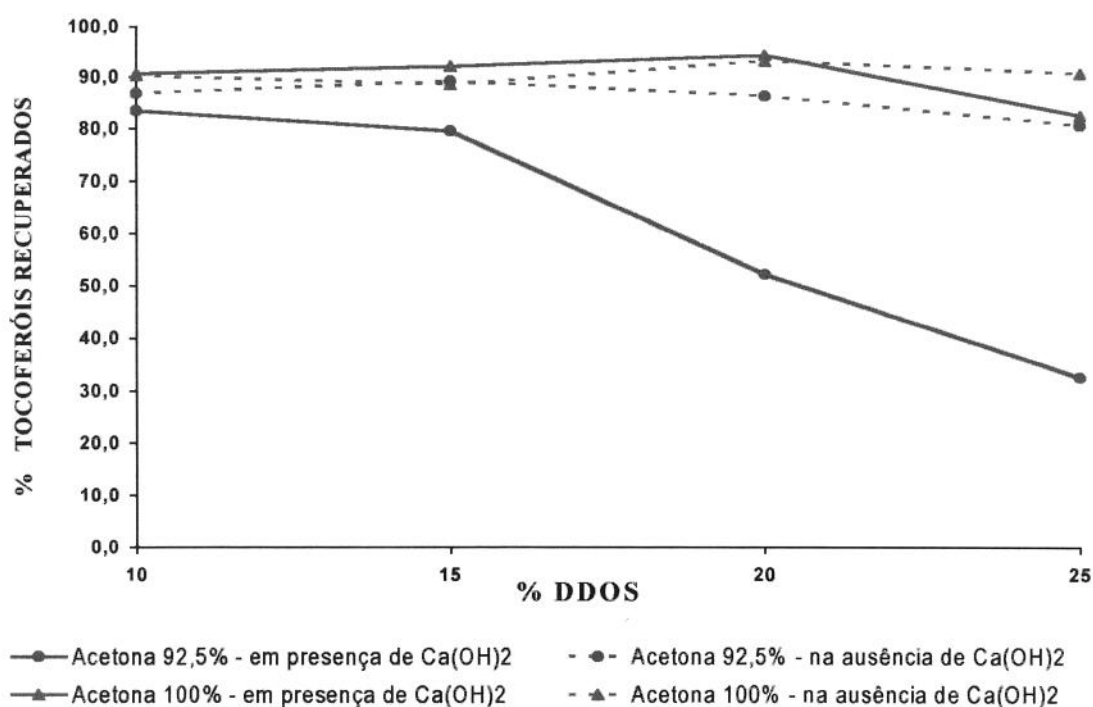


Figura 21 Fração de tocoferóis recuperados em função da concentração de DDOS e da presença ou ausência de Ca(OH)_2 , para solução acetona:água a 92,5% e acetona, a 0°C.

Este experimento segue a tendência dos demais, isto é, uma elevada porcentagem de remoção dos sólidos vem acompanhada de uma baixa porcentagem de recuperação dos tocoferóis. Isto pode ser explicado pelo arraste de tocoferóis pelos sólidos removidos, ou sua degradação durante o processo de extração. O arraste de tocoferóis é facilitado pelo fato dos sais de ácidos graxos agirem como emulsificantes levando parte daqueles para a fase aquosa.

Da avaliação dos resultados apresentados foi selecionado o teste com os parâmetros 92,5% de acetona no solvente e 20% de DDOS, pois este apresentou porcentagem de recuperação de tocoferóis mais elevada que o teste com 25% de DDOS, embora este último tenha apresentado fator de concentração ligeiramente superior.

Dos ensaios para avaliar qual o teor de Ca(OH)_2 mais adequado para efetuar a saponificação verificou-se que o Ca(OH)_2 na concentração 16g/L, na dispersão, resultou no maior fator de concentração dos tocoferóis (**Tabela 25**). Observa-se o aumento gradual deste fator com o aumento na concentração de Ca(OH)_2 até 16g/L, a partir deste valor ocorre um decréscimo no fator de concentração dos tocoferóis.

Comportamento inverso ocorre com a porcentagem de tocoferóis recuperados, que decresce com o aumento do teor de Ca(OH)_2 . Esta redução pode ser explicada pela retenção mecânica ou física dos tocoferóis no hidróxido que não reagiu, estando este fenômeno dissociado da eficiência da saponificação propriamente dita. A retenção provavelmente não é seletiva, pode englobar não só os tocoferóis como também os esteróis e os sais de cálcio formados na reação, o que nos dois últimos casos seria um benefício.

Tabela 25: Influência do teor de Ca(OH)_2 no fator de concentração e na recuperação dos tocoferóis empregando-se DDOS 20%, solução acetona:água na concentração 92,5 de acetona a 0°C.

Ca(OH)_2 (g/L)*	Fator de Concentração	% Tocoferóis Recuperados
4	$1,6 \pm 0,2$	$53,0 \pm 0,2$
8	$1,7 \pm 0,2$	$52,6 \pm 0,3$
12	$2,3 \pm 0,2$	$50,2 \pm 0,3$
16	$2,5 \pm 0,2$	$51,0 \pm 0,3$
20	$2,2 \pm 0,2$	$48,0 \pm 0,2$
30	$2,1 \pm 0,2$	$46,0 \pm 0,3$

* concentração na dispersão (item 3.3.4.1)

4.3.2 - Influência da Composição da Solução Acetona : Água na Extração dos Tocoferóis

Os ensaios foram efetuados à 0°C e com concentração de hidróxido de cálcio na dispersão a 15g/L. Na **Figura 22** é apresentado o fator de concentração de tocoferóis em função da concentração de DDOS e da composição da solução acetona-água.

Avaliando-se o gráfico apresentado na **Figura 22**, verifica-se que os experimentos conduzidos com 5%, 10% e 15% em massa de DDOS apresentaram comportamento semelhante para todas as concentrações de acetona, não havendo variação significativa no fator de concentração com a composição da solução acetona-água.

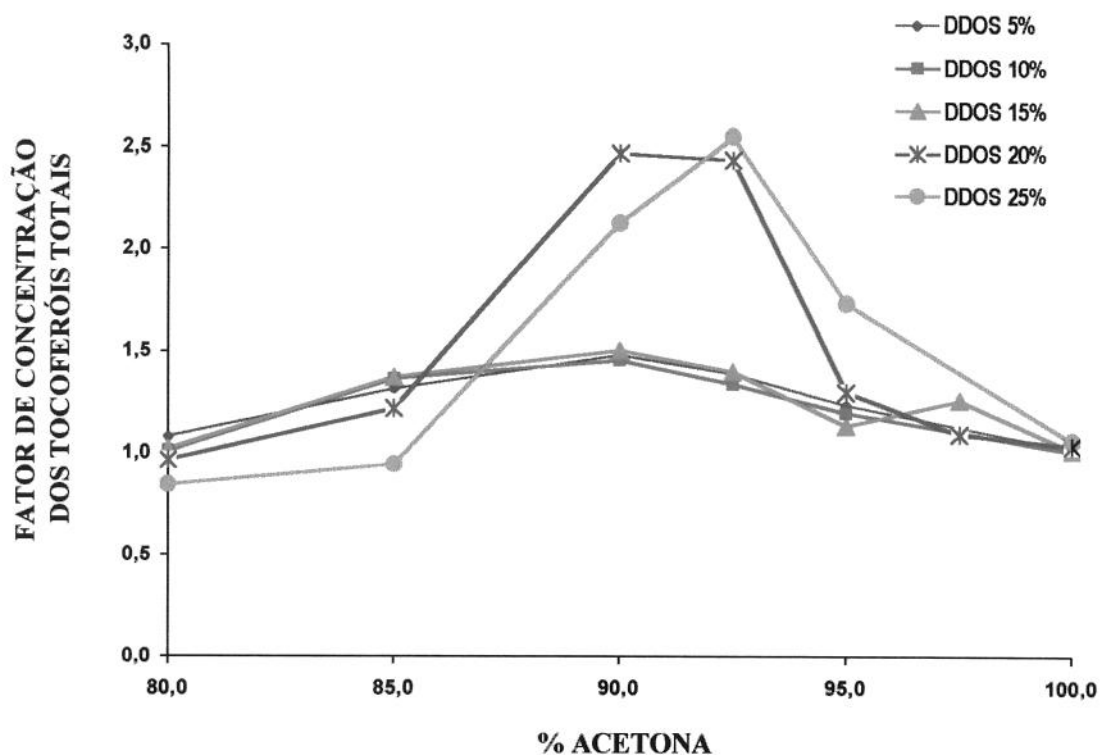


Figura 22: Fator de concentração dos tocoferóis em função da concentração de DDOS e da composição da solução acetona:água na extração por saponificação à 0°C.

A acetona pura mostrou-se ineficiente na separação de tocoferóis, independentemente da concentração de DDOS.

Merecem destaque os valores obtidos dos experimentos efetuados com 20% e 25% de DDOS. Ambos apresentaram comportamento semelhante entre si e bem diferenciado do obtido com as demais concentrações de DDOS, especialmente para soluções contendo de 90% a 95% de acetona, nas quais o fator de concentração foi cerca de duas vezes superior aos demais experimentos.

Dentre todos os experimentos executados o melhor resultado foi alcançado para a solução com 92,5% de acetona e 25% em massa de DDOS seguido da solução com 90% de acetona e 20% de DDOS.

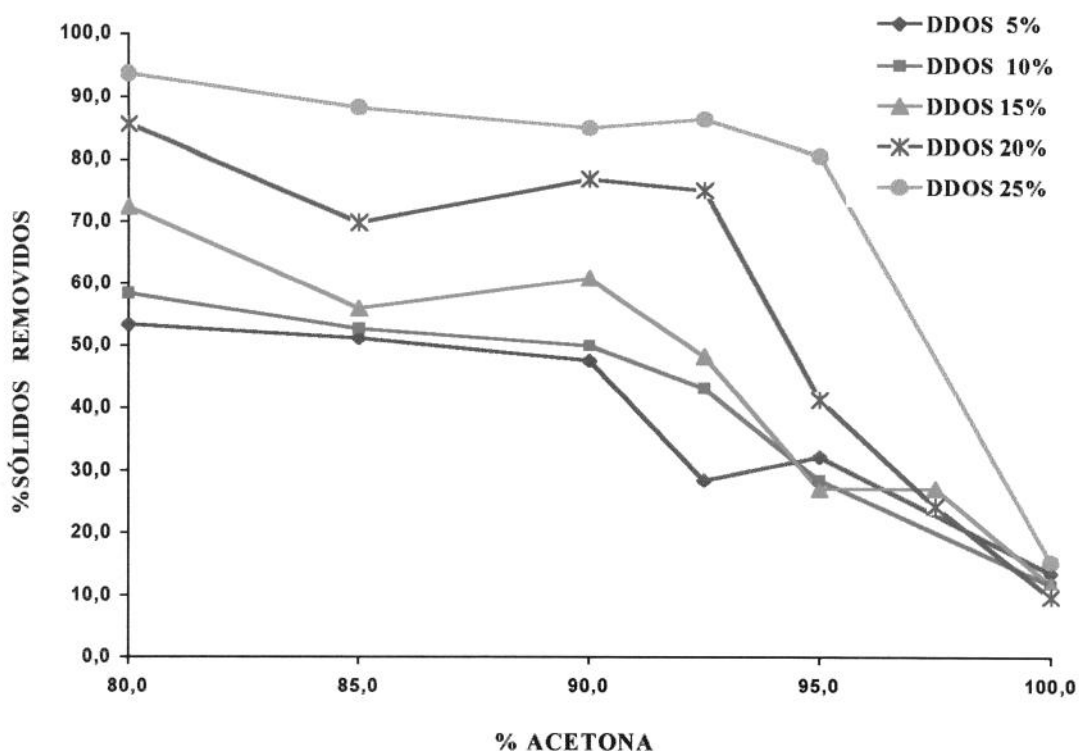


Figura 23: Sólidos removidos em função da concentração de DDOS e da composição da solução acetona:água na extração por saponificação à 0°C.

O teor de sólidos removidos aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração do DDOS, em soluções contendo até 95% em acetona, como apresentado no gráfico da **Figura 23**. Para uma mesma concentração de DDOS, o aumento da concentração de acetona na solução causa uma ligeira variação no teor de sólidos removidos, até 92,5% de acetona e, então, cai acentuadamente.

O emprego de acetona pura apresentou a menor remoção de sólidos, com valores semelhantes para todas as concentrações de DDOS testadas.

Observou-se uma maior concentração de tocoferóis na faixa de 90 a 92,5% de acetona (**Figura 22**). Nesta faixa de

composição da solução acetona-água tem-se a maximização da solubilidade de tocoferóis e a minimização da solubilidade dos produtos da saponificação e outros compostos presentes na matéria insaponificável. Reduzindo-se o teor de acetona ocorre perda de solubilidade dos tocoferóis, por outro lado o emprego de acetona pura leva a máxima solubilização de todos os componentes do DDOS, havendo uma perda de seletividade na solubilização. Em ambos os casos, a eficiência na concentração dos tocoferóis é muito baixa.

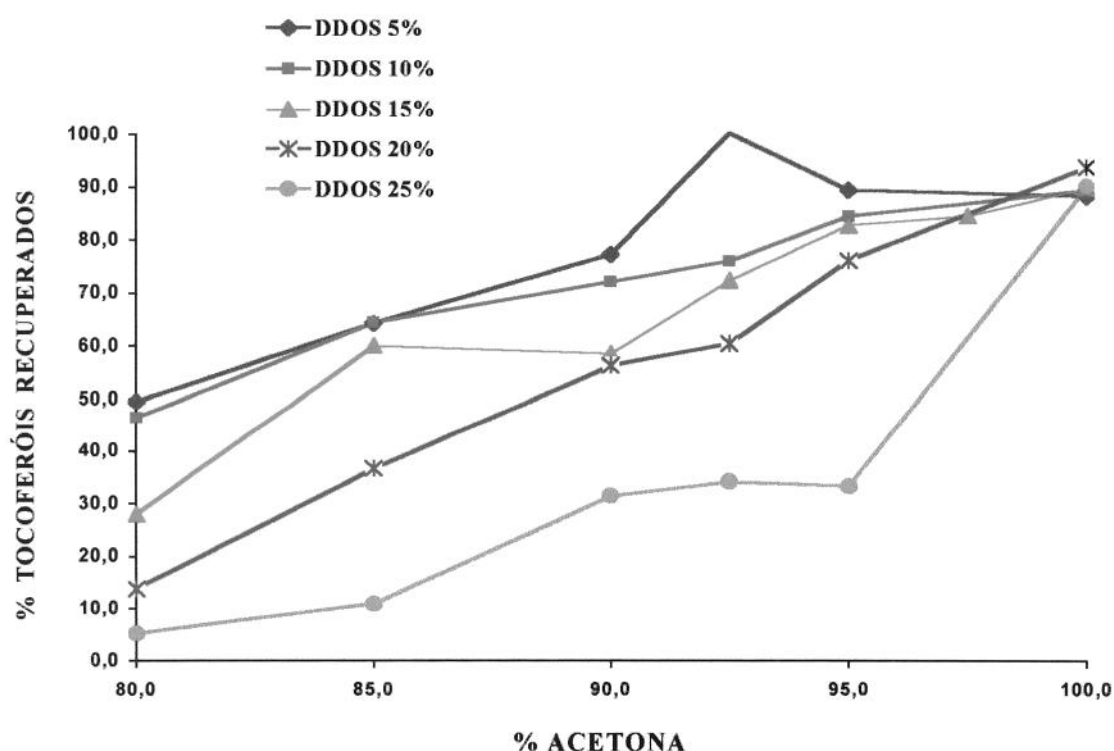


Figura 24: Recuperação dos tocoferóis em função da concentração de DDOS e da composição da solução acetona:água na extração por saponificação à 0°C.

Avaliando-se o gráfico da **Figura 24**, verificou-se que, de um modo geral, o aumento na porcentagem de tocoferóis recuperados foi diretamente proporcional ao aumento da porcentagem de acetona no solvente. Somando a este fato, temos

que nos experimentos com concentração de acetona de 80 a 95%, o aumento da concentração de DDOS resulta em perda na eficiência da recuperação de tocoferóis.

Isto pode ser explicado pelo fato dos tocoferóis apresentarem maior solubilidade em acetona pura, o que pode ser notado no experimento com 100% de acetona, onde a porcentagem de tocoferóis recuperados foi semelhante para as diferentes concentrações de DDOS.

De um modo geral, o experimento que apresentou melhor resultado em termos de obtenção de maior concentração dos tocoferóis não foi necessariamente aquele em que houve maior recuperação dos tocoferóis originalmente presentes no DDOS.

Cabe ressaltar que o α é um parâmetro de avaliação da composição do extrato obtido, pois reflete o quanto realmente os tocoferóis foram concentrados na etapa do processo em questão. Por outro lado, a percentagem de tocoferóis totais recuperados, é uma indicação do quanto foi perdido em tocoferóis no processo, tanto por remoção na fase sólida quanto por outros meios, por exemplo, por degradação.

Quanto maior a porcentagem de sólidos removidos durante o processo de concentração dos tocoferóis, menor é a porcentagem de recuperação dos tocoferóis. Este comportamento ocorre em todas as concentrações de DDOS e para as diferentes porcentagens de acetona. Uma provável explicação seria que os tocoferóis também são removidos juntamente com os outros compostos, provavelmente por meio de retenção física na massa formada por hidróxido de cálcio e sabões assim como podem sofrer degradação.

Os sais de cálcio teoricamente formados seriam o linoleato de cálcio, oleato de cálcio, palmitato de cálcio e estearato de cálcio de acordo com a composição em ácidos graxos do DDOS apresentada na **Tabela 24**. Este sais possuem baixa solubilidade em água, como se vê na **Tabela 17**, o oleato de cálcio, que ocupa o segundo lugar em porcentagem dos sais formados, apresenta baixa solubilidade em acetona, os outros sais de cálcio são insolúveis em acetona.

Quanto maior a porcentagem de água presente na solução maior seria a porcentagem de sais que permaneceriam na solução e não seriam removidos na etapa de separação das fases.

