

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PAULA FERNANDES DE SIQUEIRA**

**RECUPERAÇÃO DE FOSFOLIPÍDEOS RESIDUAIS DO FARELO  
DESENGORDURADO DE SOJA**

**SÃO CARLOS - SP**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PAULA FERNANDES DE SIQUEIRA**

**RECUPERAÇÃO DE FOSFOLIPÍDEOS RESIDUAIS DO FARELO  
DESENGORDURADO DE SOJA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel de Lima Camargo Giordano**

**Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli**

**SÃO CARLOS - SP**

**2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S618rf      Siqueira, Paula Fernandes de.  
              Recuperação de fosfolipídeos residuais do farelo  
              desengordurado de soja / Paula Fernandes de Siqueira. --  
              São Carlos : UFSCar, 2014.  
              118 f.

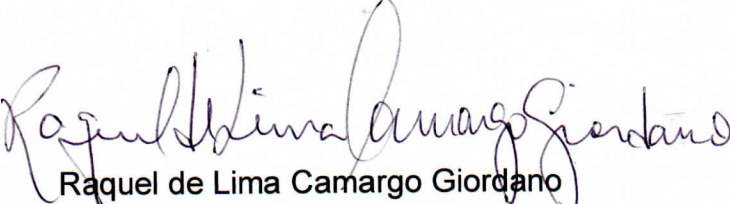
              Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
              2014.

              1. Processos de fabricação. 2. Lecitina. 3. Farelo de soja.  
              4. Concentrado protéico. 5. Fosfolipídios. I. Título.

CDD: 664.024 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE PAULA FERNANDES DE SIQUEIRA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 07 DE AGOSTO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:



Raquel de Lima Camargo Giordano  
**(Orientadora), UFSCar**




Roberto de Campos Giordano  
**UFSCar**



Francisco Maugeri Filho  
**UNICAMP**



Anny Manrich  
**EMBRAPA**



Willian Kopp  
**UFSCar**

## RESUMO

Na indústria de processamento de soja, a extração do óleo com hexano gera o farelo desengordurado. A seguir, a produção de concentrado proteico de soja (SPC, na sigla em inglês) a partir do farelo desengordurado, utilizando solução de etanol, gera como subproduto uma micela alcoólica. Após etapas de recuperação do etanol e concentração dessa micela, um produto açucarado denominado melaço de soja é produzido. Observações da presença de uma fração viscosa (precipitado) nos tanques de estocagem da micela alcoólica motivaram este estudo que visou a recuperação desse material rico em fosfolipídios, principais componentes da lecitina, a qual apresenta alto valor no mercado de derivados da soja. O trabalho foi então dividido em três etapas: desenvolvimento de metodologia, testes laboratoriais e testes industriais. Em primeiro lugar, foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida para quantificação de fosfolipídios. Em seguida, ensaios em escala de laboratório foram elaborados para se avaliar a eficiência de extração de fosfolipídios do farelo desengordurado de soja em diferentes sistemas de solventes, além de estudar o comportamento de cada fosfolipídio no sistema de solventes selecionado e a correlação entre extração de fosfolipídios e concentração de proteínas. O processo de extração de fosfolipídios residuais do farelo desengordurado foi estudado empregando misturas de solventes variadas. Os seguintes rendimentos foram obtidos, em % (m fosfolipídios/m farelo):  $0,43 \pm 0,01$  (Hexano),  $1,44 \pm 0,03$  (Hexano: Etanol 4:1),  $1,08 \pm 0,07$  (Clorofórmio: Metanol 2:1),  $1,48 \pm 0,01$  (Etanol 75% v/v). Uma vez que a extração com etanol 75% foi mais eficiente, o sistema de solvente etanol: água foi mais profundamente estudado, por ser também esse o sistema empregado na produção de SPC. Variando-se a concentração de etanol, a melhor condição de extração (70% v/v de etanol) permitiu recuperação de  $1,53 \pm 0,02\%$  (m/m) de fosfolipídios no extrato e 71,69% (m/m) de proteína na fração sólida (farelo). A solubilidade dos fosfolipídios também foi testada em etanol aquoso e permaneceu entre 0,499 g/L em etanol 50% (v/v) a 25°C e 6,225 g/L em 90% (v/v) de etanol a 75°C. Por último, foram realizados testes industriais, a fim de observar a produção do material em condições reais de processo. Os testes realizados foram de centrifugação da micela e recuperação da goma (lecitina), e de secagem do material obtido em secador contínuo, além de análises analíticas e comerciais do produto, puro ou como componente de chocolates. Foi possível obter

lecitina dentro das especificações comerciais, com alta qualidade, e um rendimento de recuperação de aproximadamente 18,7 g de lecitina para cada quilograma de farelo desengordurado seco. Os resultados desse trabalho demonstraram a possibilidade de aproveitamento de um resíduo da produção de concentrado protéico de soja, presente na micela alcoólica residual do processo.

Palavras-chave:

Lecitina, Farelo desengordurado, Concentrado Proteico de Soja, Fosfolipídios

## ABSTRACT

In soybean processing industry, oil extraction with hexane generates defatted meal. Next, soybean protein concentrate (SPC, abbreviation in English) production from the defatted meal by using ethanol solution generates alcoholic micelle as a byproduct. Following stages of ethanol recovery and concentration of that micelle, a sugared product called soybean molasses is produced. Observations of the presence of a viscous fraction (precipitate) in storage tanks of alcoholic micelle were the reason of this study which aimed at recovery of that phospholipids-rich material, main components of lecithin which presents high value in the market of soybean derivatives. So, the work was divided into three stages: development of technology, laboratory testing, and industrial testing. First of all, an analytical method by liquid chromatography for quantification of phospholipids was developed and validated. Next, assays in laboratory scale were worked out in order to evaluate the efficiency of phospholipids extraction from soybean defatted meal in different solvent systems, besides studying the behavior of each phospholipid in the system of solvent selected and the correlation between phospholipid extraction and protein concentration. The extraction process of residual phospholipids from defatted meal was studied by using varied mixtures of solvents. The following yields were obtained, in % (m phospholipids/m meal):  $0.42 \pm 0.01$  (Hexane),  $1.44 + 0.03$  (Hexane: Ethanol 4:1),  $1.08 \pm 0.07$  (Chloroform: Methanol 2:1),  $1.48 \pm 0.01$  (Ethanol 75% v/v). As the extraction with 75% ethanol was the most efficient, the ethanol system : water was more deeply studied, because that is also the system used in SPC production. By varying the ethanol concentration, the best condition of extraction (70% v/v ethanol) enabled a recovery of  $1.53 \pm 0.02\%$  (m/m) of phospholipids in the extract and 71.69% (m/m) of protein in solid fraction. Solubility of phospholipids was also tested in aqueous ethanol and remained between 0.499 g/L in 50% ethanol (v/v) at 25°C and 6.225 g/L in 90% (v/v) ethanol at 75°C. At last, industrial tests were carried out, in order to observe the production of material from actual conditions of process. Tests carried out were on micelle centrifugation and gum recovery (lecithin), and on drying of material obtained in continuous drier, besides analytical and commercial assays of the product, pure or as component of chocolates. It was possible to obtain a lecithin within commercial specifications, with high quality, and a yield of recovery of approximately 18.7 g lecithin to each kilogram of dried defatted meal. Results from

this work showed the possibility of utilization of a residue from the soybean protein concentrate present in residual alcoholic micelle of the process.