No outro extremo, no caso do solvente puro (acetona), a ausência de água na mistura dificultaria a formação dos sais de cálcio, somando-se ao fato dos lipídeos presentes no DDOS serem solúveis em acetona.

O concentrado de tocoferóis dos ensaios que apresentaram os melhores resultados, foi avaliado em termos de tocoferóis individuais e os resultados apresentados na **Tabela 26**. Os cromatogramas das separações dos tocoferóis encontram-se nos **Anexo 10 a 15**.

Os concentrados avaliados apresentaram em termos de tocoferóis individuais a mesma distribuição percentual que a matéria-prima de onde foram extraídos como pode-se ver na **Tabela 23**. Este comportamento é relatado na literatura para diversos métodos de purificação.

Tabela 26: Tocoferóis totais e individuais determinados por CLAE* dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação para avaliação da influência da composição da solução Acetona:Água.

TOCOFERÓIS	25% DDOS		20% DDOS			
	ACETONA 92,5%		ACETONA 90%		ACETONA 92,5%	
	% no	% na fração	% no	% na fração	% no	% na fração
	concentrado	de tocoferóis	concentrado	de tocoferóis	concentrado	de tocoferóis
Total	25,96	100	24,42	100	21,87	100
α	3,54	13,62	3,18	13,01	2,87	13,11
β + γ	15,93	61,37	14,38	58,91	12,91	59,03
δ	6,49	25,00	6,86	28,08	6,09	27,86

*coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300.

4 3.3 - Efeito da Temperatura na Extração dos Tocoferóis

O estudo do efeito da temperatura na extração dos tocoferóis foi realizado empregando-se soluções acetona:água nas proporções em acetona de 100, 95 e 92,5% v/v e DDOS nas concentrações 10, 15 e 20% m/v, mantendo-se fixa a concentração hidróxido de cálcio na dispersão a 15g/L.

Dentre os ensaios realizados, a extração a partir de solução de DDOS na mistura contendo 92,5% de acetona apresentou o maior fator de concentração dos tocoferóis assim como a maior porcentagem de sólidos removidos. Nas **Figuras 25 e 26** estão apresentados o fator de concentração de tocoferóis e a porcentagem de sólidos removidos em função da temperatura.

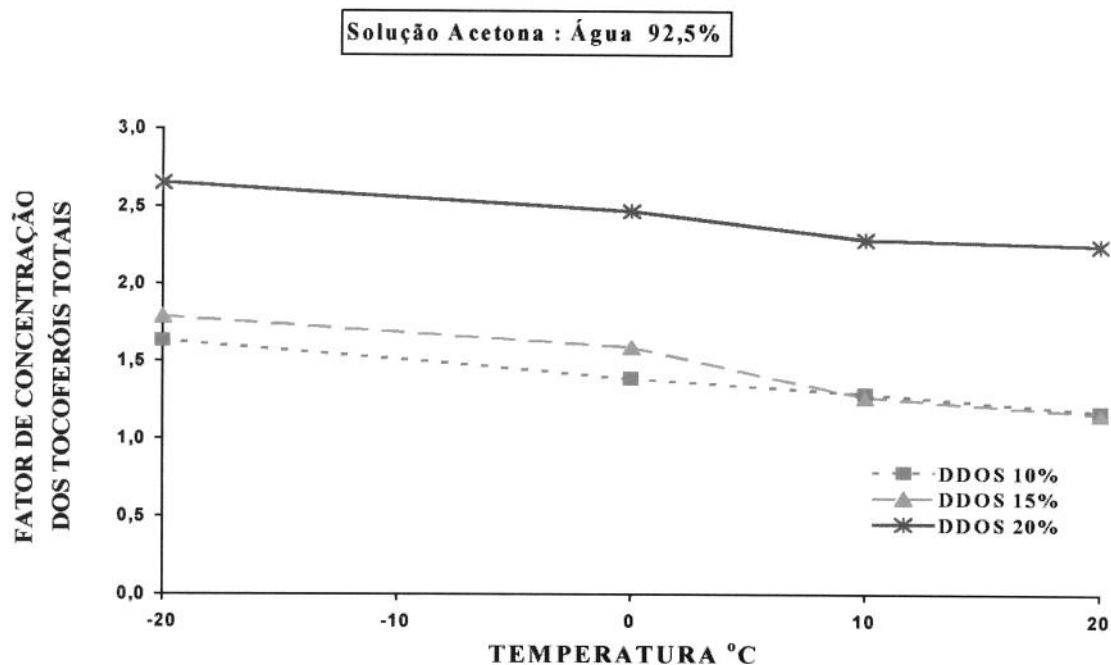


Figura 25: Fator de concentração dos tocoferóis totais em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se solução acetona:água a 92,5%.

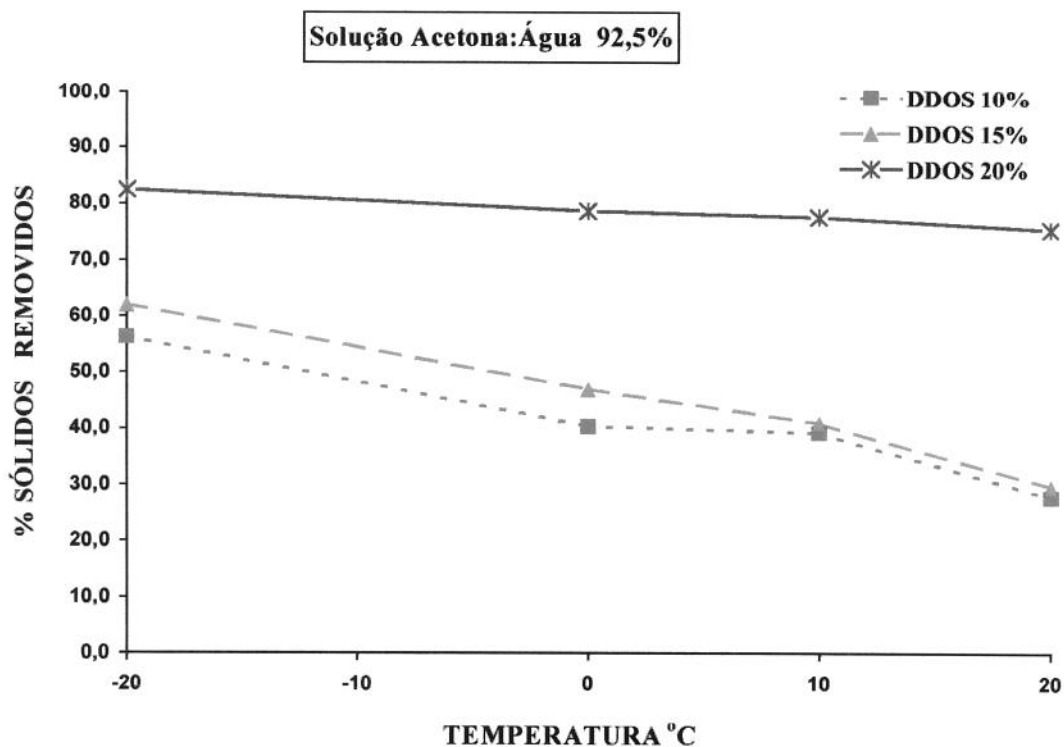


Figura 26: Fração de sólidos removidos em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se solução acetona:água a 92,5%.

Pode-se notar que não há diferença significativa entre os valores obtidos para as temperaturas nas quais os ensaios foram conduzidos, embora haja uma tendência a um decréscimo dos valores com o aumento da temperatura.

De um modo geral, os ensaios com 92,5% de acetona apresentaram um aumento no fator de concentração dos tocoferóis e porcentagem de sólidos removidos com o aumento da concentração do DDOS. O inverso ocorre quando se trata da porcentagem de tocoferóis recuperados, que decresce com o aumento da porcentagem do DDOS na mistura (**Figura 27**).

Considerando o uso do solvente com 92,5 % de acetona, podemos escolher o ensaio com DDOS 20% a -20°C como sendo o mais eficiente em termos de fator de concentração dos tocoferóis e porcentagem de sólidos removidos. Entretanto, como a variação da temperatura proporcionou pequena diferença entre os valores de fator de concentração dos tocoferóis e porcentagem de sólidos removidos neste ensaio, seria adequado avaliar o custo do processo para as diversas temperaturas antes de apontar qual seria a melhor escolha. Por exemplo, pode-se optar por trabalhar à 20°C , uma vez que esta temperatura proporcionou recuperação de tocoferóis ligeiramente superior as demais.

Os resultados dos ensaios efetuados com solução 95% em acetona estão apresentados na **Tabela 27**. Observa-se que a temperatura não exerceu influência no fator de concentração para as diversas concentrações de DDOS empregadas.

Os melhores resultados foram obtidos empregando-se DDOS na concentração de 20%.

Solução Acetona : Água 9 2,5%

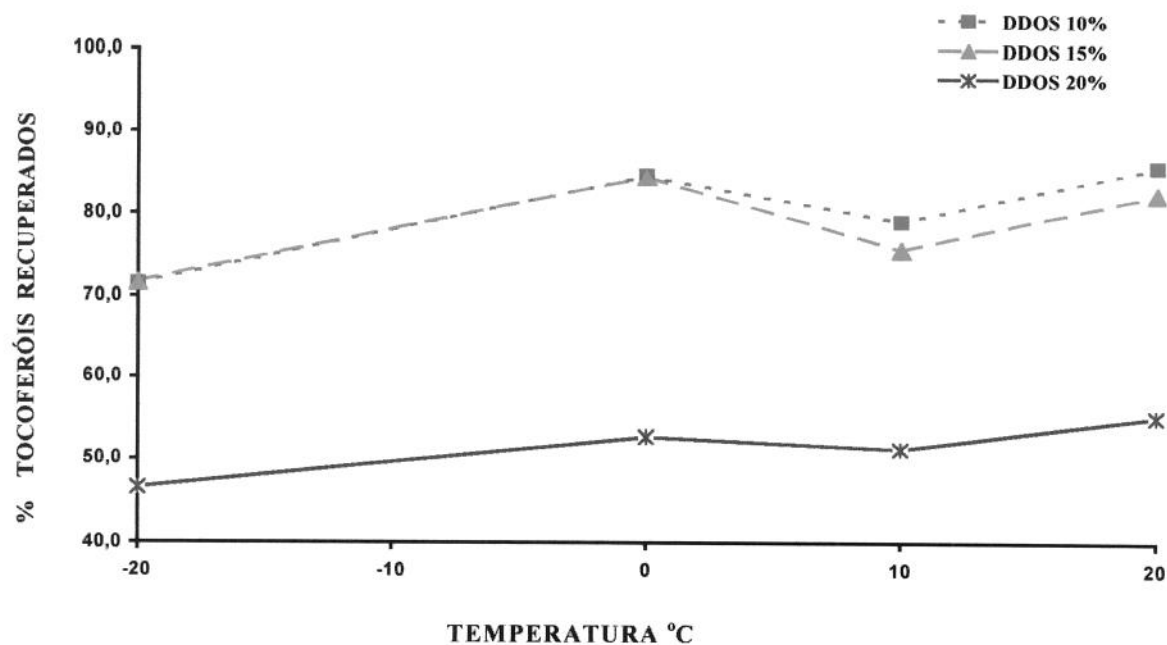


Figura 27: Recuperação de tocoferóis em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se solução acetona:água a 92,5%.

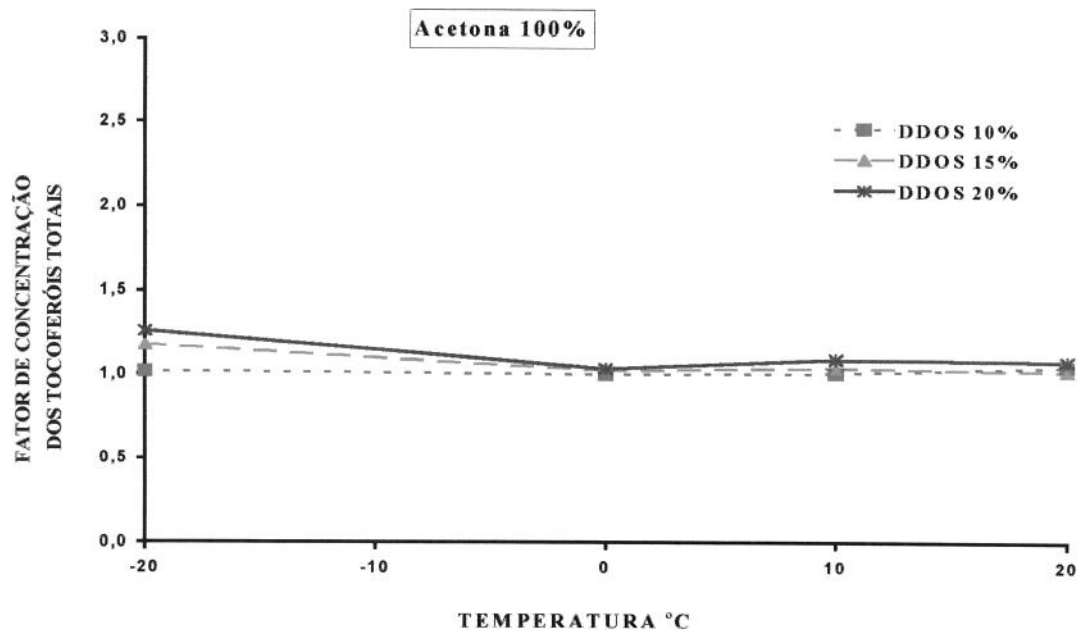


Figura 28: Fator de concentração dos tocoferóis totais em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se acetona.

Tabela 27: Influência da temperatura na extração dos tocoferóis por saponificação empregando-se solução acetona:água na concentração 95% de acetona.

%DDOS	- 20 °C			0 °C		
	Fator de Concentração	% Sólidos Removidos	%Tocoferóis Recuperados	Fator de Concentração	% Sólidos Removidos	%Tocoferóis Recuperados
10	1,3	39,3	78,4	1,3	34,6	85,4
15	1,2	33,7	77,5	1,2	31,5	82,5
20	2,0	70,3	56,5	1,8	63,5	63,3

Os ensaios empregando acetona como solvente apresentaram baixo fator de concentração dos tocoferóis, independentemente da concentração de DDOS e da temperatura (**Figura 28**).

De um modo geral, observa-se a tendência à redução da porcentagem de sólidos removidos com o aumento da temperatura, sendo este efeito mais acentuado para os ensaios com solvente com 92,5% de acetona e DDOS nas concentrações de 10% e 15% (**Figura 26 e 29**). Com a redução da temperatura deve ocorrer redução na solubilidade, principalmente dos sais de cálcio e também dos outros componentes não saponificáveis do DDOS, como foi citado no **item 4.3.2**.

Avaliando-se o gráfico apresentado na **Figura 30**, verifica-se que o uso de acetona pura proporciona um aumento quase que linear na porcentagem de recuperação de tocoferóis em relação a elevação da temperatura para os ensaios com 10% e 15% de DDOS.

Estes dados confirmam uma tendência já apresentada em outros ensaios (**Figura 24**), isto é, o emprego de acetona pura eleva o valor da recuperação de tocoferóis implicando em uma redução na eficiência da concentração dos tocoferóis.

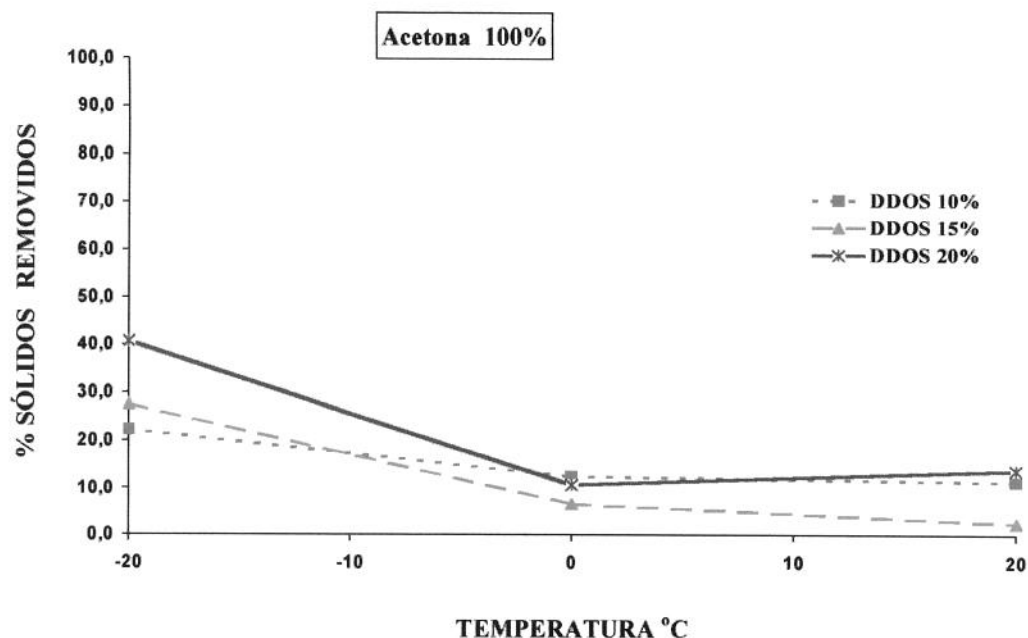


Figura 29: Fração de sólidos removidos em função da temperatura e da concentração do DDOS empregando-se acetona na extração por saponificação.