### **Keywords**

Lecithin, Defatted Meal, Soybean Protein Concentrate, Phospholipids.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processamento convencional da soja.....	22
Figura 2 - Fluxograma simplificado do processamento da soja com produção de SPC .....	24
Figura 3 - Fluxograma de Produção Tradicional de Lecitina de Soja.....	25
Figura 4 - Processo de degomagem com água (Alfa-Laval). ....	27
Figura 5 - Composição aproximada dos concentrados proteicos obtidos por diferentes metodologias.....	32
Figura 6 - Diagrama de fluxo do processo de produção de SPC por extração alcoólica.....	33
Figura 7 - Amostra de melão de soja.....	36
Figura 8 - Estruturas dos principais fosfolípidios. ....	39
Figura 9 - Classificação dos Lípidios.....	43
Figura 10 - Organização dos fosfolípidios: lipossoma, micela e membrana celular das células.....	44
Figura 11 - Representação da membrana celular. ....	44
Figura 12 - Exemplo de estrutura para a fosfatidilcolina. ....	46
Figura 13 - Diagrama de Blocos do Processo de Extração Sólido – Líquido.....	49
Figura 14 - Esquema representativo da extração em Soxhlet.....	69
Figura 15 - Fluxograma da extração com o método Bligh & Dyer (1959). ....	70
Figura 16 - Centrifuga utilizada durante a execução dos ensaios industriais .....	75
Figura 17 - Esquema do funcionamento da fábrica de concentrado proteico de soja (SPC) e localização da centrífuga de teste no processo (pontilhado).....	75
Figura 18 - Ilustração da localização dos medidores de vazão utilizados para o balanço de massa da centrifugação industrial.....	77
Figura 19 - Representação esquemática do evaporador vertical (esquerda), e evaporador vertical (direita). ....	79
Figura 20 - Amostra de uma tonelada de goma enviada.....	79
Figura 21 - Fluxograma do evaporador e equipamentos acessórios usados na secagem de .....	80
Figura 22 - Visão geral do sistema piloto .....	81
Figura 23 - Valores de Recuperação dos Fosfolípidios.....	85

Figura 24 - Rendimentos de extração de óleo (a, b) e fosfolipídios (c, d) para a soja (b, d) e o farelo desengordurado (a, c) por diferentes metodologias de extração.....	88
Figura 25 - Perfil de fosfolipídios obtido pelos métodos de B&D e hexano: etanol para a soja e o farelo desengordurado.....	91
Figura 26 - Perfil de fosfolipídios obtido para cada solvente testado na extração de farelo desengordurado de soja.....	93
Figura 27 - Recuperação de proteína (linha pontilhada) e rendimentos de extração de fosfolipídios (linha contínua) do farelo desengordurado de soja em função do teor de etanol no solvente de extração.....	96
Figura 28 - Variação dos rendimentos nas extrações dos principais fosfolipídios em função do teor alcoólico. Resultados expressos em fosfolipídios por farelo desengordurado seco (g/100g).....	97
Figura 29 - Solubilidade dos fosfolipídios totais presentes na lecitina em pó em função da concentração alcoólica. Resultados expressos em gramas de fosfolipídios totais por litro de solvente.....	98
Figura 30 - Perfil de solubilidade dos principais fosfolipídios em função do teor alcoólico.....	99
Figura 31 - Solubilidades dos fosfolipídios totais em função da temperatura nas concentrações alcoólicas fixas de 50, 75 e 90%.....	100
Figura 32 - Visor de linha da saída de goma úmida do sistema de recuperação ...	104
Figura 33 - Amostra de Lecitina enviada para cliente .....	105
Figura 34 - Comparação amostras de lecitina obtidas com condições de secagem diferentes: quanto mais escura a lecitina, maior a pressão de vapor utilizada no processo de secagem.....	108
Figura 35 - Amostras de lecitina obtidas do teste de secagem.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção aproximada entre os diferentes lipídios nos grãos de soja durante as diversas fases de crescimento e desenvolvimento do grão. ....	28
Tabela 2 - Composição das lecitinas comerciais (%). ....	29
Tabela 3 - Composição do melão de soja. ....	36
Tabela 4 - Gradiente de eluição do método. ....	65
Tabela 5 - Avaliação da seletividade. ....	83
Tabela 6 - Linearidade dos Fosfolipídios dentro da faixa estudada. ....	84
Tabela 7 - Precisão dos Fosfolipídios dentro da faixa estudada. ....	84
Tabela 8 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com o aumento da temperatura do forno. ....	86
Tabela 9 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com a redução da temperatura do forno. ....	86
Tabela 10 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com o aumento de ácido (Fase B) na fase móvel. ....	86
Tabela 11 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com a redução de ácido (Fase B) na fase móvel. ....	87
Tabela 12 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com o aumento de fluxo. ....	87
Tabela 13 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com a redução do fluxo. ....	87
Tabela 14 - Resultados Cálculo de Turkey da diferença significativa (TSD), para rendimento de extração de Fosfolipídios em Soja. ....	89
Tabela 15 - Rendimentos de extração de fosfolipídios obtidos para diferentes solventes com 24 horas de extração em Soxhlet. ....	93
Tabela 16 - Rendimentos das extrações de fosfolipídios e proteína com diferentes proporções de etanol: água. ....	95

Tabela 17 - Concentrações de saturação dos quatro principais fosfolipídios em diferentes condições de teor alcoólico e temperatura. ....	100
Tabela 18 - Resultados do ensaio de centrifugação industrial e análises de umidade e voláteis da goma e teor de insolúveis em acetona da goma determinados em laboratório.....	103
Tabela 19 - Rendimento relativo da centrífuga industrial .....	104
Tabela 20- Resultados analíticos das amostras.....	105
Tabela 21 - Resumo condições de operação e umidade final da lecitina obtida ....	107
Tabela 22 - Resultados para o teor de fosfolipídios das amostras de lecitina após secagem .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AOAC - *Association of Analytical Communities*
- AOCS - *American Oil Chemists' Society*
- B&D – Bligh e Dyer (1959)
- DPR – desvio padrão relativo
- DTSR – equipamento dessolventizador, secador e resfriador
- EDTA - ácido etileno diamino tetracético
- ELSD – método de detecção cromatográfica por espalhamento de luz evaporativo
- FDA - *Food and Drug Administration*
- HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
- A.I. – índice de insolúveis em acetona
- IBC - *Intermediate Bulk Container* ou recipiente para mercadorias a Granel
- ISO - Organização Internacional para Padronização
- Número CAS - número de registro no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*, uma divisão da *Chemical American Society*
- Mextrato – massa do extrato
- PA – ácido fosfatídico
- PC – fosfatidilcolina
- PI – fosfatidilinositol
- PE – fosfatidiletanolamina
- PG – fosfatidilglicerol
- PL – fosfolipídios
- PLextrato – teor de fosfolipídios do extrato
- ppm – partes por milhão
- r – limite de repetibilidade
- S – desvio padrão
- SPC – Concentrado proteico de soja
- SPI – isolado proteico de soja
- U - umidade
- UFC – unidades formadoras de colônia

## SUMARIO

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2.0</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	19
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	19
<b>3.0</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>A SOJA E O PROCESSAMENTO DA SOJA</b>	20
<b>3.1.1</b>	<i>A Soja</i>	20
<b>3.1.2</b>	<i>O Processamento Da Soja</i>	21
<b>3.1.3</b>	<i>A Produção De Lecitina De Soja</i>	24
<b>3.1.4</b>	<i>Composição Da Lecitina De Soja</i>	28
<b>3.1.5</b>	<i>Concentrado Proteico De Soja (SPC)</i>	29
<b>3.1.6</b>	<i>O Melaço De Soja</i>	35
<b>3.2</b>	<b>LECITINA</b>	37
<b>3.2.1</b>	<i>Fosfolipídios</i>	42
3.2.1.1	Fosfatidilcolina (PC)	45
3.2.1.2	Fosfatidilserina (PS)	46
3.2.1.3	Fosfatidilinositol (PI)	47
3.2.1.4	Fosfatidiletalamida (PE)	47
3.2.1.5	Ácido Fosfatídico (PA)	47
3.2.1.6	Fosfatidilglicerol (PG)	48
<b>3.3</b>	<b>PROCESSOS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO</b>	48
<b>3.3.1</b>	<i>Extração De Lipídeos</i>	51
<b>3.3.2</b>	<i>Fosfolipídios Residuais Na Soja E Seus Derivados</i>	52
<b>4.0</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>ANÁLISES – METODOLOGIAS ANALÍTICAS EXISTENTES</b>	60
<b>4.1.1</b>	<i>Proteína</i>	60
<b>4.1.2</b>	<i>Umidade</i>	60
<b>4.1.3</b>	<i>Lipídios</i>	60
<b>4.1.4</b>	<i>Índice De Peróxido</i>	61
<b>4.1.5</b>	<i>Viscosidade</i>	61
<b>4.1.6</b>	<i>Índice de acidez</i>	61
<b>4.1.7</b>	<i>Insolúveis Em Acetona</i>	61
<b>4.1.8</b>	<i>Impurezas Na Lecitina</i>	62
<b>4.1.9</b>	<i>Sensoriais</i>	62
<b>4.1.10</b>	<i>Microbiológicas</i>	62