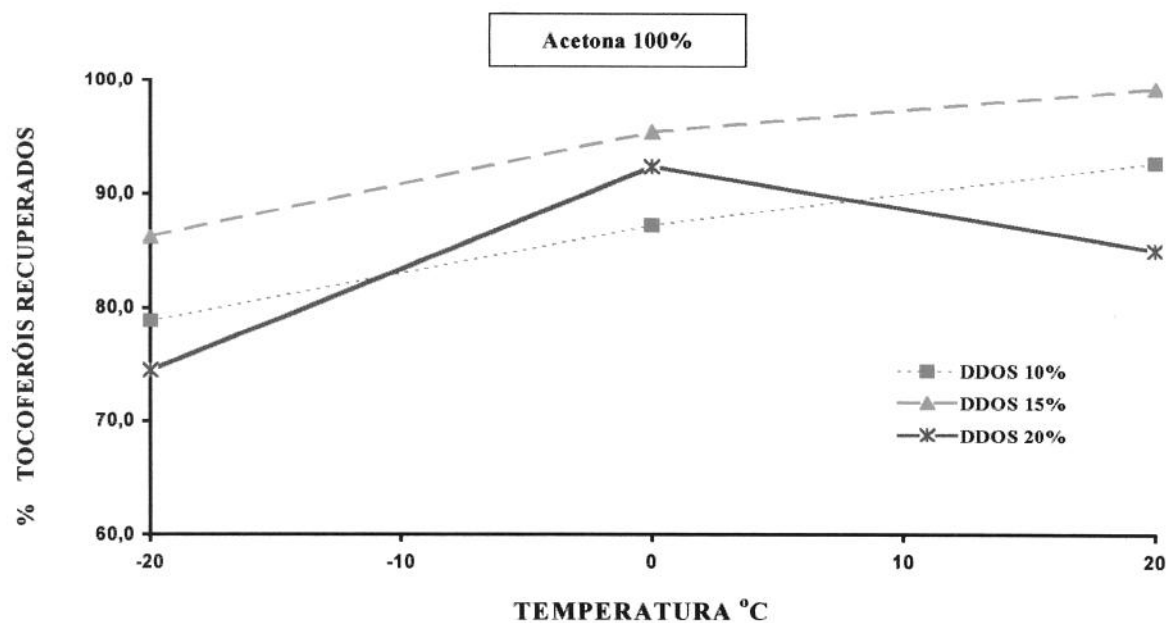


Figura 30: Recuperação de tocoferóis em função da temperatura e da concentração do DDOS na extração por saponificação empregando-se acetona.

Os concentrados de tocoferóis dos ensaios que apresentaram os melhores resultados, aqueles efetuados com acetona 92,5% a -20°C, foram avaliados em termos de tocoferóis individuais e os valores apresentados na **Tabela 28**.

Como já foi verificado para outros ensaios, os tocoferóis individuais dos concentrados possuem a mesma distribuição percentual que a matéria-prima de onde foram extraídos como pode-se ver na **Tabela 23**.

Tabela 28: Tocoferóis totais e individuais determinados por CLAE* dos concentrados obtidos por saponificação solução acetona:água na concentração 92,5% a -20°C.

TOCOFERÓIS	10% DDOS		15% DDOS		20% DDOS	
	% no concentrado	% na fração de tocoferóis	% no concentrado	% na fração de tocoferóis	% no concentrado	% na fração de tocoferóis
Total	15,81	100	19,90	100	26,00	100
α	2,20	13,94	2,65	13,37	3,65	14,06
$\beta + \gamma$	9,28	58,75	11,94	60,20	15,23	58,59
δ	4,33	27,39	5,31	26,42	7,11	27,36

*coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300.

4.4 - Emprego da Saponificação Seguida de Cristalização Isotérmica em Diversos Solventes

Preliminarmente foram efetuados ensaios com DDOS na concentração 5% para a avaliação do efeito de diferentes solventes na cristalização efetuada após a saponificação.

Elaborou-se um gráfico da porcentagem de sólidos removidos versus a porcentagem de sólidos passíveis de remoção. Onde, em um caso teórico, em cada etapa do processo todos os sólidos passíveis de remoção, como os esteróis e os ácidos graxos totais seriam totalmente extraídos.

Avaliando-se o gráfico apresentado na **Figura 31** observou-se que na etapa inicial do processo, isto é na saponificação (**S**), houve uma eficiente remoção de sólidos, cujo valor aproxima-se da curva teórica. Na etapa de saponificação, teoricamente, teríamos a remoção completa dos ácidos graxos, mono, di e triglicerídeos presentes, restando apenas na mistura, a matéria insaponificável, representada pelos tocoferóis, esteróis e hidrocarbonetos.

Na etapa posterior, a da cristalização, pode-se notar uma diferença na porcentagem de sólidos removidos em função dos diversos solventes empregados. No caso ideal, ocorreria a cristalização dos esteróis, restando em solução apenas os tocoferóis, que seriam então extraídos.

O uso de acetona propiciou uma remoção de sólidos próximo ao valor teórico e superior aos valores obtidos com o emprego de hexano e metanol.

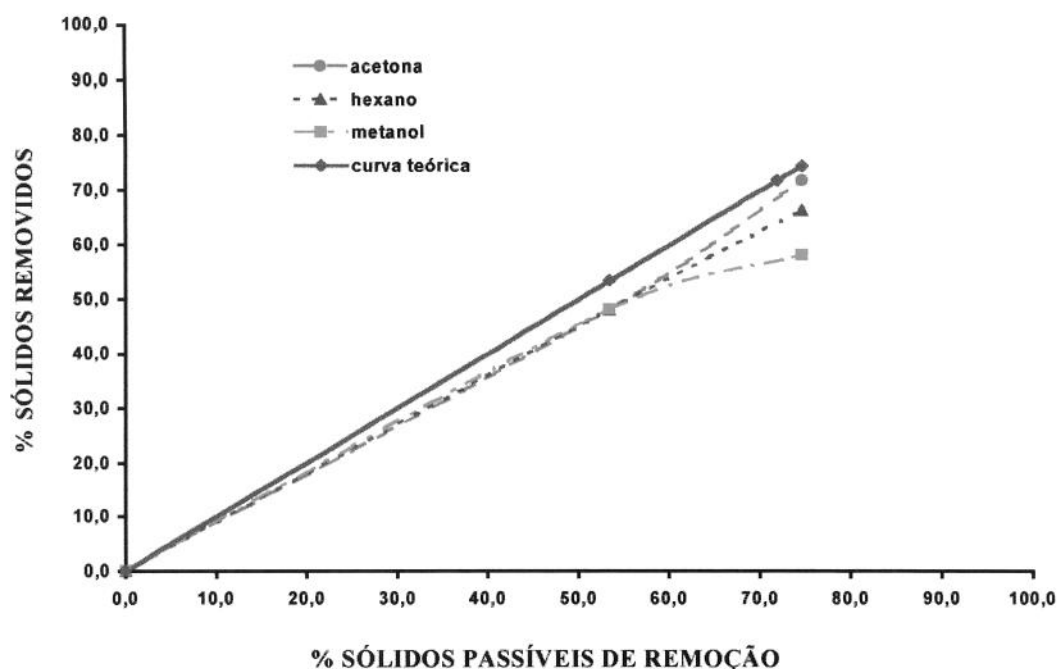


Figura 31: Fração de sólidos removidos em função dos sólidos passíveis de remoção para DDOS a 5% submetido a saponificação seguida de cristalização em diferentes solventes à -20°C .

A **Figura 32** mostra o fator de concentração em função do teor de sólidos removidos após a 2^a etapa. O ponto "S" no gráfico representa o fator de concentração ao final da 1^a etapa, a saponificação. A etapa de saponificação pouco contribui para a concentração dos tocoferóis, o mesmo ocorrendo com a etapa de cristalização empregando-se metanol como solvente. Por outro lado o uso de acetona na cristalização propiciou um incremento elevado no valor do fator de concentração embora inferior ao valor teórico seguido do solvente hexano.

Usando-se metanol verificou-se que além da porcentagem de remoção de sólidos ser a menor obtida praticamente não houve concentração dos tocoferóis. Devido ao fraco desempenho que este solvente apresentou foi descartado dos ensaios posteriores.

Para os solventes acetona e hexano, pela **Figura 32** pode-se ver que houve no processo completo uma elevada porcentagem de remoção de sólidos o que não necessariamente ocasionou a concentração dos tocoferóis semelhante à curva teórica como apresentado na **Figura 33**.

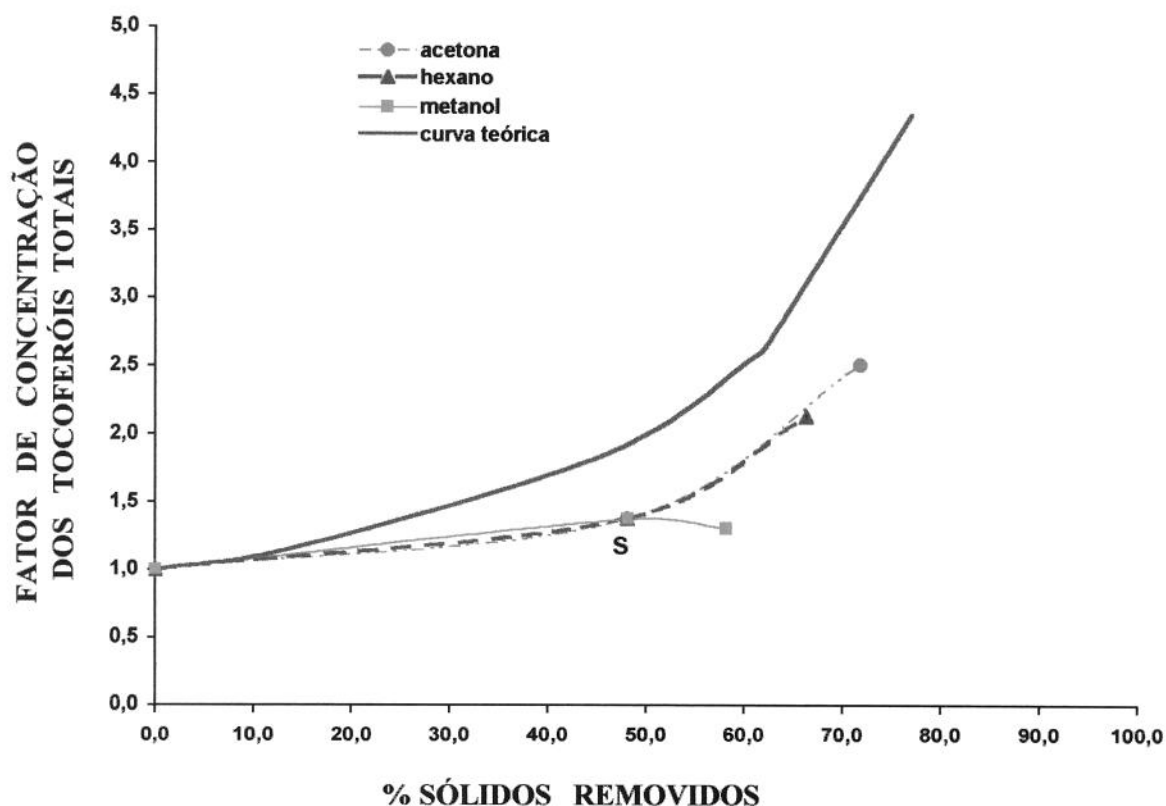


Figura 32: Fator de concentração dos tocoferóis em função dos sólidos removidos para DDOS a 5% submetido a saponificação seguida de cristalização em diferentes solventes à -20°C .

Por exemplo, o ensaio que apresentou melhor resultado, aquele empregando acetona, promoveu uma remoção de 64,7% sólidos, aumentando a concentração dos tocoferóis em 2,51 vezes. Para este valor de remoção de sólidos no caso ideal os tocoferóis seriam concentrados em 2,89 vezes, isto é um valor 12% superior ao obtido experimentalmente.

Pode ter ocorrido a extração de parte dos tocoferóis juntamente com os sólidos removidos por meio de arraste mecânico ou, então a degradação durante o processo.

Após a avaliação dos resultados dos ensaios com DDOS na concentração 5% foram efetuados testes empregando-se na etapa de cristalização os solventes acetona e hexano. Nesta etapa do experimento trabalhou-se com DDOS na concentração 10, 15 e 20%.

O gráfico apresentado na **Figura 33** mostra a variação do fator de concentração do processo global em função das diferentes concentrações de DDOS empregadas onde observa-se que para ambos solventes há um decréscimo no valor do fator de concentração com o aumento da concentração do DDOS.

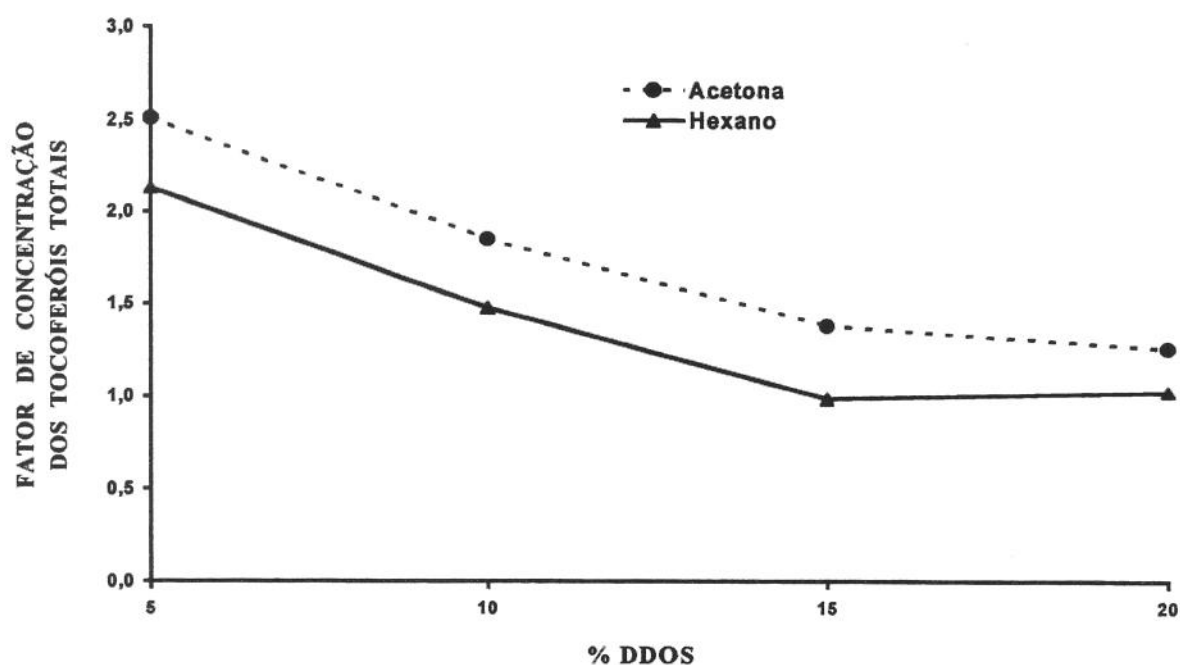


Figura 33: Fator de concentração dos tocoferóis em função da concentração do DDOS em acetona e hexano submetido a saponificação seguida de cristalização em diferentes solventes à -20°C .

O melhor desempenho foi obtido com o DDOS na concentração 5% onde ocorreu uma maior concentração de tocoferóis com menor remoção de sólidos em comparação as outras concentrações de DDOS (Figura 34).

Para todos as concentrações de DDOS os ensaios com o solvente acetona apresentaram fator de concentração superior aos ensaios conduzidos com hexano. Os testes com DDOS nas concentrações 15 e 20% , apresentaram resultados semelhantes para o fator de concentração e porcentagem de remoção de sólidos, tanto para acetona, quanto hexano.

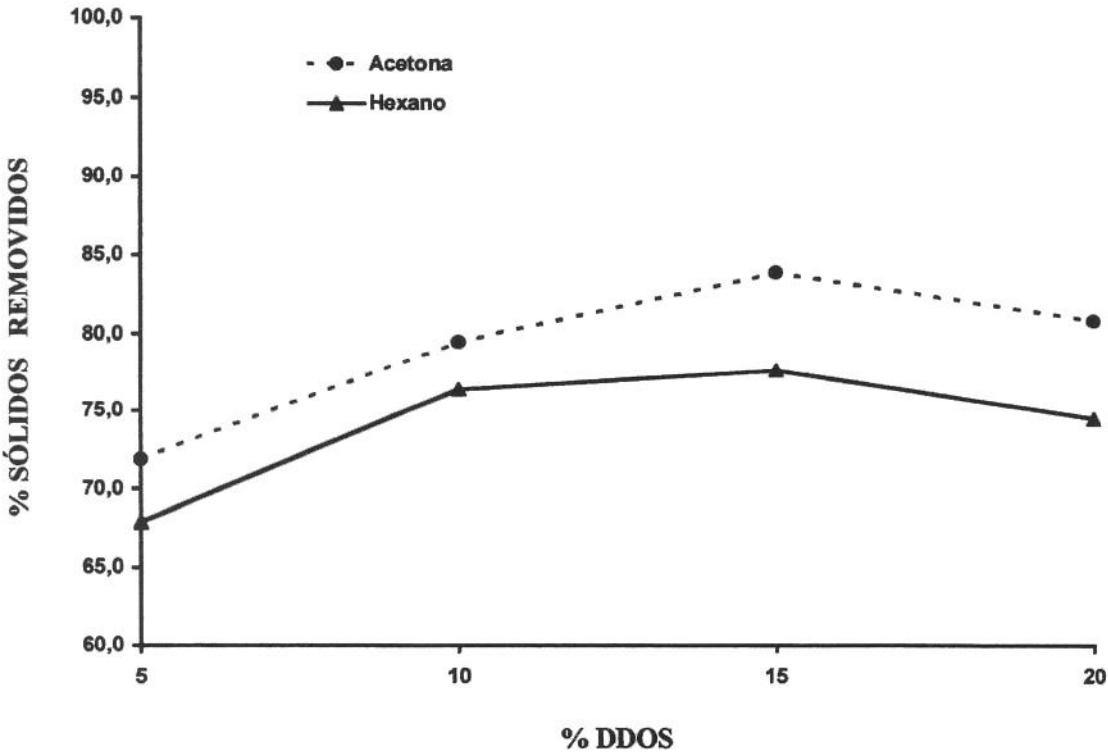


Figura 34: Sólidos removidos em função da concentração do DDOS em acetona e hexano submetido a saponificação seguida de cristalização à -20°C.

Podemos concluir que para este experimento que as condições que apresentam melhor desempenho foram o uso de DDOS 5% e acetona como solvente para a etapa de cristalização.