4.1.11	<i>Açúcares</i>	63
4.2	<b>DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS</b>	63
4.2.1	<i>Validação de método cromatográfico de perfil de fosfolipídios em lecitina.</i>	64
4.2.2	<i>Estudo de quantificação de fosfolipídios em matrizes sólidas</i>	68
4.3	<b>TESTES LABORATORIAIS</b>	70
4.3.1	<i>Avaliação Extração Fosfolipídios Do Farelo Desengordurado De Soja com Diferentes Solventes</i>	71
4.3.2	<i>Otimização Do Processo De Extração</i>	72
4.3.3	<i>Avaliação Comportamento Dos Fosfolipídios Individuais Em Diferentes Concentrações de Etanol e Temperatura</i>	72
4.4	<b>TESTES INDUSTRIAIS E PILOTO</b>	74
4.4.1	<i>Teste industrial de recuperação</i>	74
4.4.2	<i>Produção De Amostra E Avaliação De Clientes</i>	78
4.4.3	<i>Teste De Secagem Piloto</i>	78
5.0	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	82
5.1	<b>DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE FOSFOLIPÍDIOS</b>	82
5.1.1	<i>Validação De Método Cromatográfico De Perfil De Fosfolipídios</i>	82
5.1.1.1	Seletividade	83
5.1.1.2	Linearidade	83
5.1.1.3	Precisão	84
5.1.1.4	Exatidão	85
5.1.1.5	Robustez	85
5.1.2	<i>Estudo Da Quantificação De Fosfolipídios Em Matrizes Sólidas</i>	88
5.2	<b>TESTES LABORATORIAIS</b>	92
5.2.1	<i>Determinação Do Método De Extração De Fosfolipídios Do Farelo Desengordurado De Soja</i>	92
5.2.2	<i>Otimização Do Processo De Extração</i>	94
5.2.3	<i>Avaliação Do Comportamento Dos Fosfolipídios Individuais Em Solução Etanólica</i>	97
5.3	<b>TESTES INDUSTRIAIS</b>	101
5.3.1	<i>Teste Industrial De Recuperação</i>	101
5.3.2	<i>Produção De Amostras E Avaliação De Clientes</i>	105
5.3.3	<i>Teste De Secagem Piloto E Avaliação De Amostras</i>	107
6.0	<b>CONCLUSÕES</b>	111
7.0	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	113

## 1.0 INTRODUÇÃO

No processo convencional das esmagadoras de soja, ocorre a extração do óleo bruto com hexano. Os produtos e subprodutos gerados nesse processamento são: farelos de soja com proteínas de 44 a 48%, óleo de soja degomado ou refinado, casca de soja, lecitina de soja, desodorizado de refino (contendo tocoferol) e borra de refino. Além do processo convencional, algumas esmagadoras possuem um processo adicional de extração dos açúcares que resulta na produção do concentrado protéico de soja com até 70% proteína b.s. e no subproduto melaço de soja.

A lecitina de soja é um emulsificante natural largamente utilizado na indústria de alimentos sendo obtida através da hidratação dos fosfolipídios presentes no óleo de soja bruto, após extração com hexano. Usualmente, os rendimentos de produção de lecitina a partir do grão de soja são da ordem de 0,6 a 1% (lecitina acabada em base grão).

O concentrado proteico de soja, produto que contém um mínimo de 65% de proteína em base seca, é obtido através da remoção dos componentes não proteicos do farelo desengordurado, usualmente com o emprego de etanol diluído. O processo é conduzido sob condições nas quais a maior parte das proteínas se torna insolúvel, sendo dissolvidos principalmente os açúcares e outros constituintes de menor tamanho, permanecendo no farelo principalmente proteína e polissacarídeos da parede celular. O material extraído, após a recuperação do etanol, é denominado melaço de soja, e é aproveitado como substrato para produção de etanol por leveduras ou queimado para geração de vapor e energia elétrica.

Observações no processo industrial de obtenção do concentrado proteico em uma esmagadora de soja indicaram a presença de um resíduo precipitado no fundo de um dos tanques de processo. Análises detalhadas revelaram, apesar de muitas impurezas, a presença de fosfolipídios no material precipitado. Esses fosfolipídios não foram extraídos em conjunto com o óleo, durante o processo convencional de extração da soja com hexano e assim, permaneceram no farelo de soja desengordurado, sendo removidos somente na etapa de extração alcoólica do farelo para a produção de concentrado proteico. No processo atual da indústria, os fosfolipídios dessa etapa são descartados com o melaço, e sua recuperação, se factível, poderia aumentar o faturamento uma vez que os



fosfolipídios de soja apresentam valor comercial. Esta foi a principal motivação para o desenvolvimento deste trabalho, que visa, assim, a recuperação de lecitina do farelo de soja desengordurado em escala industrial. A sua execução, contudo, envolveu uma série de etapas, iniciando pela obtenção de um método confiável para quantificação dos fosfolipídios e terminando pela avaliação por clientes de amostras obtidas através de ensaios em escala piloto. No capítulo 2, a seguir, estão descritos os objetivos e/ou discriminadas as etapas experimentais que foram seguidas para se atingir o objetivo principal deste trabalho.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi a recuperação em escala industrial de fosfolipídios residuais no farelo de soja desengordurado, presentes na fração líquida (micela) obtida ao se submeter esse farelo ao processo de concentração para gerar o produto sólido SPC.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

A partir do objetivo geral estabelecido, e durante o desenvolvimento do trabalho, foram definidos os seguintes objetivos específicos para a condução deste trabalho:

- Desenvolver uma metodologia analítica para determinação de fosfolipídios;
- Quantificar o teor residual de fosfolipídios no farelo desengordurado de soja;
- Verificar a influência de diferentes solventes e misturas deles, bem como suas concentrações, na extração de fosfolipídios presentes no farelo de soja desengordurado;
- Determinar a eficiência de extração, pureza do extrato obtido e seletividade de cada solvente em relação aos perfis de fosfolipídios obtidos;
- Otimizar as condições de extração a fim de maximizar o rendimento da extração de fosfolipídios e concentração de proteínas concomitantemente;
- Realizar testes em escala piloto e industrial para validação dos resultados de laboratório, recuperação e secagem da lecitina.
- Produzir amostras para avaliação por clientes.

### 3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A SOJA E O PROCESSAMENTO DA SOJA

##### 3.1.1 A Soja

A soja selvagem (*Glycine soja*) é originária da Ásia Oriental, e retém pouca semelhança com a espécie cultivada atualmente (*Glycine max* (L.)). Originária da Ásia Oriental antes de 1000 aC, a soja selvagem era uma videira anual com pequenas flores roxas e sementes pequenas, duras, arredondadas e pretas a marrom escuras. Hoje, a planta cresce selvagem em Taiwan, norte e nordeste da China, Coréia, Japão e União Soviética. Cada uma das pequenas sementes de soja selvagem provavelmente pesava apenas cerca de um nono do peso das sementes de soja cultivadas hoje. Seus rendimentos em óleo são baixos quando comparados à semente atual, mas,; por outro lado, apresentam proporção maior de proteína. A soja produzida hoje é resultado da seleção de variedades ao longo de 30 séculos. (SOYINFO, 2007).

A planta de soja cultivada hoje tem entre 24 e 36 cm de altura, com sementes em grande parte amarelo-palha, que crescem em vagens. Em geral, a soja amadurece e está pronta para colheita de 90 a 100 dias após o plantio, com variedades que podem demorar 75 ou mais de 200 dias. (SOYINFO, 2007).