4.5 - Emprego da Extração Líquido-Líquido Seguida de Cristalização Isotérmica.

O estudo da extração de tocoferóis foi realizado em duas etapas, na primeira etapa empregou-se a extração líquido - líquido partindo-se de soluções de DDOS a 25% (m/v) em hexano e soluções de etanol 50%. Na segunda etapa o pré-concentrado (fase hexânica) obtido foi dissolvido em acetona quando então usou-se o método de cristalização a baixa temperatura para obtenção do concentrado final de tocoferóis.

O objetivo da partição líquido-líquido no processo é promover uma pré-purificação do DDOS contribuindo com a remoção de cerca de 50% dos sólidos totais. Esta é uma operação simples e rápida podendo ser realizada à temperatura ambiente. O hexano atua como veículo para carregar o DDOS, sendo a fase hidrofóbica do sistema.

A presença de hidróxido de potássio na fase alcoólica (1% m/v), contribui para deslocar os ácidos graxos para esta fase uma vez que ocorre a saponificação e os sabões são solúveis em solventes hidrofílicos. Segundo **AUGUSTO (1988)** a inclusão de KOH ocasiona um aumento grande da seletividade e eficiência do sistema de partição hexano-etanol na purificação dos tocoferóis.

Avaliando o gráfico apresentado na **Figura 35** podemos observar que houve boa eficiência na remoção de sólidos em todo o processo, pois a curva experimental aproxima-se muito da teórica.

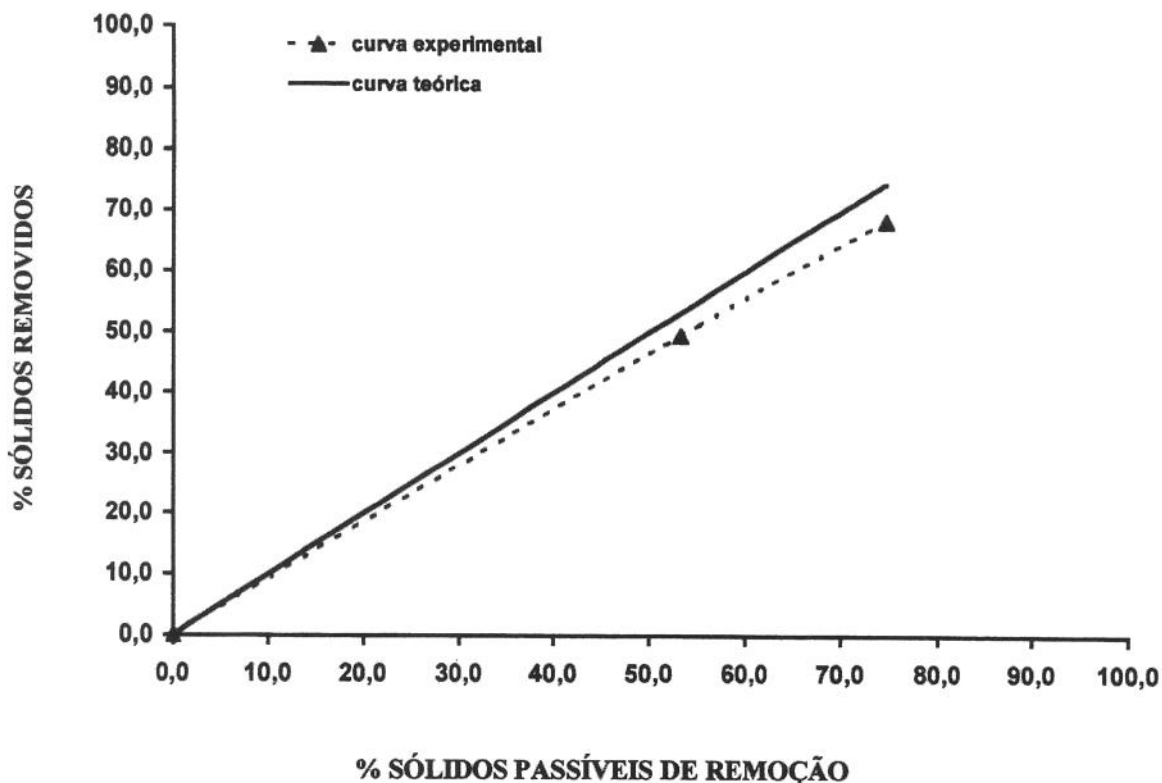


Figura 35: Percentagem de sólidos removidos em função dos sólidos passíveis de remoção por extração líquido-líquido em hexano e etanol seguido de cristalização em acetona a -27°C .

Ao observar-se o gráfico da **Figura 36** pode-se ver que a remoção de sólidos não implica em um aumento do fator de concentração dos tocoferóis ou o processo não é eficiente na concentração dos tocoferóis.

Os resultados obtidos neste processo indicam que ocorreu a extração de tocoferóis juntamente com os sólidos eliminados. Outros compostos não saponificáveis também podem ser carregados na fase etanólica por efeito da solubilização ou, então, podem ser emulsificados pelos sabões de ácidos graxos.

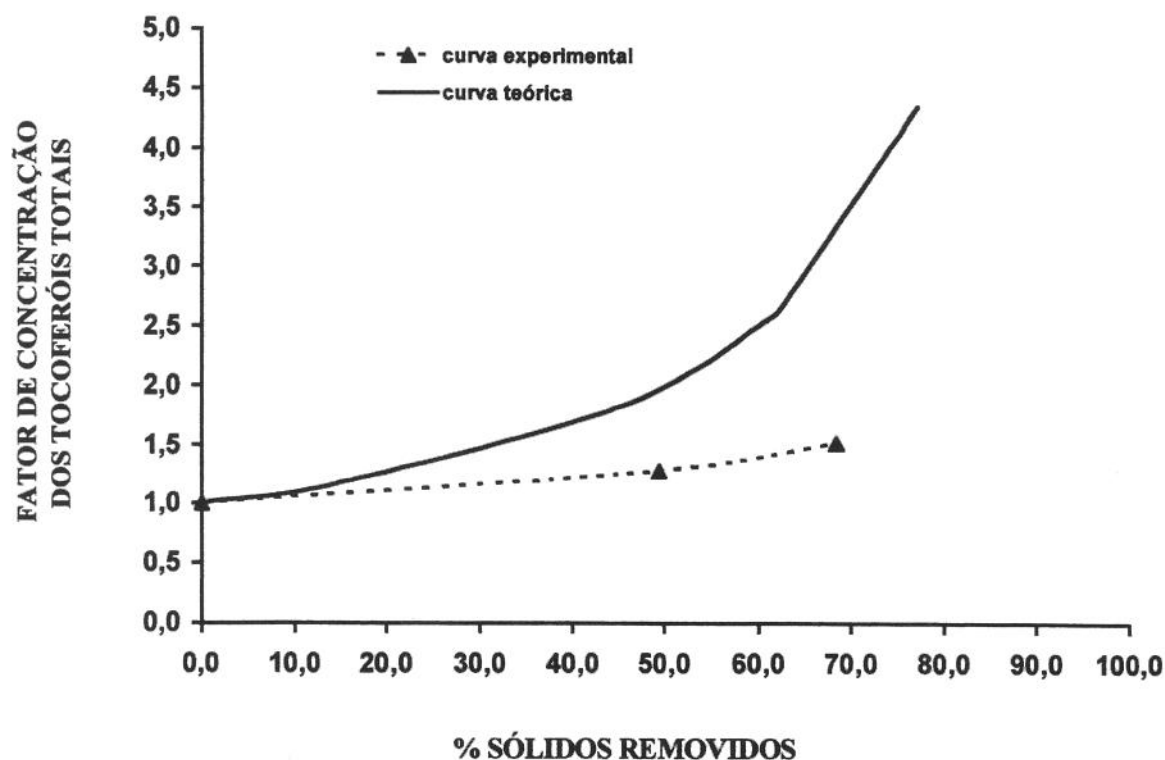


Figura 36: Fator de concentração dos tocoferóis em função da percentagem de sólidos removidos por extração líquido-líquido em hexano e etanol seguido de cristalização em acetona a -27°C .

Pode ocorrer também a degradação dos tocoferóis, principalmente no processo de partição, onde se empregou meio alcalino (AUGUSTO, 1988).

Na etapa de cristalização pode ter havido perda de tocoferóis também por remoção destes com os sólidos.

Um balanço de massa dos tocoferóis mostrou que durante todo o processo há uma perda de tocoferóis da ordem de 46% em relação ao valor inicial no DDOS. A etapa de extração líquido-líquido é responsável por 35,4% do total da perda de tocoferóis, onde o meio é alcalino e, portanto, mais propício a degradação dos mesmos.

4.6 – Avaliação dos Procedimentos para a Obtenção do Concentrado de Tocoferóis

Os diversos métodos empregados neste estudo, para a obtenção do concentrado de tocoferóis, foram avaliados em termos do fator de concentração (FC). De cada procedimento foram selecionadas as condições experimentais que apresentaram os melhores resultados. Este valores de fator de concentração estão apresentados na **Tabela 29**, permitindo uma comparação entre os diversos métodos empregados.

Pode-se observar na **Tabela 29** que os valores marcados com fundo mais escuro, apresentam os melhores resultados, em relação ao fator de concentração, e com valores muito próximos entre si.

Dentre eles destaca-se o maior valor de fator de concentração, 2,65 , que foi obtido por saponificação do DDOS na concentração 20% com solução acetona:água a 92,5% conduzido a -20°C.

Tabela 29: Seleção dos melhores resultados obtidos para os valores do Fator de Concentração (FC) e as respectivas condições dos ensaios.

MÉTODO	Saponificação						Saponificação e Cristalização	Cristalização				Extração L-L ^b e Cristalização
SOLVENTE	Solução Acetona:Água 90%		Solução Acetona:Água 92,5%				Acetona	Acetona	Acetona	Acetona	Hexano	Acetona
T °C ^a	0		0	-20	0	10	20	-20	-20	-80	-80	-27
DDOS	20%		25%	20%	20%	20%	20%	20%	16,67	10%	15%	25%
FC ^c	2,47		2,56	2,65	2,48	2,3	2,26	2,51	1,35	1,27	1,47	1,52

a-Temperatura

b-Extração Líquido-Líquido

5 - CONCLUSÕES

O DDOS estudado apresentou-se como uma matéria-prima adequada para a extração de tocoferóis, contendo cerca de 11% de tocoferóis totais. Sua composição em tocoferóis individuais tem como contribuinte principal o γ -tocoferol representando cerca de 62% do total.

Na extração por cristalização isotérmica à -20°C , com 20% de DDOS, o emprego de misturas azeotrópicas de solventes apresentou resultados insatisfatórios. Apenas o Etanol:Metil Etil Cetona proporcionou uma concentração dos tocoferóis ($\text{FC}=1,25$) próxima ao valor teórico, além do maior percentual de sólidos removidos ($\% \text{SR}=37,7\%$).

Para a cristalização isotérmica (-20°C), DDOS 20% com o uso de acetona ocorreu uma concentração dos tocoferóis ($\text{FC}=1,35$) próxima ao valor teórico, entretanto, a remoção de sólidos ($\% \text{SR}=27,8\%$) apresentou-se pouco eficiente.

A cristalização isotérmica à -80°C e com 10% de DDOS, com o uso de acetona, apresentou uma alta taxa de remoção de sólidos (64,4%) e o maior fator de concentração dos tocoferóis ($\text{FC}=1,47$). Com o uso de hexano e DDOS a 15 e 20% obteve-se uma elevada porcentagem de sólidos removidos, acima de 70%, porém, com baixo fator de concentração, indicando perdas de tocoferóis no processo.

Nos diversos ensaios de extração por cristalização isotérmica em qualquer temperatura ou concentração de DDOS empregadas, o solvente hexano conjugou uma baixa porcentagem de sólidos removidos com um fator de concentração próximo ao valor teórico.

No processo para a avaliação da extensão da saponificação com hidróxido de cálcio (15g/L) à 0°C na extração dos tocoferóis, o uso de solventes contendo de 85 a 92,5% de acetona resultou na maior influência da saponificação.

Dentre as diversas concentrações de hidróxido de cálcio avaliadas, a mais eficiente foi 16g/L, apresentando fator de concentração de 2,5% e 51% de sólidos removidos.

No emprego da saponificação com acetona a 92,5% e 0°C observou-se que um aumento na concentração de DDOS resultou em aumento na remoção de sólidos e redução na porcentagem de tocoferóis recuperados durante a extração.

No método por saponificação com hidróxido de cálcio (15g/L) à 0°C, efetuado para a avaliação da influência da composição do solvente acetona:água na extração dos tocoferóis, o emprego de DDOS a 20 e 25% e do solvente na faixa de 90 a 95% em acetona, resultou em um fator de concentração duas vezes superior ao dos demais ensaios.

A influência da temperatura na saponificação com hidróxido de cálcio (15g/L) foi mais acentuada para a relação acetona:água 92,5% nas diferentes concentrações de DDOS usadas (10, 15 e 20%). A temperatura -20°C apresentou-se como a mais eficiente. O concentrado obtido com 92,5% acetona:água e DDOS a 20%, apresentou a mais alta concentração em tocoferóis totais (26,5%).

O método de extração com o emprego da saponificação com hidróxido de cálcio (1% m/v) seguida de cristalização isotérmica à -20°C, com acetona e DDOS a 5%, propiciou remoção de sólidos (%SR=71,9) assim como fator de concentração (FC=2,51) superior ao obtido com hexano e metanol. Para os solventes acetona e hexano ocorreu um decréscimo no fator de concentração com o aumento da concentração do DDOS de 5% à 20%.

O método de concentração dos tocoferóis extração líquido-líquido seguida por cristalização isotérmica à -27°C, apresentou boa eficiência na remoção de sólidos (%SR=68,4), porém a concentração dos tocoferóis (FC=1,52) foi deficiente apresentando perdas da ordem de 46% deste composto.

O estudo realizado indica que, dentre todos os métodos propostos, em termos de fator de concentração de tocoferóis, o mais adequado foi a saponificação com hidróxido de cálcio (15g/L), solução de acetona:água (92,5%) concentração de DDOS 20% e temperatura -20°C, resultando em um concentrado com cerca de 26% de tocoferóis.

6 – SUGESTÃO PARA ESTUDOS POSTERIORES

Para futuros projetos de pesquisa, visando dar continuidade e complementar o trabalho apresentado nesta tese, sugere-se o seguinte:

- Estudo do método de extração por saponificação por meio de um delineamento experimental empregando-se a metodologia de superfície e resposta para a análise do efeito combinado dos diversos parâmetros do processo. Baseado nos resultados obtidos, sugere-se empregar como solvente misturas de acetona:água nas proporções em acetona na faixa de 90 a 92,5%(v/v), concentrações de DDOS na faixa de 20 a 25% m/v, assim como temperatura entre 0°C a -20°C.
- Estudo do emprego de cristalização fracionada para a extração dos tocoferóis, tendo em conta os resultados obtidos com a cristalização isotérmica, sugere-se empregar inicialmente como solvente a acetona, concentrações de DDOS na faixa de 5 a 20% m/v, assim como temperatura entre 0°C a -30°C.
- Estudo dos processos acima citados em escala piloto para adequação e viabilização de produção em escala comercial.
- Estudo da viabilidade econômica dos processos citados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDURAKHIMOV, A.; DAVTYAN, L.A.; ROIZMAN, B.B. Treatment of cotton soapstock with milk of lime. **Chemical Abstracts**, Ohio, v.70, p.59138, 1969.
2. AGRIANUAL 99: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, 1999. p.452-456.
3. ALMEIDA, M.E.M.; GUSMÁN, E.C.; CARVALHO, P.R.N.; RUSIG, O. Avaliação de destilado da desodorização de óleo de soja para a extração de vitamina E. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.37, n.4, p.100-1011, 1994.
4. AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Official and tentative methods**. 4.ed. Illinois: AOCS, 1989. 2v.
5. AMES, S.R. Industrial preparations and production, estimation in foods and foods supplements, occurrence in foods. In: SEBREL JR, W.H ; HARRIS, R.S. (Ed). **The Vitamins**. 2.ed. New York: Academic Press, 1972. v.5, p.225-233.
6. ANDERSEN, A.J.C. **Refinación de aceites y grasas para usos alimenticios**. Barcelona: Jose Monteso Editor, 1956. p.156-158.
7. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 13.ed. Washington: AOAC, 1980. 1018p.
8. AUGUSTO, M.M.M. **Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (Vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja**. Campinas, 1988. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 125p.
9. BALL, G.F.M. **Fat soluble vitamin assays in food analysis: a comprehensive review**. London: Elsevier, 1988. 326p.

10. BAXTER, J.G.; TAYLOR, S.J.D. **Separation and purification of the tocopherols.** US. 2350713. June 6, 1944. Chemical Abstracts, Ohio, v.38, p.5048³, 1944.
11. BOURGEOIS, C.F. Propriétés antioxygènes des tocophérols et du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses. **Revue Française des Corps Gras**, Paris, v.28, n.9, p.353-356, set.1981.
12. BOGUTH, W. Aspects of the action of vitamin E. **Hormones and Vitamins**, New York, v.27, p.1-15, 1969.
13. CAWLEY, J.D. **Vit E or tocopherols.** US. 2375078. May 1, 1945. Chemical Abstracts, Ohio, v.39, p.3398s, 1945.
14. CLARK, J.P.; HUNSICKER, J.C.; MEGREMIS, C.J. Tocopherols: nature's antioxidant. **Food Australia**, Sidney, v.42, n.6, p.262-263. 1990.
15. CONTRERAS, E. Estudos sobre determinações de tocoferóis (Vit. E) em alimentos e perspectiva para sua recuperação de resíduos de refino de óleo de soja. In: **REUNIÃO DO CIBRAM**, 5., Campinas, 1984. p.73-77.
16. CONTRERAS, E.; BARATA, L.S. **Recuperação de vitamina E dos resíduos da indústria de óleos vegetais.** Campinas: FUNCAMP, 1984. 23 p. (Relatório Técnico n.1).
17. CONTRERAS-GUZMAN, E.; STRONG III, F.C. Determination of total tocopherols in grains, grain products, and commercial oils, with only slight saponification, and by a new reaction with cupric ion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.30, n.6, p.1109-1112, 1982 a.
18. CONTRERAS-GUZMAN, E.S.; STRONG III, F.C. Vitamins and other nutrients: determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Washington, v.65, n.5, p.1215-1221, 1982 b.