O primeiro nome conhecido para a soja foi *shu*, um termo usado no norte da China, no século 11 aC. Até o século XIX o termo *ta-tou*, ou "grande feijão" veio a ser o termo mandarim padrão para a soja. Desde os tempos antigos na China, a soja foi considerada a mais importante leguminosa cultivada e um dos cinco grãos sagrados. Nos séculos 14 e 15, a soja se difundiu lentamente para fora da Ásia Oriental. Em 1712 iniciaram-se as descrições da planta e sua associação com a alimentação, e em 1875 o seu cultivo como cultura comercial se intensificou. A soja chegou aos EUA provavelmente entre 1565 e 1780, e no Brasil em 1882 (SOYINFO, 2007).

No final da década de 60, dois fatores internos tornaram a soja um produto com valor comercial no Brasil: a soja era usada como opção de verão, alternando com o trigo, a principal cultura da época, e a produção crescente de suínos e aves aumentava a demanda por farelo de soja. Em 1966, a produção

comercial de soja se tornou uma necessidade estratégica, com uma produção de 500 mil toneladas no País. Com o aumento do preço da soja no mercado mundial, em meados de 1970, os agricultores e o governo brasileiro privilegiaram ainda mais a cultura. Investimentos em pesquisa permitiram plantar o grão com sucesso em regiões de baixas latitudes. Atualmente, os líderes mundiais na produção de soja são os Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai. (EMBRAPA SOJA, 2013).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás dos EUA. Na safra 2009/2010, a cultura ocupou uma área de 23,6 milhões de hectares, com uma produção de 68,7 milhões de toneladas e produtividade média de 2941 kg por hectare (EMBRAPA SOJA, 2013). Na safra 2012/2013, a área ocupada pela cultura subiu para 27,7 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 81,5 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 2938 kg por hectare nesse período. (EMBRAPA SOJA, 2014).

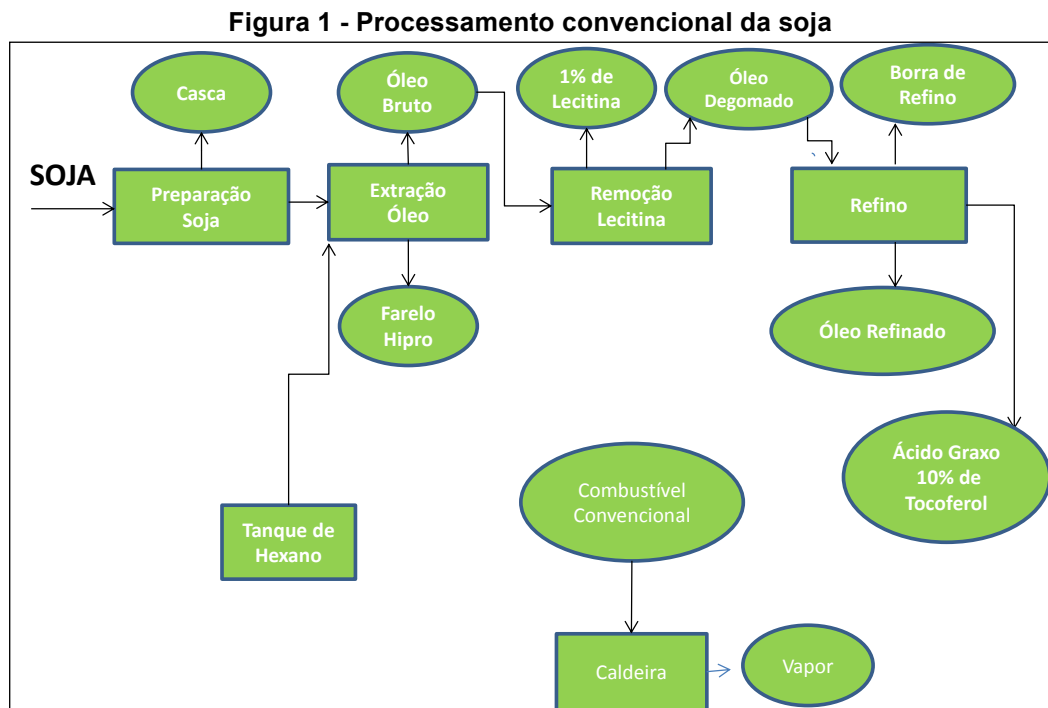
A produção mundial de soja na safra de 2012/2013 foi de 267,9 milhões de toneladas, com uma área plantada de 108,7 milhões de hectares. O Mato Grosso e o Paraná são os estados com maior produção no Brasil. Em termos econômicos, a exportação de soja e derivados movimentou 26,1 bilhões de dólares em 2012, sendo US\$ 17,4 bilhões (29,1 milhões t) de grãos, US\$ 6,6 bilhões (13,7 milhões t) de farelo e US\$ 2,1 bilhões (1,6 milhões t) de óleo (EMBRAPA SOJA, 2014).

### **3.1.2 O Processamento Da Soja**

O processamento tradicional da soja é exemplificado na Figura 1. No processo convencional adotado pelas esmagadoras de soja a extração do óleo bruto ocorre com hexano. Os produtos e subprodutos gerados no processo são: farelos de soja com teor de proteínas entre 44 e 48%, óleo de soja degomado ou refinado, casca de soja, lecitina de soja (1% base soja), desodorizado de refino (10% de Tocoferol) e borra de refino.

Conforme a Figura 1, o processamento convencional da soja envolve a remoção do óleo por extração com solvente, sendo que o óleo é posteriormente processado. O farelo proteico residual tem alta qualidade e pode ser usado para alimentação tanto humana quanto animal. A casca pode ser removida ou não, em

etapa de descascamento anterior à remoção do óleo. O farelo de soja comum tem como aplicação principal a alimentação animal (MIRANDA, 2012).



Fonte: Acervo Próprio

A primeira etapa do processamento de soja geralmente inclui a limpeza e remoção de materiais indesejáveis como caules, folhas, grãos quebrados, sujeira, areia, pequenas pedras e sementes estranhas, através de peneiras vibratórias ou aspiração. Os grãos limpos são quebrados por moinhos de rolos. Peneiras vibratórias, aspiradores e mesas gravitacionais podem ser utilizados para separar a casca do restante do grão, já que estes apresentam densidades distintas (MIRANDA, 2012). Nessa etapa do processo, a soja tem cerca de 12% de umidade. Se o conteúdo de água for maior, a soja pode ser seca antes de ser armazenada para prosseguimento do processamento. (LIANG *et al.*, 2005).

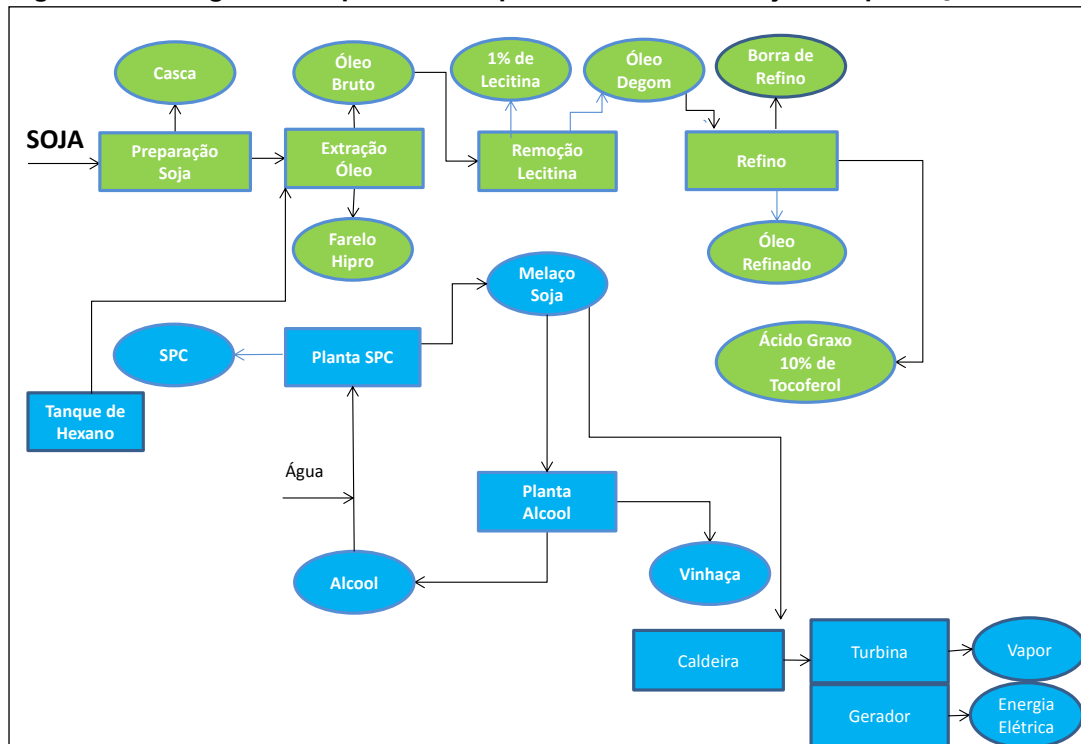
Para o seguimento da etapa de extração do óleo, é necessário romper a parede impermeável do grão da soja por compressão das partículas. Para isso, a soja é condicionada por aquecimento em cozedores à temperatura de 60-70°C por 10 a 30 minutos. (MIRANDA, 2012; MARSMAN, 1998). O calor também remove fatores anti-nutricionais como inibidores de tripsina (LIANG *et al.*, 2005). A Laminação é realizada pela passagem dos fragmentos condicionados através de um conjunto de dois rolos de superfície lisa.

Na extração, o solvente frequentemente utilizado é o hexano. (MIRANDA, 2012). O hexano é considerado um solvente apropriado, pois dissolve com facilidade o óleo sem agir sobre os outros componentes da soja, possui uma composição homogênea e uma faixa estreita de temperatura de ebulição, é imiscível em água e tem baixo calor latente de vaporização. Suas desvantagens são principalmente a alta inflamabilidade e alto custo. Existem muitas variações de método de extração (por imersão ou percolação; contínuo ou semi-contínuo) e design de extratores (Desmet, Rotocell, Crown, entre outros). Em geral se emprega o fluxo contracorrente do solvente em relação ao das lâminas para reduzir a quantidade de solvente utilizada. O processo dura de 30-60 minutos, com alta eficiência: o residual de óleo no material extraído é inferior a 1%. A massa sólida que deixa o extrator é dessolventizada e tostada em um aparelho vertical que combina a evaporação do solvente com uma cocção úmida, denominado dessolventizador-tostador (MIRANDA, 2012). Essa é a etapa mais crítica do processo, sendo necessário o controle das variáveis do processo: temperatura, pressão, umidade e tempo de residência. (MARSMAN, 1998). Após a dessolventização,, o material é seco, resfriado, moído e segue para armazenamento.

A extração do óleo também pode ser realizada mecanicamente utilizando, por exemplo, uma prensa de fricção. Esse farelo possui de 4 a 8% de óleo residual. O farelo de soja pode sofrer processamento adicional para ser usado na alimentação animal, como peletização, adição de enzimas ou nutrientes e tratamento por aquecimento, ou ainda produção de farinha, isolados e concentrados de soja (LIANG *et al.*, 2005).

Em algumas esmagadoras o processamento de soja inclui não somente as etapas previamente citadas (Figura 1), mas também abrange as etapas de produção de concentrado proteico de soja até 70% proteína em base seca (SPC), etanol, melaço de soja, e energia elétrica por cogeração, conforme demonstrado na Figura 2. O processo de produção de SPC é explicado em detalhes em 3.2.3, enquanto que a produção de melaço de soja e suas aplicações são detalhadas em 3.2.4..

**Figura 2 - Fluxograma simplificado do processamento da soja com produção de SPC**



Fonte: Acervo Próprio

### 3.1.3 A Produção De Lecitina De Soja

O óleo de soja bruto tem entre 1 e 3% de fosfolipídios, percentual que é reduzido para 0,32 a 0,64% após a degomagem (GUPTA, 2007). As primeiras pesquisas sobre a produção de lecitina e lecitina de soja foram realizadas na Europa, primeiro na França, e em seguida, na Alemanha. Os primeiros estudos datam de 1793 e 1812, com a detecção e isolamento de gorduras contendo fósforo. Theodore Nicolas Gobley isolou de ovos, em 1846, uma substância viscosa e laranja capaz de formar emulsão em água, que adquiriu o nome lecitina em 1850. Schulze e Steiger verificaram, em 1889, a presença de lecitina em sementes de plantas, como a soja. Hermann Bollmann foi o primeiro a verificar a possibilidade de tornar a lecitina um produto comercial, publicando uma patente sobre extração de lecitina de óleo de soja (SOYINFO CENTER, 2007).

A produção de lecitina de soja passa pelas etapas básicas de filtração do óleo, degomagem e processamento (secagem) (CROWN, 2013). A lecitina de soja não transgênica é um produto com alto valor comercial.

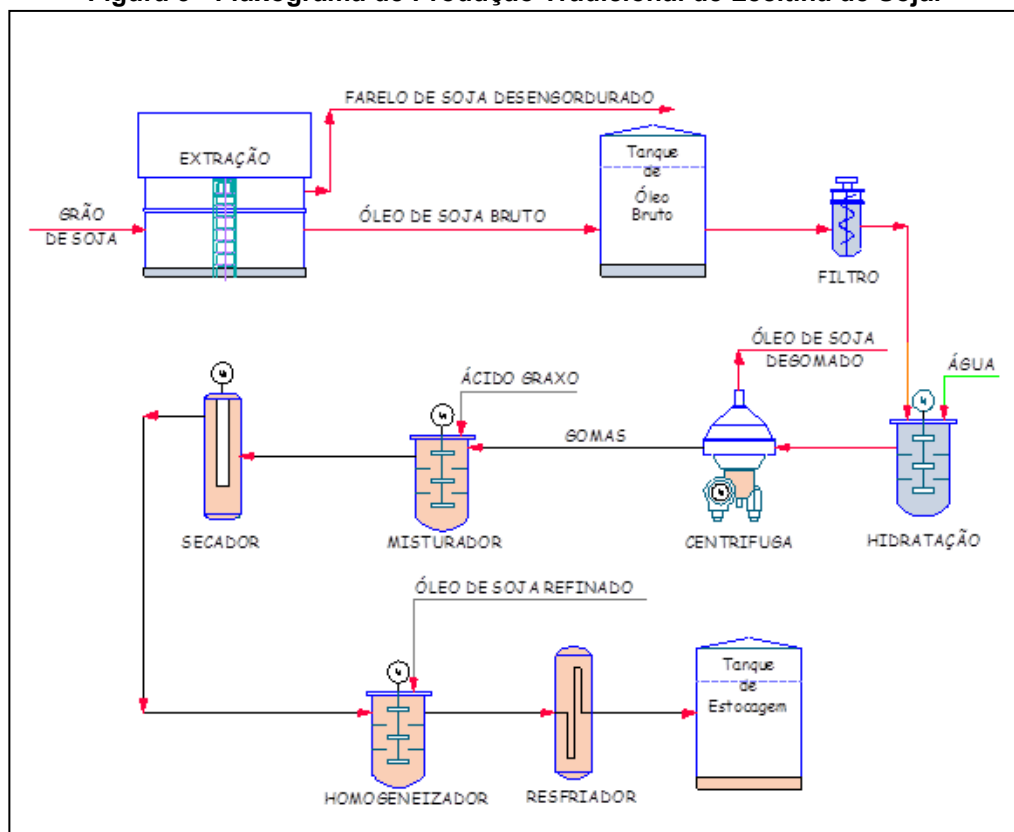
A produção de lecitina de soja pelo processo convencional sempre foi ligada à fabricação de óleo de soja. Os processos comumente utilizados para

extração do óleo de soja são extração com solvente e extração com prensa. Em ambos os processos, grande parte da lecitina é extraída juntamente com o óleo bruto (STANLEY, 1951). Na extração direta com hexano, o óleo contém aproximadamente de 2 a 3% de fosfolipídios (RITTNER, 2002). Após um processo de degomagem, mediante hidratação dos fosfolipídios e separação dos mesmos por centrifugação, as gomas separadas podem ser incorporadas aos farelos de soja ou secas, dando origem às lecitinas comerciais tradicionais (RITTNER, 2002).