19. CORREA, N.C.F., MEIRELES, M. A A., FRANÇA, L.F., ARAÚJO, M.E. Extração de óleo da semente de maracujá (*Passiflora edulis*) com CO₂ supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.14, supl., p.29-37, dez.1994.
20. DESAI, I.D. Assay methods. In: MACHLIN, L.J. (Ed.). **Vitamin E**. New York: Marcel Dekker, 1980. Cap.3, p.67-98.
21. DOUGHERTY Jr., M.E. Tocopherol as food antioxidants. **Cereal Foods World**, v.33, n.2, p.222-223, 1988.
22. DUDROW, F.A. Deodorization of edible oils. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.60, n.2, p.272-274, 1983.
23. DUXBURY, D.D. Natural tocopherols provide antioxidant protection to meats: recent chicken/pork franks study reported. **Food Processing**, Chicago, v.49, n.4, p. 58-59, 1988.
24. EASTMAN CHEMICAL COMPANY. **Eastman vitamin E derived from natural sources**. Kingsport, USA: Eastman Kodak Company, 1989. 8p.
25. EASTMAN CHEMICAL COMPANY. **Tenox food-grade antioxidants**. Kingsport, USA: Eastman Kodak Company, 1992. 33p.
26. ELVERS, B.; HAWKINS, S.; RUSSY, W.; SCHULTZ, G. **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry silicon compounds: inorganic to stains, microscopic**. sl.: VCH Publishers Inc, 1993. v.24A, p.437-505.
27. ERICKSON, D.R. Soybean oil: up-date on number one. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.60, n.2, p.351-356, 1983
28. ESPÓSITO, R.; PESSOA, F.L.P. Cálculo da solubilidade da vitamina E (alfa-tocopherol) em dióxido de carbono supercrítico. In: CONGRESSO DA SBCTA.25., 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. São Paulo:SBCTA, 1998. CD-ROM.

29. EVANS, C.D; OSWALD, J.; COWAN, J.C. Soybean unsaponifiables hydrocarbons from deodorizer condensates. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.41, n.6, p.406-11, 1964.
30. FATTY ACID DATA BOOK. Unichema International . 2.ed. Bebington, 1987. 64p.
31. FISHER, R.J. A self-optimization scheme for automated supercritical fluid extraction systems. **Food Technology**, Chicago, v.43, n.3, p.91-94, 1989.
32. FORSTER, A.; HARPER, A.J. Physical refining. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.60, n.2, p.265-274, 1983.
33. FUNDAÇÃO CARGIL. **Uma caminhada sem fim: como a soja conquistou o mundo e o Brasil**. São Paulo: Fundação Cargil, sd. 95p.
34. GAVIN, A.M. Deodorization and finished oil handling. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.58, n.3, p.175-184, 1981.
35. GAVIN, A M. Edible oil deodorization. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.55, n.11, p.783-791, 1978.
36. GUSNTONE, F.D. **Lipids in food**. Oxford: Pergamon Press, 1983. 170p. (Pergamon International library).
37. GUTCHO, M. **Edible oils and fats: recent developments**. Park Ridge: Noyes Data Corp., 1979. 402p. (Food technology review, 49).
38. GUTFINGER, T.; LETAN, A. Studies of unsaponifiables in several vegetable oils. **Lipids**, Champaign, v.9, n.9, p.658-663, 1974a.

39. GUTFINGER, T.; LETAN, A. Quantitative changes in some unsaponifiables components of soya bean oil due to refining. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London , v.25, n.9, p.1143-1147, 1974b.
40. HASSE, G. **O Brasil da soja: abrindo fronteiras, semeando cidades**. Porto Alegre: L&PM, 1996. 256p.
41. HARRIS, R.S. Influences of storage and processing on the retention of vitamin E in foods. **Hormones & Vitamins**, New York, v.20, p.603-619, 1962.
42. HARTMAN, L. **Desacidificação de óleos comestíveis sem o emprego de álcali**. Campinas, 1971. 58p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
43. HARTMAN, L.; LAGO, R.C. Rapid determination of fat acid methyl esters from lipids. **Laboratories Practice**, London, v.22, n.8, p.475-76, 479, 1973.
44. HENKEL CORPORATION. **Covi-ox 100% natural antioxidants: mixed tocopherols** for lasting protection. Rockford, sd. 6p.
45. HICKMAN, K.C.D. **Preservation of tocopherol**. US. 2440606. April 27, 1948. Chemical Abstracts, Ohio, v.42, p. 5246c, 1948.
46. HICKMAN, K.C.D. **Concentration of tocopherol**. US.2349789. May 23, 1944. Chemical Abstracts, Ohio, v.39, p.1514s, 1945.
47. HOFFMAN-LA ROCHE & CO AG. Determination of alpha-tocopherol in complete feeds, premixes and vitamin concentrates with the aid of HPLC. In: **Analytical methods for vitamins and carotenoids in feed**. Basel: F. Hoffmann-La Roche & Co AG, 1988. p.12-14.

48. HORWITT, M.K. Interrelations between vitamin E and polyunsaturated fatty acids in adult men. **Vitamins & Hormones**, New York v.20, p.541, 1962.
49. HORWITT, M.K. Vitamin E: a reexamination. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.29, n.5, p.569-578, 1976.
50. HORWITT, M.K. Vitamin E and lipid metabolism in man. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v.8, p.451, 1960.
51. HUNT, T.K.; SCHWARZER, J. **Recovery of tocopherols**. US 96753460.Nov. 25, 1996. Chemical Abstracts, Ohio, v.127, p.126694.
52. JACOB, R.A. Nutrition, health and antioxidants. **Inform**, Champaign, v.5, n.11, p.1271-1275, 1994.
53. JOHNSON, R.W.; FRITZ, E. (Eds.). **Fatty acids in industry**. New York: Marcel Dekker, 1989.
54. KE, P.J.; WOYEWODA, D.A. Titrimetric method for determination of free fatty acids in tissues and lipids with ternary solvents and m-cresol purple indicator. **Analytical Chemistry Acta**, Easton, v.99, p.387-91, 1978.
55. KEHSE, W. Washing of effluents and recovery of distillates from deodorization. **Revue Française de Corps Gras**, Paris, v.23, n.9, p.493-496, 1976.
56. KIM, S.K.; KIM, C.J.; CHEIG, H.S.; YOON, S.H. Effect of caustic refining, solvent refining and steam refining on the deacidification and color of rice bran oil. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.62, n.12, p.1050-1053, 1985.
57. KIMURA, S.; SHINOSAWA, K. **Ruminant feeds containing calcium oleate and breeding of ruminants with the feeds**. JP 06098690 A2. Apr. 12, 1994. Chemical Abstracts, Ohio, v.121, p.81813.

58. KLYNE, W. **The chemistry of the steroids**. London: Methuen & Co / New York: John Wiley, 1965. 224p.
59. KOFLER, M.; SOMMER, P.F.; BOLLIGER, H.R., SCHMIDT, B.; VECCHI, M.
Physicochemical properties and assay of tocopherols. **Hormones & Vitamins**, New York, v.20, p.407-39, 1962.
60. KUTSKY, R.J. **Handbook of vitamins and hormones**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1973. 278p.
61. LAERMER, S.F.; ZAMBETTI, P.F. Alpha-tocopherol (vitamin E): the natural antioxidant for polyolefins. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v.8, n.3, p.228-248, 1992.
Apud: **Food Science and Technology Abstracts**, Chicago, v.25, n.2, p.69, F6. 1993.
62. LANDVICK, S. Acceptabilité et tolérance de la vitamine E administrée par voie orale. **Revue Française des Corps Gras**, Paris, v.39, n.3/4, p.101-108, 1992.
63. LEE, H.; CHUNG, B.H.; PARK, Y.H. Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.68, n.8, p.571-573, 1991.
64. MACHLIN, L.J. (Ed.). **Handbook of Vitamins**. New York: Marcel Decker, 1982. 720 p
65. MACHLIN, L.J.(Ed.). **Vitamin E : a comprehensive treatise**. New York: Marcel Decker, 1980. 660 p.
66. MARES, E. **Tocopherol concentrate as food additive and antioxidant**. CS. 240644, Sep.15, 1987. Chemical Abstracts, Ohio, v.108, p. 74036m, 1988.
67. MARKLEY, K.S. (Ed.). **Fatty acids: their chemistry, properties, production, and uses**. 2.ed. Interscience Pub., 1968. Part.5, p.3119-3835.

68. MAZA, A. **Process for separating mixed fatty acids from deodorizer distillate using urea.** UNITED STATES PATENT,. US.005078920A, Jan.7, 1992.
69. MAZA, A.; ORMSBEE, R.A.; STRECKER, L.R. Effects of deodorization and steam-refining parameters on finished oil quality. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.69, n.10, p.1003-1008, 1992.
70. McFARLANE, W.D.; PARKER, W.E. **Tocopherol and by products.** Can. 414487. Aug. 10, 1943. Chemical Abstracts, Ohio, v.37, p.6096, 1943.
71. MINISTERIO DA SAÚDE. Aditivo: tocoferóis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dez. 1988. Seção I, p.2416-2417.
72. MOURAL, J.J.; MAZAC,R.; SCHWARTZ, V. **Method of sterol and tocopherol isolation from vegetable oil deodorization condensate.** CS 245562. Oct. 16, 1986. Chemical Abstracts, Ohio, v.110, p.91684e, 1989.
73. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Recommended dietary allowances.** 10.ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1989.
74. NAUDET, M.; CECCHI, G. Sur la nature et la composition, des produits éliminés au cours de la desodorization II. **Revue Francaise Des Corps Gras**, Paris, v. 17, n.8/9, p.529-535, 1970.
75. NELSON, J.P.; MILUN, A.J. Gas chromatographic determination of tocopherols and sterols in soya sludge and residues. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.45, n.12, p.848-51, 1968.
76. NOGALA-KALUCKA, M.; GOGOLEWSKI, M.; SWIQTIEWICZ, E. Changes in the composition of tocopherols and fatty acids in post deodorization condensates during refining of various oils. **Fat Science Technology**, v.95, n.4, p.144-147, 1993.

77. OHGAKI, K.; KATAYAMA, Y. **Extractive separation method**. GB. 2152837, 1985.
Chemical Abstracts, Ohio, v.105, p.23356w, 1986.
78. ORFAN, C.P.; VENTO, D.A.; HIGHTOWER, A.L.; ROMANOFISKY, W.C. **Gum base containing tocopherol**. US.5132121. Food Science and Technology Abstracts, Chicago, v.25, n.1, p.155, K19, 1993.
79. PATTERSON, H.B.W. **Handling and storage of oilseeds, oil fats and meal**.
London: Elsevier Applied Science, 1989. 394p.
80. PEETZ, V.S. Soja. **Prognóstico Agrícola**, São Paulo, v.2, p.241-243, 1998.
81. POTTS, H.E. **Tocopherol concentrates**. US.546865, Aug. 1942. Chemical Abstracts, Ohio, v.37, p.5558, 1943.
82. RAMAMURTHI, S.; McCURDY, A.R. Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols. **Journal of American Oil Chemical Society**, Champaign, v.70, n.3, p.287-295, 1993.
83. REICHARDT, C. **Solvents and solvent effects in organic chemistry**. 2.ed.rev.
Weinheim: Basel / New York: VCH, 1990. 534p.
84. RUBEL, T. **Vitamin E manufacture**. New Jersey: Noyes Development Corp., 1969. 114p.
85. RUIZ-MENDEZ, M.V. ; MARQUEZ-RUIZ, G. ; DOBARGANES, M.C. Determinación cuantitativa de componentes mayoritarios presentes en los destilados obtenidos en la desodorización de aceites e grasas. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v.46, n.1, p.21-25, 1995.
86. RUSSELL, J. Technical paper: the refining of soybean oil to optimum quality. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v.47, n.4, p.275-283, 1996.

87. SALUNKHE, D.K. et al. **World oil seeds: chemistry, technology and utilization.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 554p.
88. SAMPATH, K. **Recovering tocopherols from deodorizer sludge.** US.4594437, Jun.10, Chemical Abstracts, Ohio, v.105, p.66438s, 1986.
89. SASAOKA, S.; AOKI, I.; MARUYAMA, H. **Ruminant feed additives containing fatty acid metal salts.** JP 04011846 A2. Jan.16, 1992. Chemical Abstracts, Ohio, v.116, p.172735.
90. SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially. In: HUDSON, B.J.F. **Food antioxidants.** London: Elsevier Science Pub., 1990. P.99-170.
91. SEBREL Jr., W.H.; HARRIS (Ed.). **The Vitamins.** 2.ed. New York: Acad. Press, 1972. 468 p. v.5.
92. SHEABAR, F.Z.; NEEMAN, I. Concentration to tocopherols from soy oil deodorization scum. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milão, v.64, n.6, p.219-222, 1987.
93. SHERWIN, E.R. Antioxidants for vegetable oils. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.53, n.6, p.430-436, 1976.
94. SHUKUYUKI, H. **Food discoloration preventing solutions containing natural tocopherol and preservation of food with them.** JP. 03259034. Nov. 19, 1991. Chemical Abstracts, Ohio, v.116, n.9, p.82540h, 1992.
95. SIEDEL, A. **Solubilities, inorganic and metal organic compounds.** 4.ed. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1965. v.1.
96. SIX, P. Current research in natural food antioxidants. **Inform**, Champaign, v.5, n.6, p.679-688, 1994.

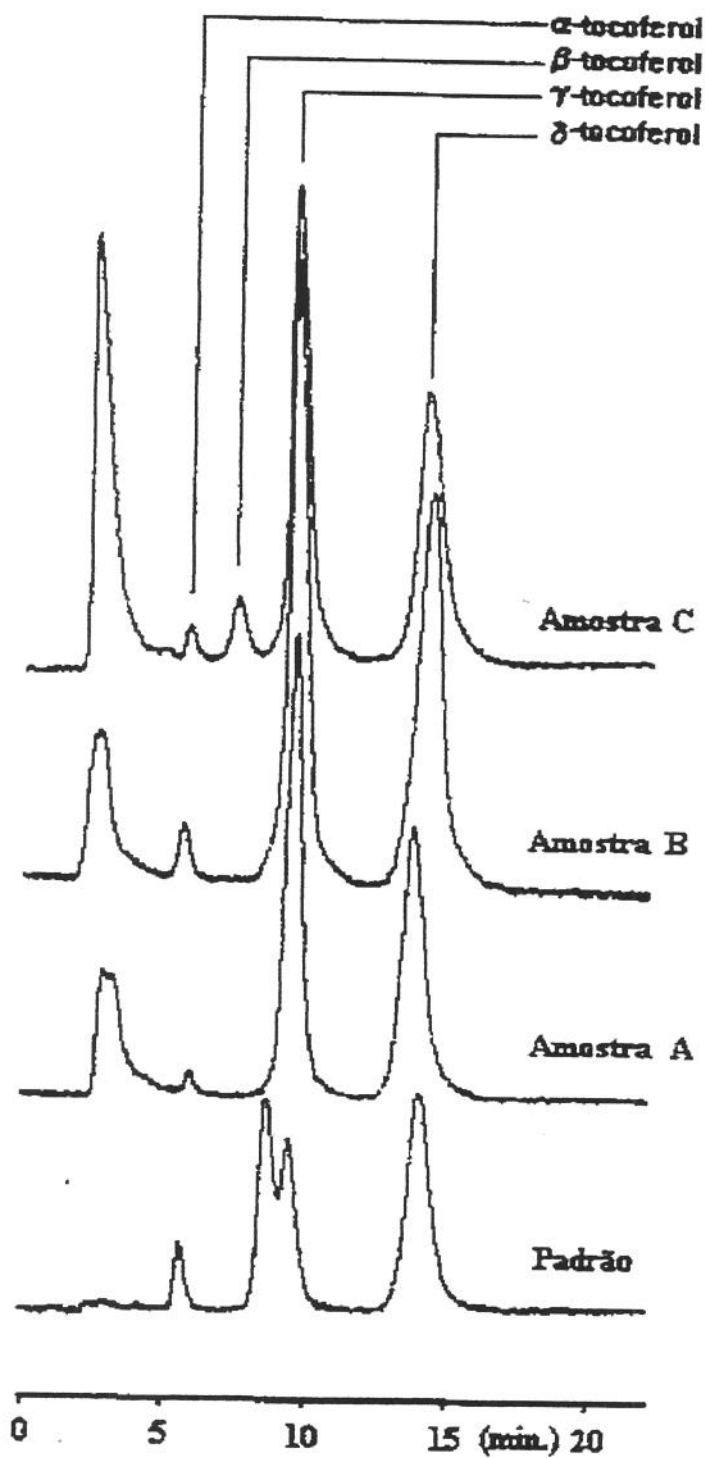
97. SLOVER, H.T. Tocopherols in foods and fats. **Lipids**, Champaign, v.6, n.5, p.291-295, 1971.
98. SOJA. **Agroanalysis**, São Paulo, v.19, n.1, p.74,79,81, 1999.
99. SOYA BLUEBOOK PLUS. **The annual directory of the world oilseed industry:** 1997. Bar Harbor: Soyatech Inc., 1998. 399p.
100. STECHER, P.G. (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals and drugs.** 8.ed. Rahway: Merck & Co Inc., 1968. 1713p.
101. STUART, G.R.; OLIVEIRA, J.V.; D'AVILA, S.G. Extração de óleo essencial de alfavaca utilizando-se dióxido de carbono a elevadas pressões. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.14, supl., p.11-16, dez.1994.
102. SUTTER, L.E.D.N.; SILVA, M.F.F.; CASSEL, E. Extração supercrítica, uma nova tecnologia industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.14, supl., p.3-10, dez.1994.
103. SWERN, D. Composition and characteristics of individual fats and oils. In: SWERN, D. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products.** New York: Interscience, 1964a. p.165-247.
104. SWERN, D. Physical properties of fats and fatty acids. In: SWERN, D. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products.** New York: Interscience, 1964b. p.153-164.
105. SWERN, D. Structures and composition of fats and oils. In: SWERN, D. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products.** New York: Interscience, 1964c. p.3-53.
106. TAKAGI, Y.; KAI, Y. **Tocopherol concentrates.** DE. 3126110. Apr.01, 1982. Chemical Abstracts, Ohio, v.96, p.59939y, 1982.
107. TOMASSI, G.; SILANO, V. An assessment of the safety of tocopherols as food additive. **Food Chemistry and Toxicology**, London, v.42, n.10/11, p.1051-61, 1986.