As lecitinas tradicionais são fluidas e contém aproximadamente 47% de fosfolipídios em 62% de materiais insolúveis em acetona. A partir destas, mediante processamento complementar, pode-se produzir lecitinas de diversos tipos (RITTNER, 2002).

O processamento para a lecitina tradicional fluida pode ser, dessa forma, resumido em cinco operações unitárias: hidratação do óleo bruto ; separação da goma; adição de ácido graxo para correção da acidez; secagem; adição de óleo para correção do índice de insolúveis em acetona e resfriamento. A Figura 3 mostra um fluxograma ilustrativo destas operações.

**Figura 3 - Fluxograma de Produção Tradicional de Lecitina de Soja.**



Fonte: Acervo Próprio



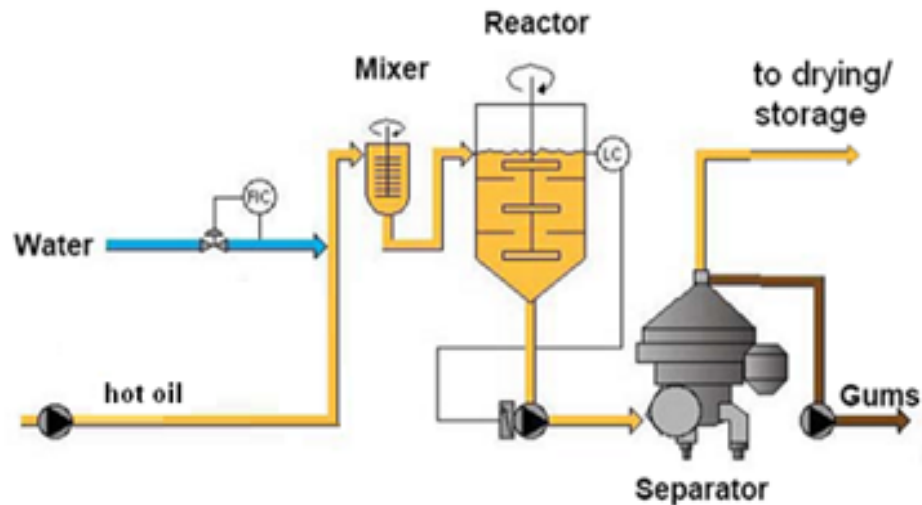
O óleo de soja, após sua extração, contém entre 800 e 1200 ppm de fósforo. Os fosfolipídios (lecitina) são separados do óleo na etapa de degomagem. As etapas de preparação da lecitina (Figura 3) são descritas a seguir. Na etapa de hidratação, água (de 1 a 3%) é misturada ao óleo em uma temperatura que varia entre 50 e 70°C. Os fosfolipídios hidratados formam uma goma após aproximadamente uma hora, com maior densidade específica que o óleo. Fosfolipídios não hidratáveis nessa etapa podem ser removidos em uma segunda etapa com ácido cítrico ou enzimaticamente; esses são em geral misturados aos farelos destinados a alimentação animal (NIEUWENHUYZEN e TOMÁS, 2008).

Além dos processos tradicionais de degomagem de óleo (com ácido e/ou água), outros processos e variações são descritos na literatura, como a super degomagem patenteada em 1977 por Ringers e Seger, a degomagem TOP, patenteada em 1987 por Dijkstra e Van Opstal, a degomagem ultrafina, desenvolvida na Hungria, o processo orgânico de refino desenvolvido pela Ag Processing e a degomagem a seco (FARR e PROCTOR, 2012). O processo desenvolvido na Hungria (Patente US 5.239.096) consiste nas etapas de adição de 0,01 a 0,08% de um ácido ou anidrido ácido ao material, em solução 5 a 15% e temperatura de 20 a 70°C, com agitação, seguida de adição de base para neutralização, aquecimento da mistura, separação do óleo e da goma coagulada e lavagem opcional do óleo com pequena quantidade de água. No processo desenvolvido pela Ag Processing (Patente WO/2000/031219), o óleo vegetal é combinado com uma solução diluída aquosa de ácido orgânico, agitado vigorosamente para dispersão, e em seguida com uma taxa menor para separar a fase hidratada do óleo purificado. A Figura 4 mostra um processo de hidratação e degomagem com água.

Após a etapa de hidratação, as gomas são separadas em processo contínuo com centrífugas, em temperaturas entre 50 e 70°C. As gomas contêm no máximo 50% de umidade e 17% de óleo. Em seguida, a lecitina é seca até em torno de 1% de umidade (NIEUWENHUYZEN e TOMÁS, 2008), preferencialmente abaixo de 0,5%, adquirindo assim longo tempo de prateleira e fluidez. Nessa etapa podem ser usados evaporadores em batelada, semi-batelada ou contínuos. A viscosidade das gomas aumenta rapidamente durante a secagem, pela mudança na estrutura dos agregados de fosfolipídios no processo. A última etapa consiste no resfriamento da lecitina até uma temperatura abaixo de 50°C, sendo necessário para evitar escurecimento do produto. O armazenamento deve ser feito em tanques com

agitação, para homogeneização. Entre 20 e 30°C é possível armazenar a lecitina sem alteração do produto por até um ano. (NIEUWENHUYZEN e TOMÁS, 2008).

Figura 4 - Processo de degomagem com água (Alfa-Laval).



Adaptado de: GALHARDO e DAYTON (2013)

É possível ainda remover os triacilgliceróis com acetona, resultando em uma lecitina com maior teor de fosfolipídios. Essa mistura pode ser separada em uma porção solúvel em álcool (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e uma porção insolúvel em álcool. Esses produtos podem ser fracionados em etapas subsequentes para resultar em fosfolipídios puros e individuais, que podem ainda ser modificados quimicamente (GUNSTONE, 2007). Wu e Wang (2003) estudaram o fracionamento dos fosfolipídios em etanol aquoso, uma vez que fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) apresentam solubilidades diferentes em etanol. Segundo os autores, PC é relativamente mais solúvel em etanol do que o PI, de modo que a extração com etanol produz uma fração enriquecida de PC que é um melhor emulsificador óleo em água do que a lecitina não-fracionada, ao passo que a fração enriquecida de PI pode ser usada como um emulsificador água em óleo (usado frequentemente na indústria de confeitos).

Para a indústria, é desejável a remoção de fosfolipídios (lecitina) do óleo que será comercializado, entre outros motivos porque os fosfolipídios no óleo, acima de determinado nível, podem prejudicar o desempenho do óleo na fritura e a estabilidade do sabor. Na indústria de processamento de óleo os fosfolipídios podem

ser expressos como ppm de fósforo, pela relação entre o nível de fósforo e de fosfolipídios do óleo, de acordo com a equação 1 (GUPTA, 2007):

$$\text{Percentual de fosfolipídios} = \text{fósforo no óleo em ppm} \times 31,7 \times 10^4 \quad \text{Equação 1}$$

### 3.1.4 Composição Da Lecitina De Soja

A composição aproximada da soja é de 24% de lipídios, 40% de proteínas, 13% de carboidratos e 7% de umidade. Os constituintes lipídicos principais da soja são triglicerídeos, aproximadamente 90% do óleo bruto. Nos grãos de soja em desenvolvimento, os níveis de lipídios variam conforme o desenvolvimento do grão, conforme a Tabela 1 (HAWTHORNE e LEKIM, 1983).

**Tabela 1 - Proporção aproximada entre os diferentes lipídios nos grãos de soja durante as diversas fases de crescimento e desenvolvimento do grão.**

Dias após a floração	Fosfolipídios (% em relação aos lipídios totais)	Glicolipídios (% em relação aos lipídios totais)	Lipídios apolares (triacilgliceróis) (% em relação aos lipídios totais)
9	49	29,2	17
18	36,5	14,7	46,4
40	16,5	5,3	78,1
55	8,6	2,1	88,6
67	6,9	0,6	92,2
97	9,8	1,6	88,1

Adaptado de HAWTHORNE e LEKIM, 1983.