108. TOYAMA, K.; SHIMAZY, M. Protection of marine products from deterioration in to the oxidation oils: XIII applicability of concentrated natural tocopherol mixture. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.38, n.5, p.487-495, 1972. Apud: **Food Science and Technology Abstracts**, Chicago, v.5, n.1, p.171, R43, 1973.
109. USDA: meat products can include tocopherols. **Inform**, Champaign, v.4, n.11, p.1276, 1993.
110. VALENZUELA B, A.; NIETO K., S. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. **Grasas y Aceites**, Sevilha, v.47, n.3, p.186-196, 1996.
111. WEAST, R.C. (Ed.). **Handbook of chemistry and physics**. 52.ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co, 1971. 1500p.
112. WHITTLE, K. J.; DUNPHY, P.J.; PENNOCK, J. F. The isolation and properties of δ -tocotrienol from Hevea latex. **Biochemical Journal**, v.100, n.1, p.138-45, 1966.
113. WILLGING, S.M. **Purification of tocophenols**. EP. 191132. Aug., 20, 1986. Chemical Abstracts, Ohio, v.105, p.227090q, 1986.
114. WITTING, L.A. Vitamin E. Polyunsaturated rated lipid relationship in diet and tissues. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.27, n.9, p.952-9, 1974.
115. WITTING, L.A Vitamin E as a food additive. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.52, n.2, p.64-8, 1975.
116. WOERFEL, J.B. Processing and utilization of by-products from soy oil processing. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.58, n.3, p.188-191, 1981.

117. YOSHIDA, H.; KAJIMOTO, G.; EMURA, S. Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. **Inform**, Champaign, v.4, n.11, p.1295, 1993.
118. ZANDI, P.; McKAY, J.E. Determination of tocopherols in soybean oil using fractional crystallization. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.27, n.9, p.843-848, 1976.

ANEXOS

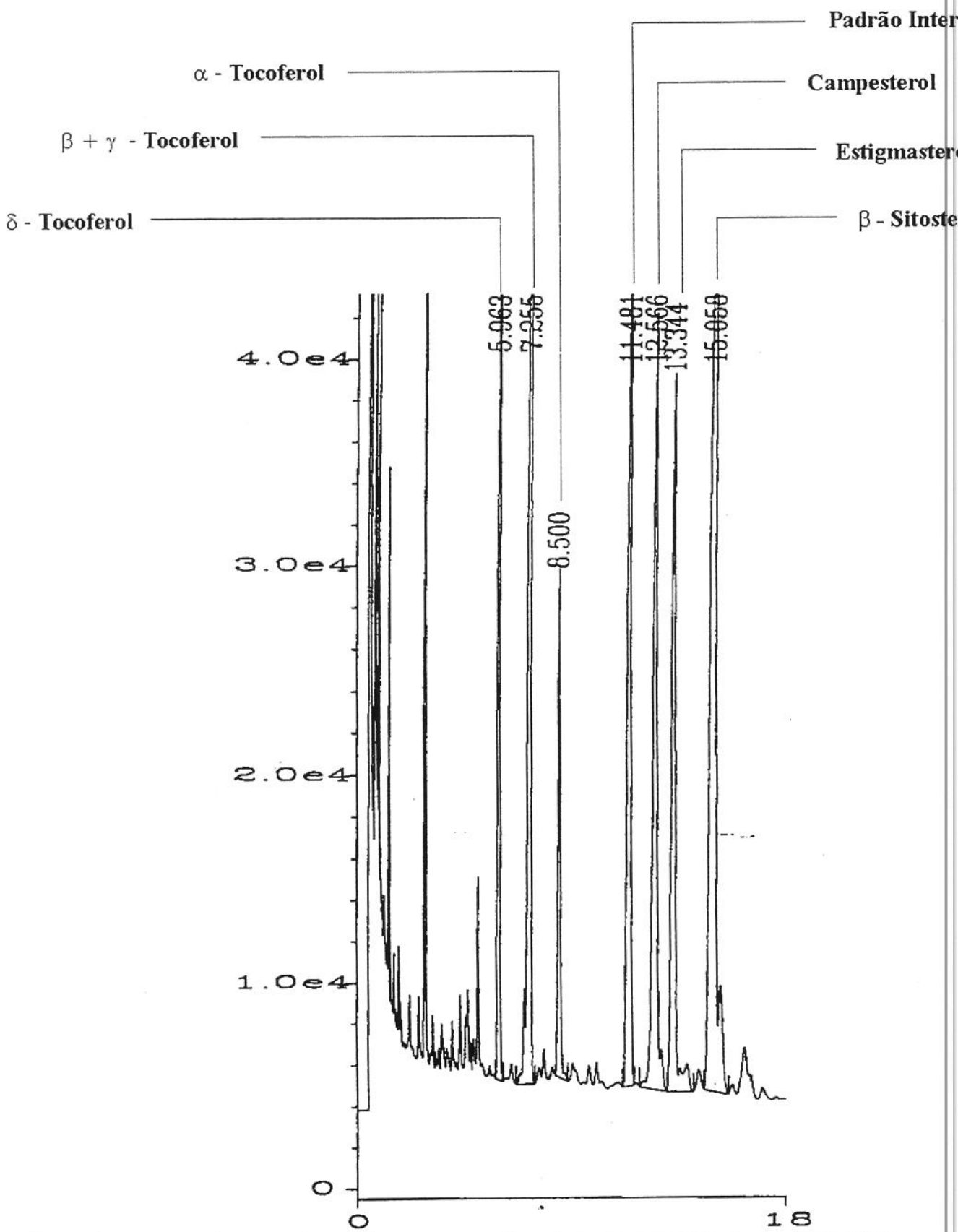
ANEXO 1



Cromatograma da separação dos tocoferóis por CLAE, das amostras de DDOS A, B, C e padrão referente à tabela 21.

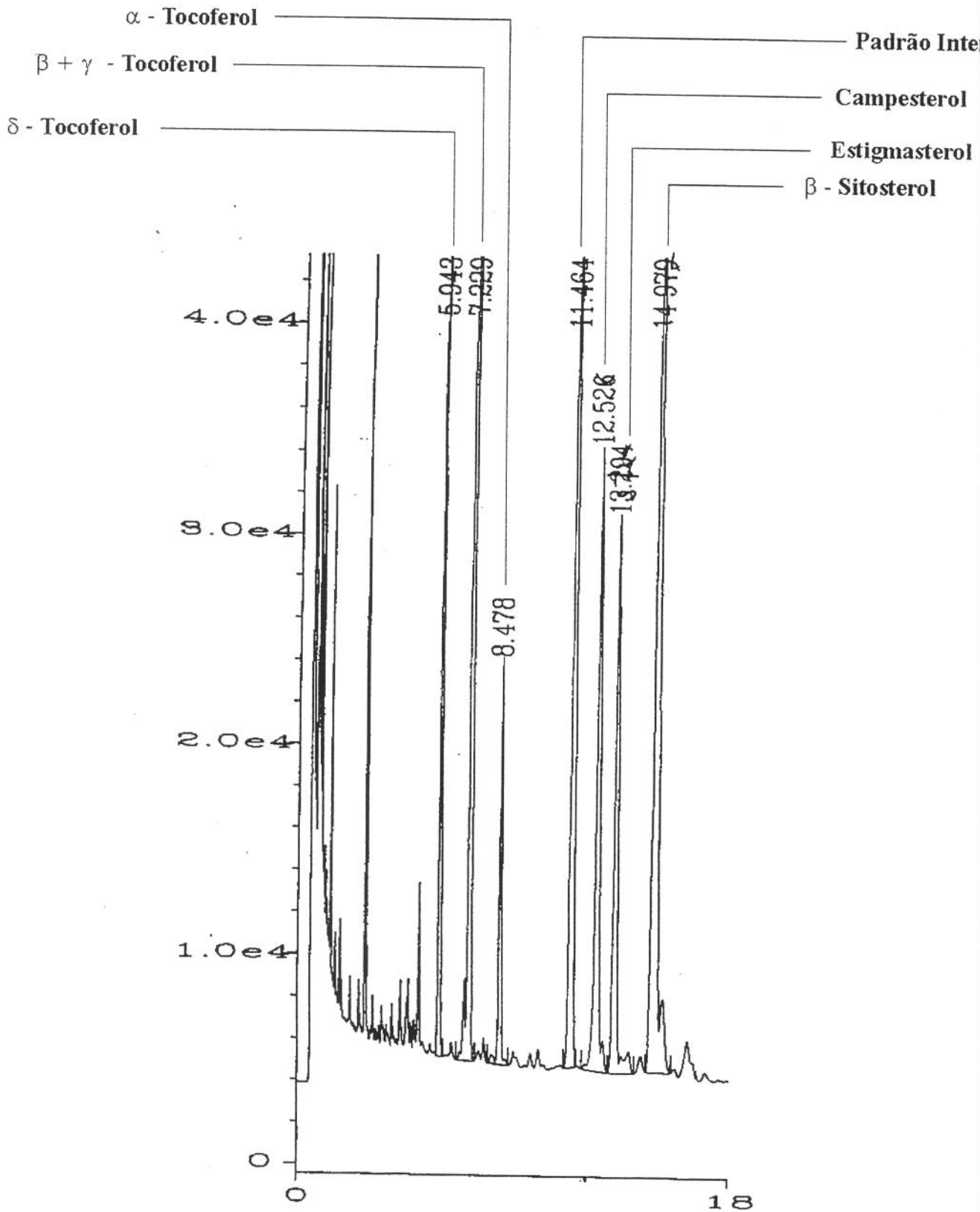
(CLAE coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300)

ANEXO 2



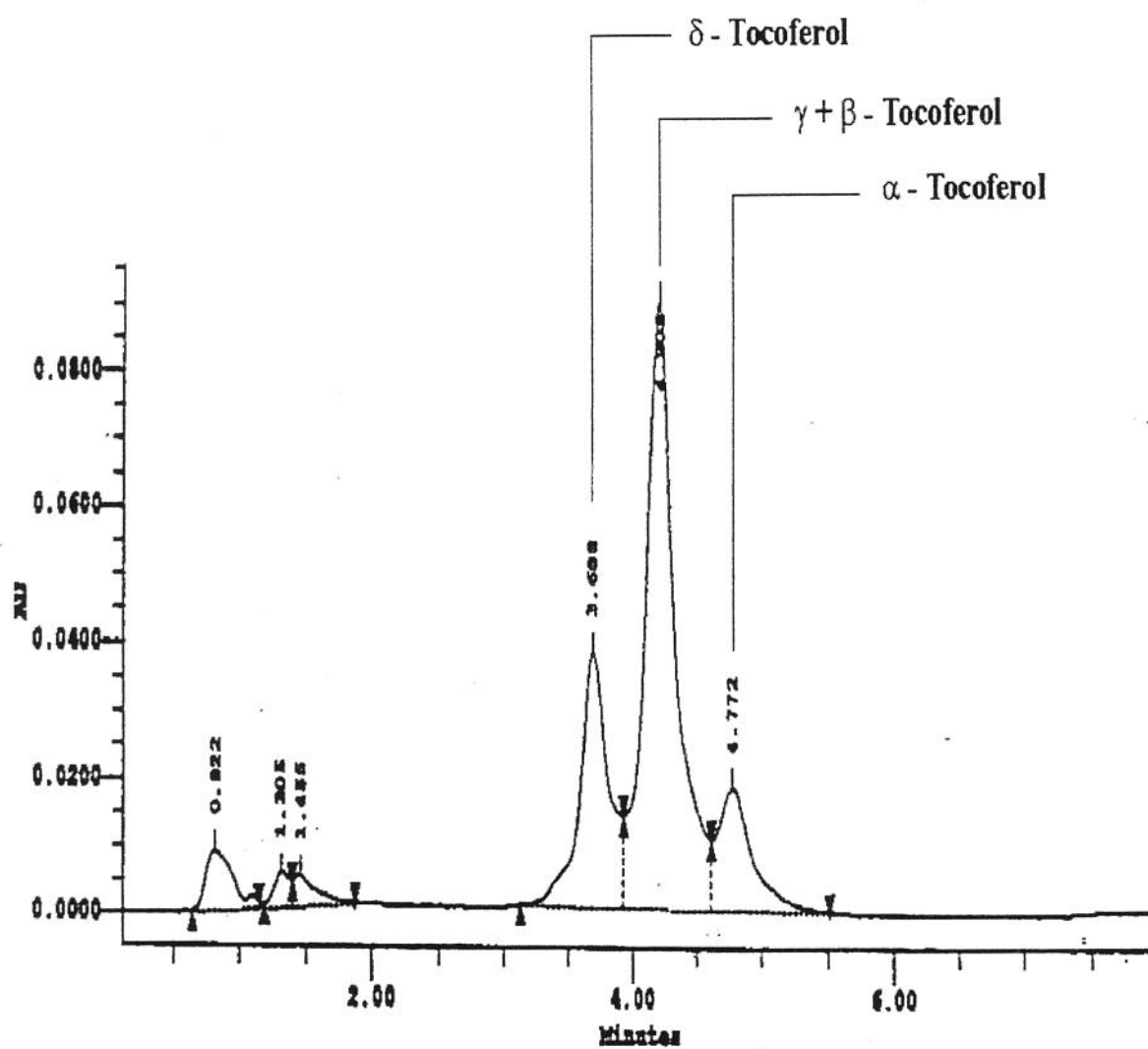
Cromatograma da amostra 1: separação dos tocoferóis e esteróis presentes no DDOS por cromatografia em fase gasosa (tabela 23).

ANEXO 3



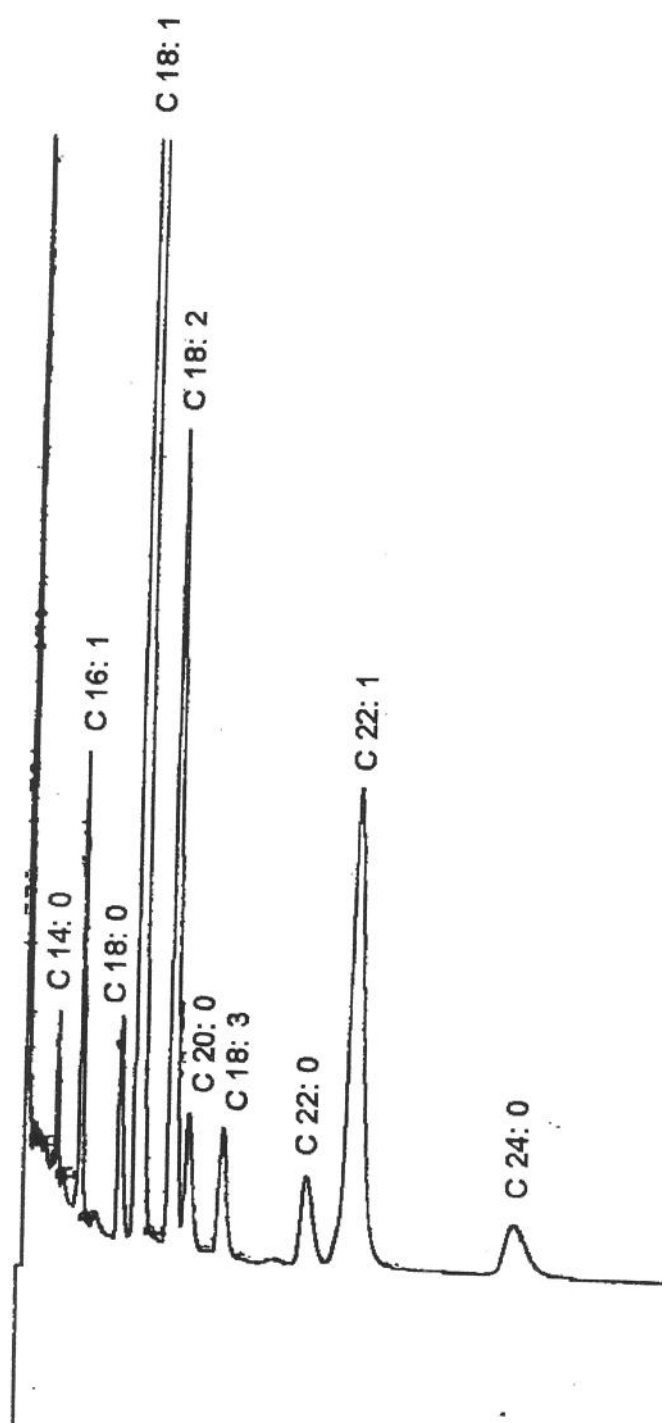
Cromatograma da amostra 2: separação dos tocoferóis e esteróis presentes no DDOS por cromatografia em fase gasosa (tabela 23).