A proporção entre os fosfolipídios do grão de soja também varia conforme o seu desenvolvimento, sendo que há aumento nos níveis de fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, e fosfatidilinositol, enquanto que os níveis de fosfatidilgliceróis permanecem aproximadamente constantes e há queda nos níveis de ácidos fosfatídicos (HAWTHORNE e LEKIM, 1983).

Segundo Hawthorne e Lekim, (1983) a composição da lecitina de soja comercial é de aproximadamente 14% de fosfatidiletanolamina, 16% de fosfatidilcolina e 10% de fosfatidilinositol. Os níveis de fosfolipídios podem oscilar entre 37 e 54% do total da lecitina. Aproximadamente 20% correspondem a outros fosfolipídios e esteróis, 5% açúcares, 35% de triacilgliceróis (óleo), 1% de umidade. O usual atualmente é a presença de 47% de fosfolipídios na lecitina de soja comercial.

A lecitina pode ser fracionada nos seus fosfolipídios constituintes, usando solventes como: metanol, etanol e isopropanol, em razões variadas. Ela também pode ser modificada quimicamente, adquirindo altos preços de mercado (PARDUN, 1982).

A composição aproximada da lecitina comercial de soja diverge das lecitinas obtidas de outras fontes, conforme demonstrado na Tabela 2:

**Tabela 2 - Composição das lecitinas comerciais (%).**

	soja	Milho	girassol	colza	ovo	Cérebro de bovino
Fosfatidilcolina	20-22	31	14	37	68-72	18
Fosfatidiletanolamina	21-23	3	24	29	12-24	36
Fosfatidilinositol	18-20	16	13	14	0-2	2
Ácido fosfatídico	4-10	9	7	-	-	2
Fosfatidilserina	1	1	-	-	3	18
Esfingomielina	-	-	-	-	1-4	15
glicolipídios	9-12	30	-	20	-	-

Adaptado de: Szuhaj, 1989

### 3.1.5 Concentrado Proteico De Soja (SPC)

O Concentrado proteico de soja (SPC - *Soy Protein Concentrate*) e o Isolado proteico de soja (SPI - *Soy Protein Isolate*) são produtos proteicos concentrados obtidos a partir do farelo desengordurado depois de submetido a um processo de extração adicional (MIRANDA, 2012). Segundo a definição do Departamento de Agricultura dos EUA, os concentrados proteicos apresentam no mínimo 65% de proteína, em geral, e os isolados, 90%, em base seca (ERICKSON, 1995). O concentrado proteico de soja é produzido sob condições nas quais a maior parte das proteínas é tornada insolúvel. Os açúcares e outros constituintes de baixo peso molecular são dissolvidos, permanecendo a proteína e os polissacarídeos da parede celular (CHAJUSS, 2004).

O SPC encontra aplicação crescente, por diversos motivos. Além de ser um produto de qualidade, com alto teor proteico, apresenta um preço competitivo. Além disso, por ter origem vegetal, os riscos alimentares tornam-se menores no seu uso para ração. Proteínas de origem animal, como subprodutos de aves, farinha de carne e ossos, podem ser usadas para substituir a farinha de peixe na ração para peixes, e apresentam baixo preço. Contudo, a ocorrência de doenças como a da vaca louca gera questionamentos quanto à segurança alimentar, em especial no emprego de proteínas animais como matérias-primas na ração animal. O

SPC apresenta ainda como vantagem adicional uma composição balanceada de aminoácidos (DERSJANT-LI, 2002).

O concentrado proteico de soja tem como importante diferencial o maior valor nutricional quando comparado ao farelo de soja, e o menor teor de fatores antinutricionais, o que permite sua aplicação na ração em casos especiais como na dieta de peixes (DERSJANT-LI, 2002), leitões e bezerros em fase de desmame (PEISKER, 2001).

Os fatores antinutricionais mais importantes encontrados na soja são: antígenos, inibidores de tripsina, oligossacarídeos e ácido fítico (HAMLETPROTEIN, 2014). Além desses fatores antinutricionais associados à soja, também podem ser citados: saponinas, fitoesteróis e inibidores de protease. De forma geral, a presença destes compostos influencia direta ou de maneira indireta na digestibilidade da proteína de soja (MIRANDA, 2012). Os efeitos dos fatores antinutricionais na dieta de animais e peixes são extensos. Antígenos ou fatores antigênicos (glicinina e beta-conglicinina) podem causar reações alérgicas e lesões no intestino, em especial em filhotes. Eles causam a formação de anticorpos que evitam a proliferação de certas bactérias benéficas no trato gastrintestinal. Inibidores de tripsina reduzem a digestibilidade das proteínas e lipídios presentes no alimento, levando à redução do índice de crescimento de peixes como o salmão, a truta e a carpa. Oligossacarídeos causam flatulência e diarreia em animais monogástricos, e prejudicam a absorção de nutrientes por peixes. Isso ocorre pela ausência de enzimas capazes de metabolizar esse tipo de açúcar. O ácido fítico e fitatos prejudicam a absorção de ferro e outros minerais. As lectinas, que são glicoproteínas, causam alterações morfológicas nos intestinos e, portanto, reduzem a absorção de nutrientes. As saponinas de soja podem contribuir com um sabor indesejável além de alterar as funções intestinais. A presença de saponinas em produtos de soja é muito dependente do modo de preparação, sendo ausente no SPC produzido por extração com álcool, uma vez que o álcool rompe ligações e ajuda a remover saponina das proteínas. (HAMLETPROTEIN, 2014; DERSJANT-LI, 2002; PEISKER, 2001).

O SPC apresenta menor teor de oligossacarídeos (<3%) e fatores antigênicos (<100 ppm de glicina), sendo considerado uma alternativa econômica às proteínas de origem animal de alta qualidade, como leite e farinha de peixe, para a nutrição de suínos, bezerros, animais de estimação, e, em especial, peixes (SOJAPROTEIN, 2014).

A produção de um farelo de soja com alto teor de proteína é protegida pela patente PI0507088-0A, da Renessen, Monsanto e Cargill (LIANG *et al.*, 2007). A patente descreve a produção de um farelo de soja com teor mais elevado de proteína, de 58 a 62% em base seca, a partir de variedades específicas de soja. A invenção utiliza variedades comerciais de soja com um teor elevado de proteína (mínimo 45% em peso seco) para conseguir alcançar um teor mais elevado de proteína no farelo. O produto, no entanto, apesar de conter um valor mais elevado de proteína do que o farelo de soja comum, não é ainda considerado um concentrado proteico de soja, já que não atinge 65% de proteína em sua composição.

A patente PI0704760-6A2, da Imcopa Importação e Exportação de óleos (BUSATO JÚNIOR, 2009), por outro lado, já descreve um processo de produção de concentrado proteico, utilizando etanol. Nesse processo, o farelo de soja é submetido à extração dos açúcares a fim de concentrar a proteína até 75% do material. De acordo com os inventores, esse material rico em proteína pode ser utilizado na aquicultura e na alimentação de suínos em fase de amamentação. O farelo de soja tem um percentual de proteína em torno de 45%, além da presença de fatores antinutricionais, o que não permite sua aplicação como única fonte de proteína na alimentação animal nesses casos (MIRANDA, 2012).

Em relação aos processos de obtenção do SPC, a produção do concentrado se dá pela imobilização da proteína enquanto os compostos solúveis são lixiviados, por um dentre os três processos básicos disponíveis e relacionados abaixo (MIRANDA, 2012; LIU, 2004; ERICKSON, 1995; CHAJUSS, 2004):

- a) extração do farelo comum com solução alcoólica 20 a 80% (m/m)
- b) lixiviação ácida do farelo comum com água e pH 4,5
- c) desnaturação da proteína por calor úmido e extração com água

A Figura 5 mostra a composição aproximada dos concentrados proteicos obtidos pelos três métodos. Peisker (2001) acrescenta ainda a produção de SPC por ação enzimática, na qual enzimas são responsáveis por degradar os carboidratos presentes no farelo.

O processo que utiliza ácido para a produção de concentrado proteico de soja leva em conta que a maior parte das proteínas da soja tem ponto isoelétrico próximo ao pH 4,5, sendo insolúveis nesse pH, tornando possível a remoção dos açúcares solúveis em água sem remoção das proteínas (ERICKSON, 1995). A

produção de concentrado proteico de soja com ácido ficou disponível comercialmente na década de 50. As vantagens desse método são: não há uso de solventes inflamáveis, o produto obtido fica somente ligeiramente desnaturado, e relativamente solúvel. As desvantagens são: o material obtido não pode ser convertido em produtos texturizados, tem menor qualidade nutricional e sabor de sabão, o processo gera uma grande quantidade de efluentes líquidos, são obtidos menores rendimentos, uma grande quantidade de água é necessária para o sistema de *spray drying*.

**Figura 5 - Composição aproximada dos concentrados proteicos obtidos por diferentes metodologias.**

<i>Componente</i>	<i>Processo Alcoólico</i>	<i>Processo Ácido</i>	<i>Processo Calor-água</i>
Proteína	67%	66%	68%
Umidade	6,0%	6,0%	5,0%
Óleo	0,3%	0,3%	0,1%
Fibra Bruta	3,5%	3,4%	3,8%
Cinzas	5,6%	4,8%	3,0%
Carboidratos*	17,6%	19,5%	20,1%

\*Calculado por diferença

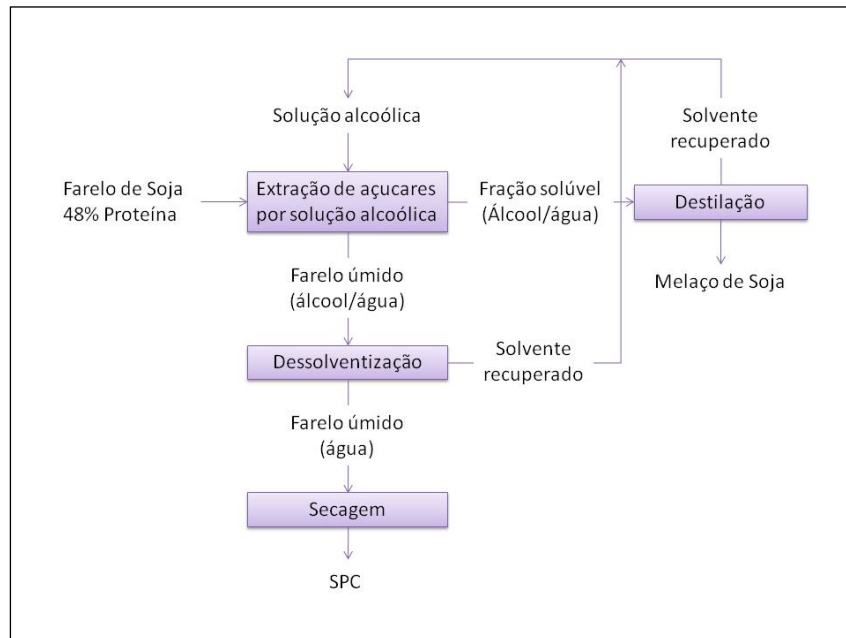
Fonte: Miranda, 2012; Erickson, 1995.

Algumas desvantagens dos processos com água e ácido levaram a uma transição para o uso predominante de álcool diluído, sendo que o produto deste processo é denominado concentrado proteico tradicional (CHAJUSS, 2004).

A produção de concentrado proteico de soja (SPC) por extração com etanol foi introduzida comercialmente na década de 60, simultaneamente nos EUA e em Israel, e é o mais aplicado hoje. O processo de extração alcoólica é baseado na habilidade de álcoois alifáticos como metanol, etanol e isopropanol de extraírem a fração solúvel dos farelos sem solubilizar a proteína. As vantagens desse processo são: simplicidade, eficiência, baixo custo, altos rendimentos obtidos, não há geração significativa de resíduos, o material obtido pode ser texturizado, é livre de isoflavonas, podendo ser utilizado na alimentação infantil, além de ser livre de sabores e odores desagradáveis. A desvantagem principal é o uso de um solvente inflamável e altamente explosivo, o que exige medidas e equipamentos de segurança (LIU, 2004; CHAJUSS, 2004). A concentração alcoólica utilizada industrialmente apresenta um grau GL (Gay Lussac, ou %v/v etanol em água) entre 60 e 70. O material solúvel em álcool diluído desalcoholizado é denominado “melaço de soja” (CHAJUSS, 2004).

Em um dos processos para a produção de concentrado proteico de soja com etanol descritos na literatura, o farelo desengordurado, proveniente da extração do óleo da soja com hexano, sofre uma segunda extração com a mistura etanol: água em contracorrente. A temperatura da solução alcoólica pode variar de ambiente até a temperatura de ebulição, sendo que quanto mais alta, melhor a extração. A quantidade de solução alcoólica adicionada no extrator também é variável, de acordo com a quantidade de farelo que entra no processo. Em geral se utiliza de 3 a 6L de solução por kg de farelo. Após o extrator, o processo é dividido em duas correntes: líquida e sólida. (BUSATO JÚNIOR, 2009; MIRANDA, 2012). A Figura 6 traz um fluxograma que exemplifica as etapas da produção de SPC por esse processo. A corrente líquida que sai do extrator é denominada micela e contém álcool, água e açúcares, e a corrente sólida contém o farelo umedecido com álcool e água. (BUSATO JÚNIOR, 2009; MIRANDA, 2012).

**Figura 6 - Diagrama de fluxo do processo de produção de SPC por extração alcoólica.**



Fonte: Miranda, 2012

A fração sólida é, em seguida, prensada, dessolventizada, seca e resfriada (Figura 6). A prensagem é responsável por diminuir a umidade até valores na faixa de 25 a 55% (a umidade inicial pode estar na faixa de 45 a 75%) e o líquido retirado é realimentado no extrator. No dessolventizador, o farelo é alimentado na parte superior, e vai descendo em contato com os pratos, que contam com



aquecimento por vapor. O calor dos pratos passa para o farelo e o álcool (e a água, posteriormente), vai sendo forçado para fora do farelo, por evaporação. Na saída do dessolventizador, o farelo está a uma temperatura de 90 a 107°C e umidade 25%. O secador abaixa o teor de umidade até 8 – 15%, por contato indireto do farelo com vapor, o que eleva sua temperatura e retira a umidade residual. No resfriador, ar é utilizado para levar a temperatura de aproximadamente 85°C até próxima da ambiente. No resfriador ocorre também a secagem do material, uma vez que é feita injeção direta de ar. Como alternativa, pode-se utilizar um equipamento do tipo DTSR, que une as funções de dessolventizador, secador e resfriador em um único equipamento (BUSATO JÚNIOR, 2009; MIRANDA, 2012). Parte do concentrado proteico obtido é em seguida processado para concentrados mais funcionais e solúveis (LIU, 2004). A corrente líquida segue para a desalcoholização (recuperação do etanol) e para concentração de açúcares, gerando o melaço de soja (BUSATO JÚNIOR, 2009; MIRANDA, 2012).

Segundo Liu (2004) há uma década atrás, de 60 a 70% do concentrado proteico produzido era utilizado para alimentação humana, sendo que o restante era utilizado em rações nobres, para bezerros, leitões, peixes e animais de estimação. Uma pequena quantidade seria destinada para aplicações não alimentares, como em revestimento de papéis. Esse material também é adicionado em produtos como hambúrgueres, alimentos de peixe (como bolinhos), para assegurar a textura e volume adequados, em panificação (pães, biscoitos, pastéis), em queijos, sorvetes, sobremesas congeladas, e em alimentos com alto teor de proteína para esportistas e bebês (LIU, 2004). Atualmente sabe-se que a maior parte do SPC produzido é destinada para a aquicultura.

No Brasil, em 2004 foi implantada a primeira fábrica de SPC na Imcopa, processadora de soja com sede em Araucária, PR. A produção anual girava em torno de 90.