ANEXO 4

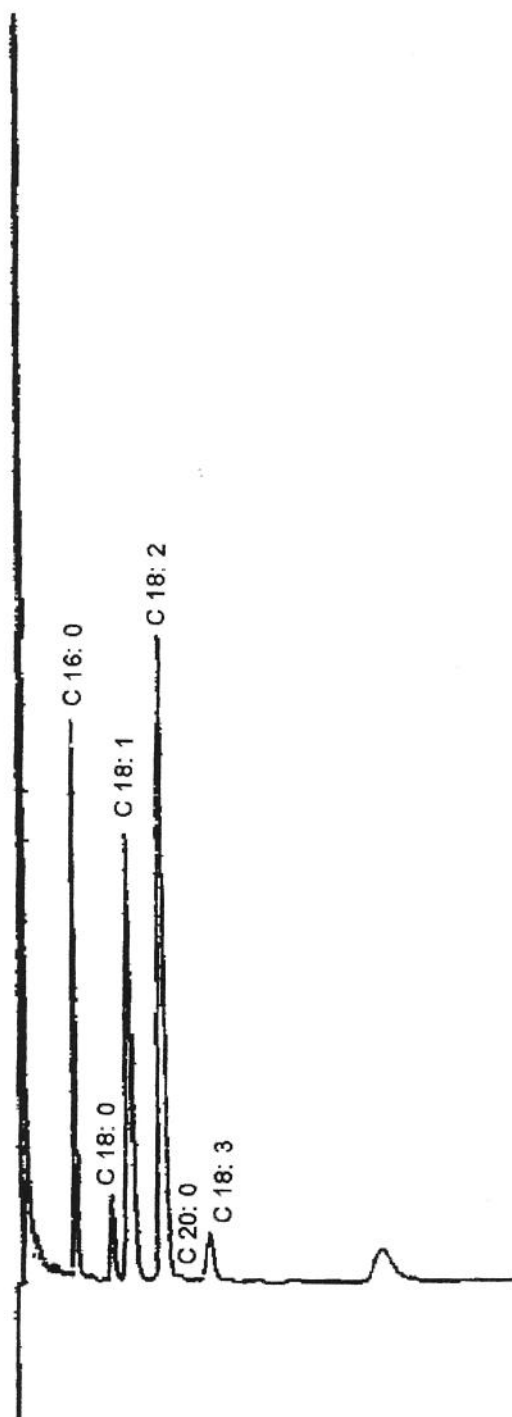


Cromatograma da separação dos tocoferóis presentes no DDOS por CLAE (coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300), (tabela 24).

ANEXO 5



Cromatograma da separação dos padrões dos ácidos graxos presentes no DDOS por cromatografia em fase gasosa (tabela 24).



Cromatograma da separação dos padrões dos ácidos graxos presentes no DDOS por cromatografia em fase gasosa (tabela 24).

ANEXO 7

Dados das figuras apresentadas no item 4.1: Caracterização da Matéria - Prima

Fator de concentração teórico de tocoferóis totais resultante da remoção dos diversos compostos do DDOS (**Figura 11**).

COMPOSTOS ^a	Nº ^b	%SR	FC
Sem extração de compostos	1	0	1
Esteróis Totais	2	14,66	1,17
Ácidos Graxos Livres	3	46,21	1,86
Soma dos Ácidos Graxos Livres e Esteróis	4	60,87	2,56
Ácidos Graxos Totais	5	62,39	2,66
Soma dos Ácidos Graxos Totais e Esteróis	6	77,05	4,36

a- compostos cujos valores encontram-se nas **Tabelas 22 e 23**.

b- numeração de identificação apresentada no gráfico da **Figura 11**.

Obteve-se a equação da curva teórica por regressão polinomial, empregando-se o software EXCEL 97.

$$y = 1E-05x^3 - 0,0008x^2 + 0,0245x + 0,9806 \quad R^2 = 0,9979$$

ANEXO 8

Dados das figuras apresentadas no item 4.2 : Extração de Tocoferóis por Cristalização Isotérmica

Fator de concentração dos tocoferóis (valor experimental e teórico) em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica a -20°C , em diversos solventes, com 20% de DDOS (Figura 12).

SOLVENTE	%SR	FC Experimental	FC * Teórico*
H Hexano	6,63	1,02	1,11
E Etanol	50,12	0,84	1,46
A- Acetona	27,75	1,35	1,26
I : H- Isopropanol : Hexano	3,96	0,77	1,07
I - Isopropanol	24,44	0,38	1,25
A : H - Acetona : Hexano	12,35	0,97	1,18
H : MEC - Hexano : Metil Etil Cetona	16,82	1,10	1,21
E : MEC - Etanol : Metil Etil Cetona	37,69	1,25	1,30

Fator de concentração dos tocoferóis (valor experimental e teórico) em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica a -20°C e a -80°C , em diversos solventes, com 10% e 16,7% de DDOS (Figura 13 e 14).

SOLVENTE	DDOS 16,67%			DDOS 10%		
	-20C			-80C		
	%SR	FC Experimental	FC teórico	%SR	FC Experimental	FC Teórico
ACETONA	21,2	1,27	1,24	64,4	1,47	1,91
ETANOL	28,8	0,93	1,26	61,3	0,86	1,78
METANOL	35,8	0,77	1,29	77,1	0,83	2,70
HÉXANO	3,4	1,02	1,06	24,4	1,15	1,25

Fator de concentração dos tocoferóis (valor experimental e teórico) em função da remoção dos sólidos para a cristalização isotérmica à -80°C , em hexano para diversas concentrações de DDOS (Figura 15).

DDOS	%SR	FC Experimental	FC* Teórico
10%	24,4	1,15	1,25
15%	72,4	1,57	2,36
20%	76,47	1,03	2,65

FC teórico: calculado pela equação obtida da regressão polinomial da curva teórica
 $y = 1\text{E-}05x^3 - 0,0008x^2 + 0,0245x + 0,9806$ $R^2 = 0,9979$

ANEXO 9A

Dados das figuras apresentadas no item 4.3: Emprego da Saponificação na Obtenção de Concentrados de Tocoferóis

Fator de concentração dos tocoferóis em função da composição do solvente e da concentração de DDOS, na presença ou ausência de Ca(OH)_2 , a 0°C (Figuras 16 a 19).

Solvente *	FATOR DE CONCENTRAÇÃO DOS TOCOFERÓIS									
	DDOS 10%		DDOS 15%		DDOS 20%		DDOS 25%			
	sem Ca(OH)_2	com Ca(OH)_2 .	sem Ca(OH)_2 .	com Ca(OH)_2 .	sem Ca(OH)_2 .	com Ca(OH)_2 .	sem Ca(OH)_2 .	com Ca(OH)_2 .	com Ca(OH)_2 .	
80,0	0,92	1,12	0,89	1,02	0,96	0,97	1,02	0,85		
85,0	1,09	1,37	1,03	1,37	0,91	1,22	0,97	0,95		
92,5	1,09	1,31	1,10	1,39	1,12	2,11	1,21	2,47		
100,0	1,02	1,02	1,02	0,97	1,03	1,04	1,06	1,03		

* solução acetona:água

Fração de sólidos removidos e fração de tocoferóis recuperados em função da da composição do solvente e da concentração de DDOS, na presença ou ausência de Ca(OH)_2 , a 0°C (Figura 20 e 21).

% DDOS	% SÓLIDOS REMOVIDOS				% TOCOFERÓIS RECUPERADOS			
	ACETONA 92,5% *		ACETONA 100%		ACETONA 92,5% *		ACETONA 100%	
	sem Ca(OH)_2	com Ca(OH)_2 .	sem Ca(OH)_2	com Ca(OH)_2	sem Ca(OH)_2	com Ca(OH)_2	sem Ca(OH)_2	com Ca(OH)_2
10	20,0	36,0	11,7	11,3	86,9	83,5	90,2	90,6
15	18,7	42,2	12,9	5,5	89,2	79,6	88,6	92,0
20	22,9	75,2	9,8	9,2	86,4	52,2	93,1	94,2
25	33,4	86,8	14,8	19,6	80,7	32,6	90,7	82,6

* solução acetona:água

ANEXO 9B

Fator de concentração dos tocoferóis, percentagem de sólidos removidos e percentagem de recuperação dos tocoferóis em função da composição da solução acetona:água e da concentração de DDOS na extração por saponificação à 0°C (Figura 22 a 24).

Solvente *	DDOS 5%			DDOS 10%			DDOS 15%			DDOS 20%			DDOS 25%		
	FC	%SR	%TTR	FC	%SR	%TTR	FC	%SR	%TTR	FC	%SR	%TTR	FC	%SR	%TTR
% Acetona															
80,0	1,08	53,34	49,54	1,01	58,45	46,44	1,02	72,30	28,02	0,97	85,69	13,80	0,85	93,78	5,23
85,0	1,32	51,22	64,30	1,37	52,80	64,51	1,37	56,10	60,06	1,22	69,87	36,73	0,95	88,38	11,02
90,0	1,48	47,67	77,25	1,46	50,11	72,19	1,50	60,95	58,60	2,47	77,05	56,40	2,13	85,15	31,53
92,5	1,39	28,56	100,20	1,34	43,24	76,06	1,40	48,36	72,41	2,44	75,22	60,51	2,56	86,60	34,24
95,0	1,24	32,33	89,49	1,20	28,56	84,60	1,14	27,13	82,79	1,30	41,39	76,19	1,74	80,75	33,42
97,5	-	-	-	-	-	-	1,26	27,20	84,57	1,10	24,35	-	-	-	-
100,0	1,02	13,60	88,32	1,01	11,68	89,47	1,02	11,68	89,86	1,040	9,76	93,81	1,06	15,36	90,09

* solução acetona:água

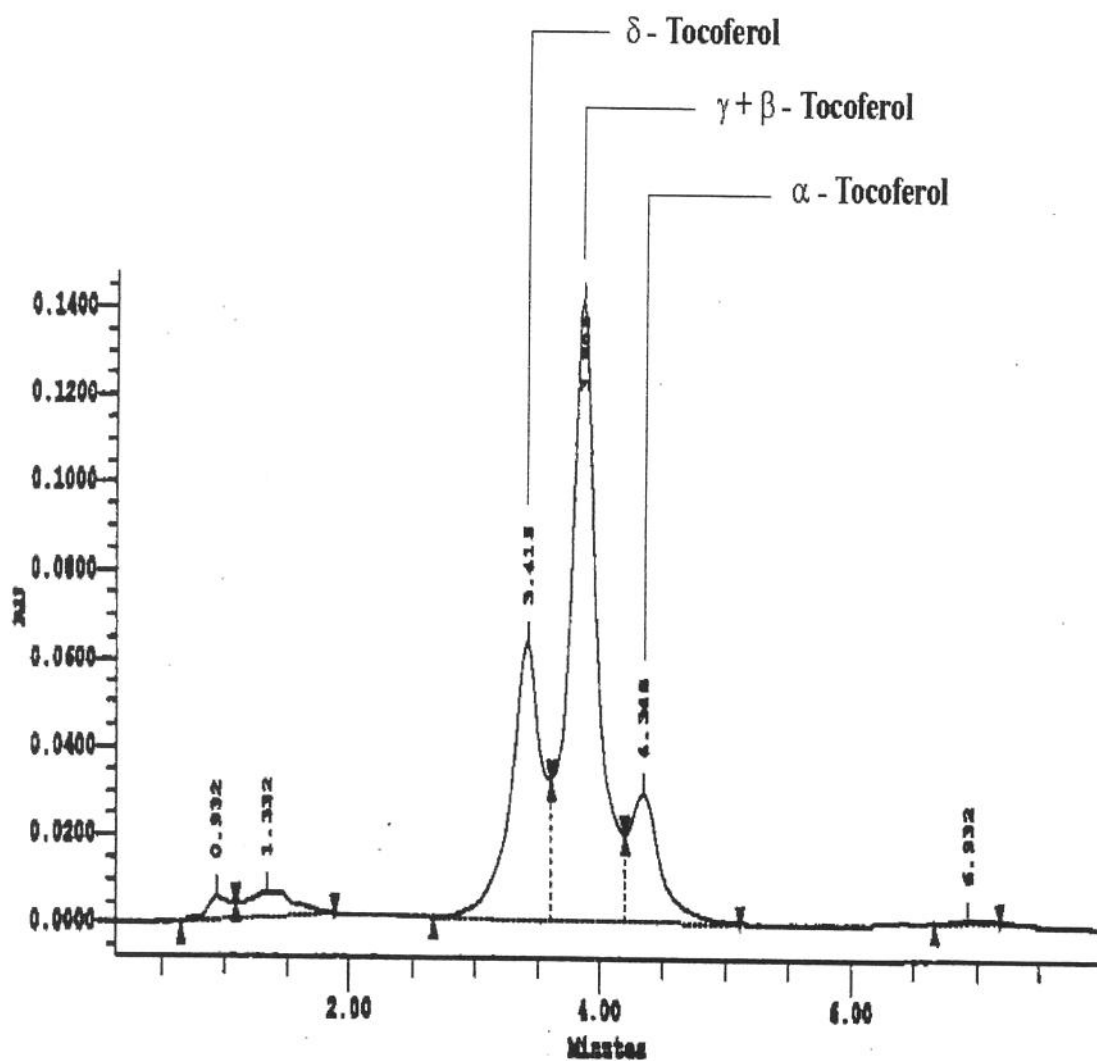
ANEXO 9C

Fator de concentração dos tocoferóis, percentagem de sólidos removidos e percentagem de recuperação dos tocoferóis em função da temperatura, da composição da solução acetona:água e da concentração de DDOS na extração por saponificação (**Figura 25 a 30**).

Solvente *	Temperatura °C	DDOS 10%			DDOS 15%			DDOS 20%		
		FC	%SR	%TTR	FC	%SR	%TTR	FC	%SR	%TTR
92,5%	-20	1,63	56,29	71,39	1,79	62,01	71,63	2,65	82,45	46,58
	0	1,40	40,34	84,66	1,59	46,91	84,58	2,48	78,68	52,71
	10	1,30	39,21	79,15	1,28	40,94	75,69	2,30	77,66	51,26
	20	1,19	27,73	85,88	1,17	29,60	82,52	2,26	75,52	55,20
100%	-20	1,015	22,31	78,83	1,17	27,60	86,23	1,26	40,69	74,47
	0	1,00	12,39	87,24	1,02	6,48	95,41	1,03	10,64	92,41
	10	1,00	-	-	1,04	-	-	1,09	-	-
	20	1,05	11,26	92,74	1,02	2,48	99,28	1,08	13,83	85,05

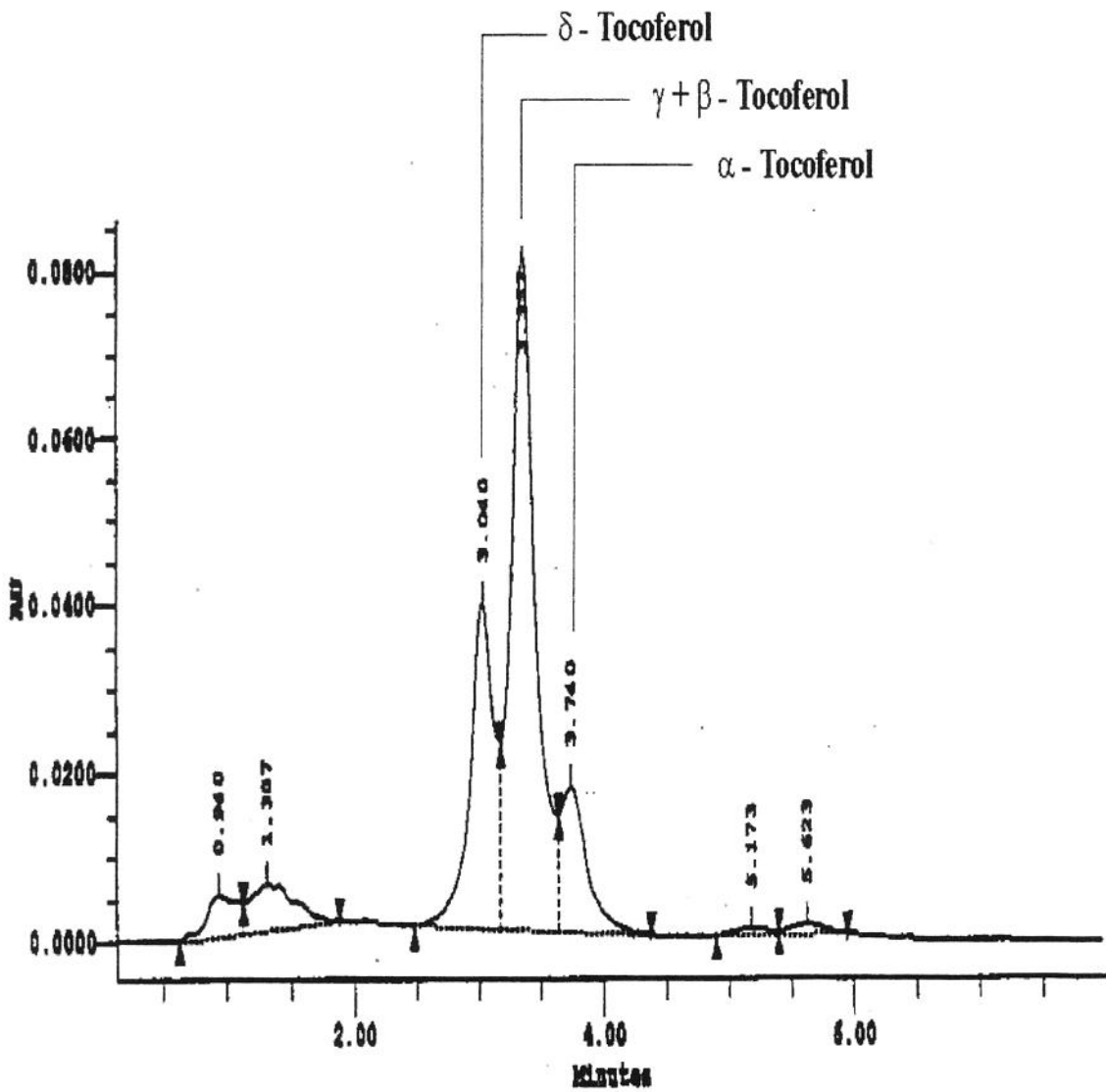
* solução acetona:água

ANEXO 10



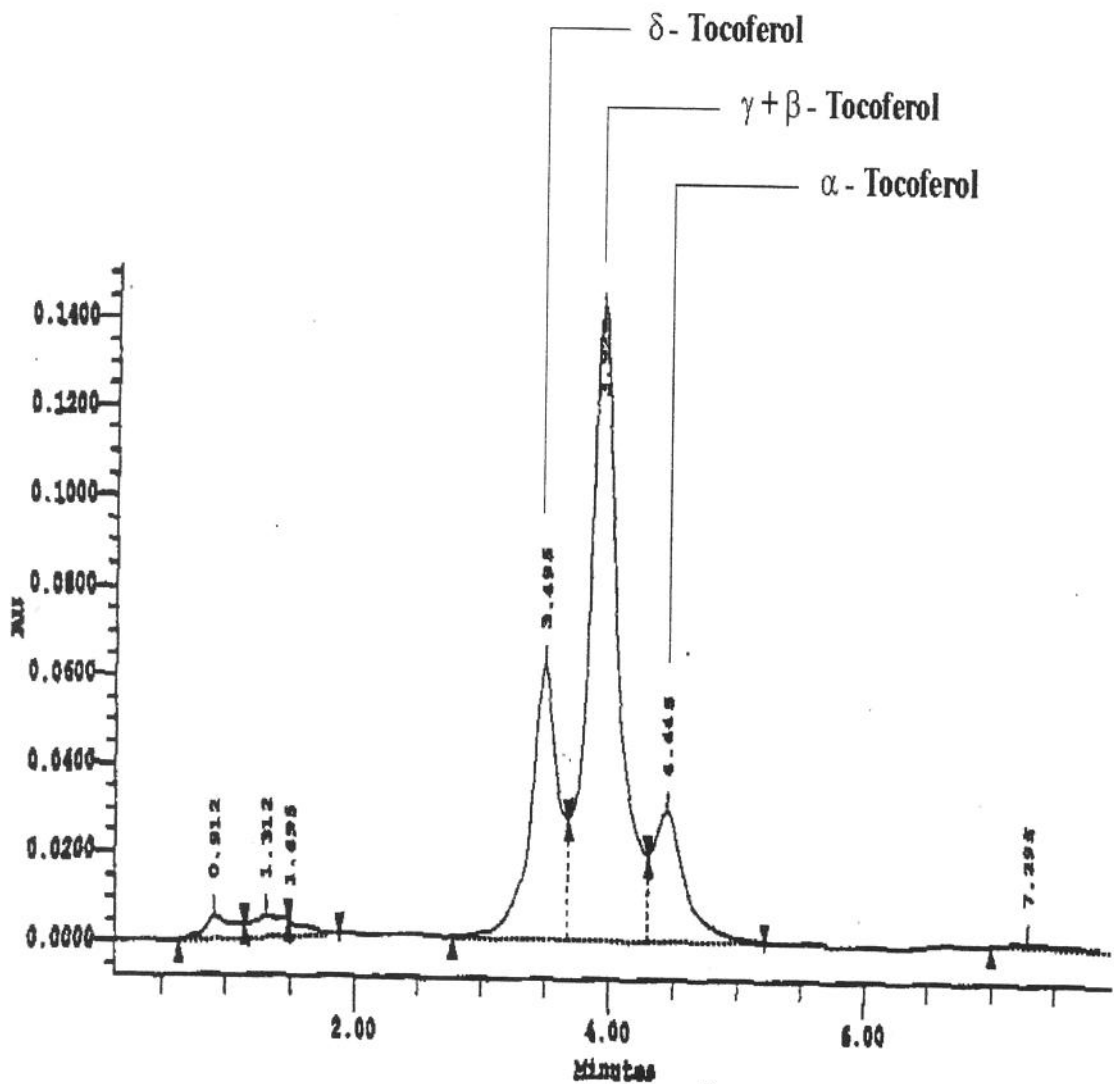
Cromatograma da separação dos tocoferóis individuais determinados por CLAE CLAE (coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300) dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação com DDOS 20%, solução acetona:água na concentração 90% (Tabela 26).

ANEXO 11



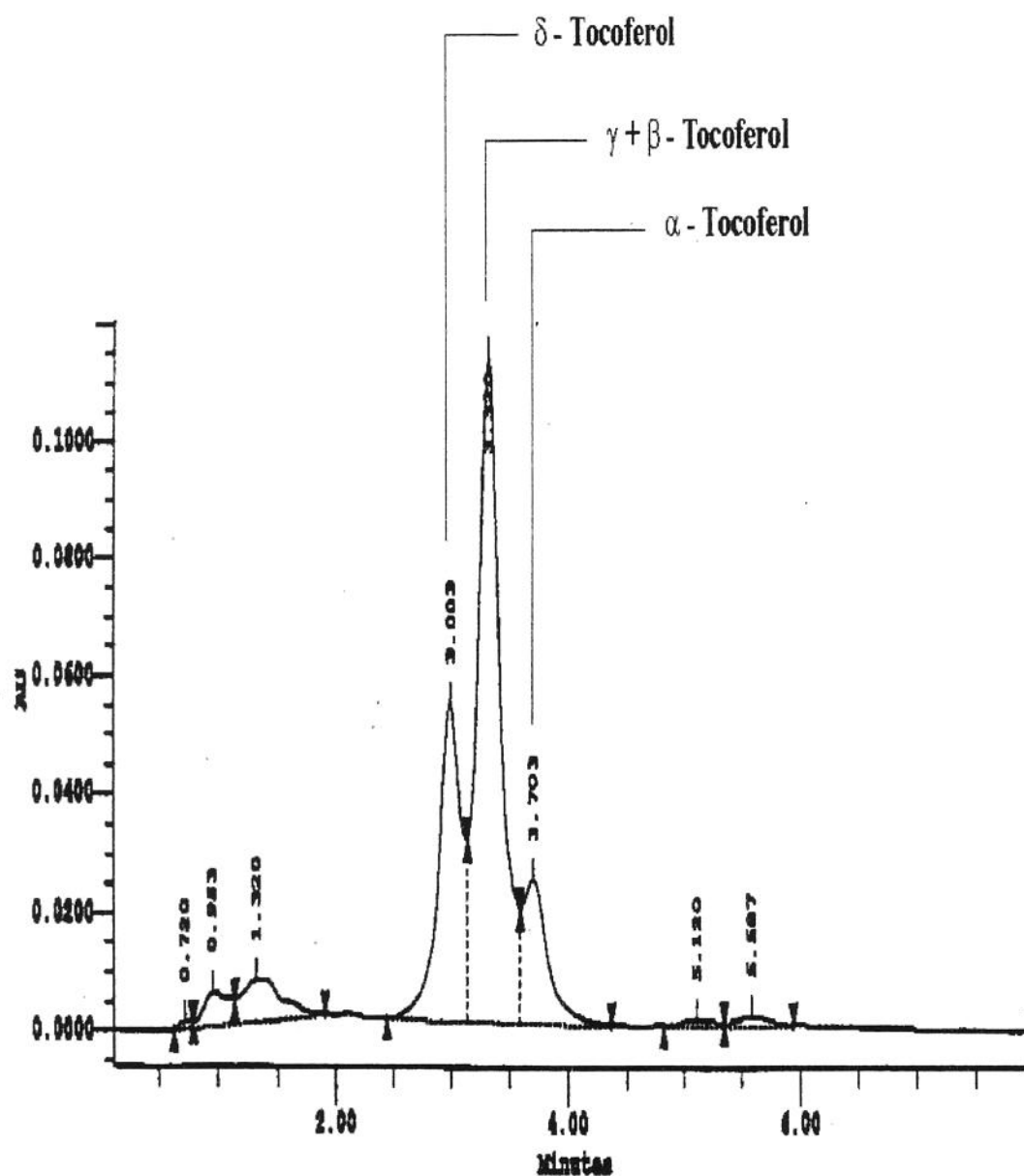
Cromatograma da separação dos tocoferóis individuais determinados por CLAE (coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300) dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação com DDOS 20%, solução acetona:água na concentração 92,5% (Tabela 26).

ANEXO 12



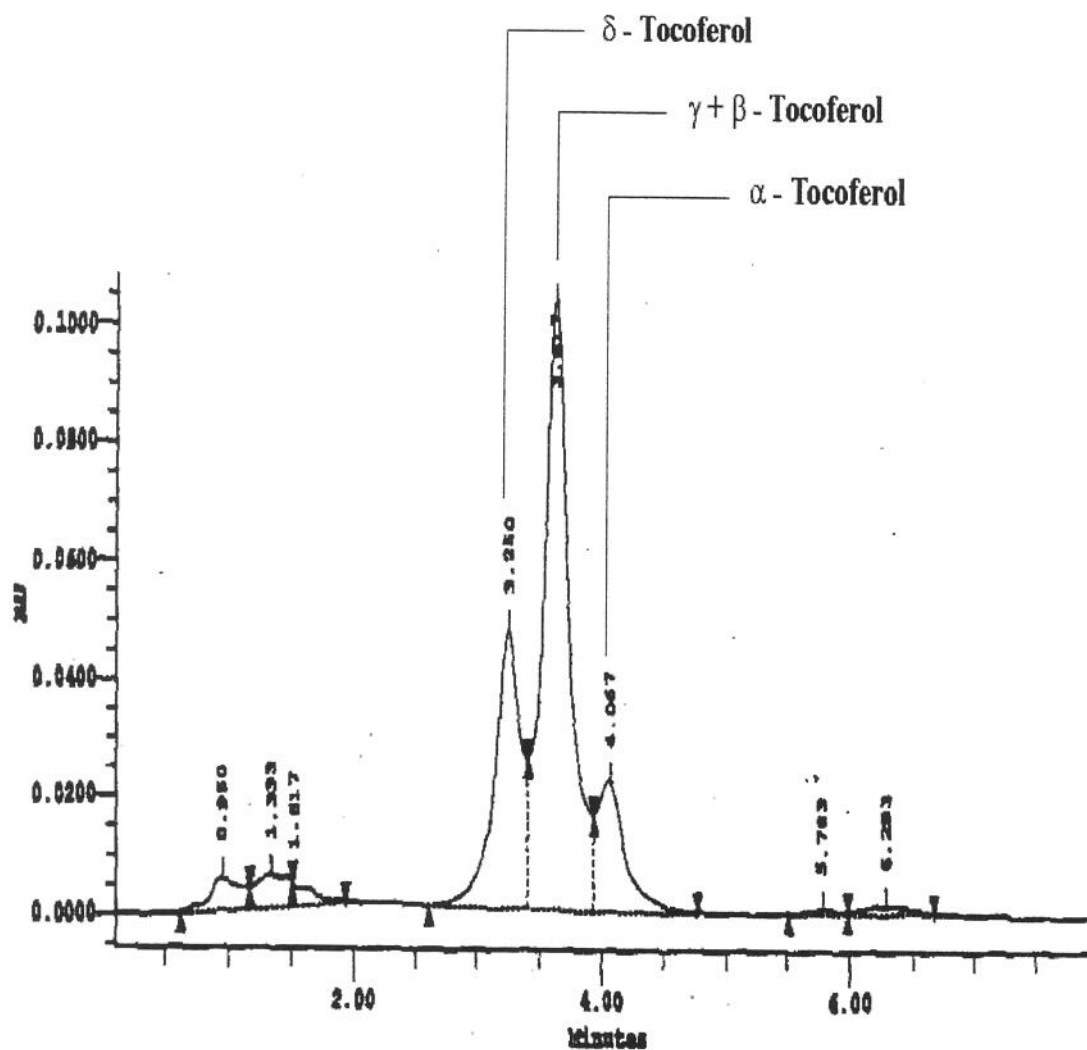
Cromatograma da separação dos tocoferóis individuais determinados por CLAE (coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300) dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação com DDOS 25%, solução acetona:água na concentração 92,5% (Tabela 26).

ANEXO 13



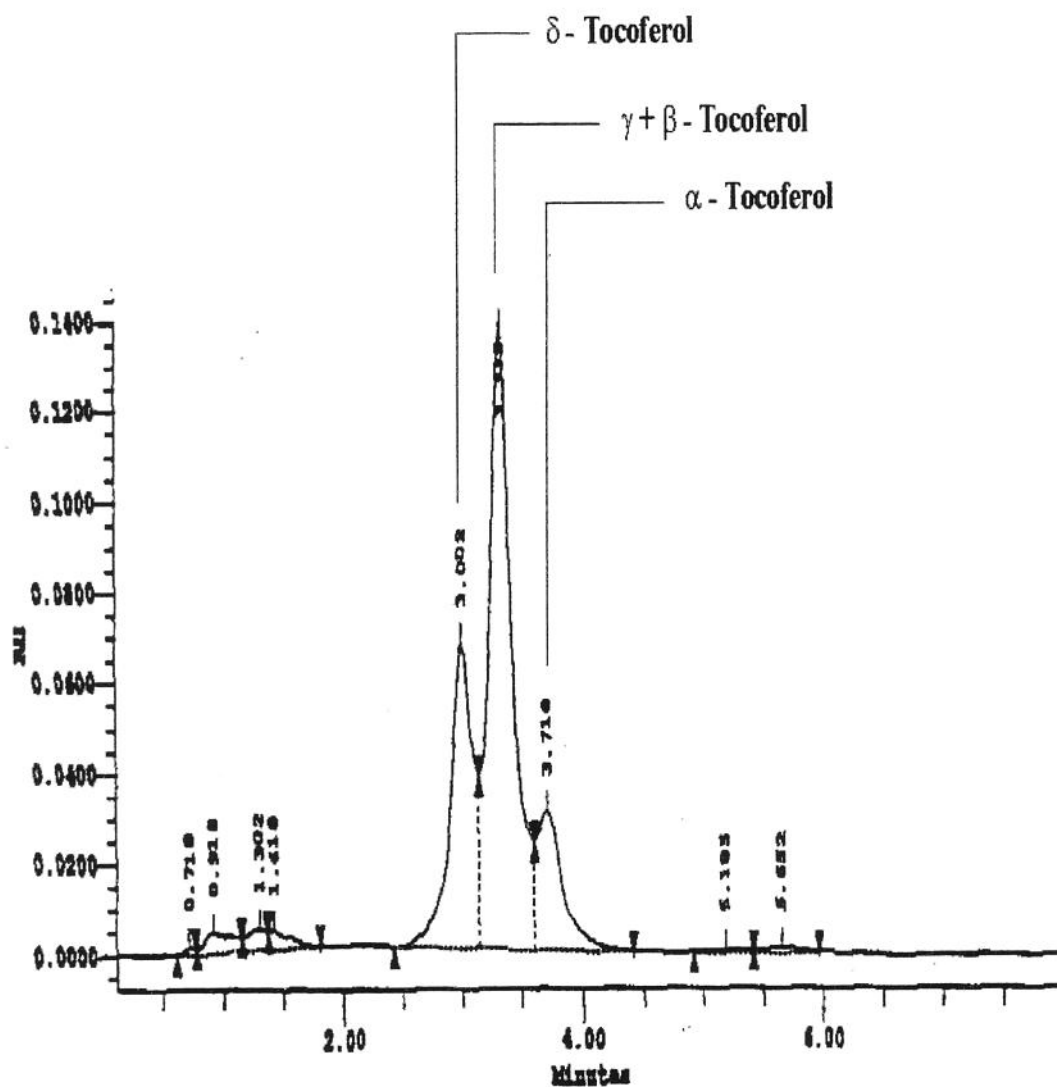
Cromatograma da separação tocoferóis individuais determinados por CLAE (coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300) dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação com DDOS 10%, solução acetona:água na concentração 92,5% (Tabela 28).

ANEXO 14



Cromatograma da separação dos tocoferóis individuais determinados por CLAE (coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300) dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação com DDOS 15%, solução acetona:água na concentração 92,5% (Tabela 28).

ANEXO 15



Cromatograma da separação dos tocoferóis individuais determinados por CLAE (coluna de fase reversa C18 Macro Sphere 300) dos concentrados obtidos nos ensaios com saponificação com DDOS 20%, solução acetona:água na concentração 92,5% (Tabela 28).

ANEXO 16

Dados das figuras apresentadas no item 4.4: Emprego da Saponificação Seguida de Cristalização Isotérmica em Diversos Solventes

Percentagem de sólidos removidos em função dos sólidos passíveis de remoção para DDOS a 5% submetido a saponificação seguida de cristalização em diferentes solventes à -20°C (Figura 31).

Curva Teórica	ACETONA	HEXANO	METANOL
% Sólidos passíveis de remoção	% Sólidos Removidos	% Sólidos Removidos	% Sólidos Removidos
0	0	0	0
53,3	48,16	48,16	48,16
74,6	71,86	67,88	58,22

Fator de concentração dos tocoferóis em função dos sólidos removidos para DDOS a 5%, submetido a saponificação seguida de cristalização em diferentes solventes à -20°C (Figuras 32).

ACETONA		HEXANO		METANOL	
FC	%SR	FC	%SR	FC	%SR
1	0	1	0	1	0
1,38	48,16	1,38	48,16	1,38	48,16
2,51	71,86	2,13	67,88	1,31	58,22

Fator de concentração dos tocoferóis e percentagem de sólidos removidos em função da concentração do DDOS, em acetona e hexano submetido a saponificação seguida de cristalização à -20°C (Figura 33 e 34).

% DDOS	ACETONA		HEXANO	
	Fator de Concentração	% Sólidos Removidos	Fator de Concentração	% Sólidos Removidos
5	2,51	71,9	2,13	67,9
10	1,85	79,5	1,48	76,4
15	1,38	83,9	0,99	77,6
20	1,26	80,9	1,03	74,5

ANEXO 17

Dados das figuras apresentadas no item 4.5: Emprego da Extração Líquido-Líquido Seguida de Cristalização Isotérmica.

Percentagem de sólidos removidos em função dos sólidos passíveis de remoção por extração líquido-líquido em hexano e etanol seguido de cristalização em acetona a -27°C (**Figura 35**) .

% Sólidos Removidos	% Sólidos passíveis de remoção
0	0
49,5	53,3
68,4	74,6

Fator de concentração dos tocoferóis em função da percentagem de sólidos removidos por extração líquido-líquido em hexano e etanol seguido de cristalização em acetona a -27°C (**Figura 36**) .

Fator de Concentração	% Sólidos Removidos
1	0
1,28	49,5
1,52	68,4

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE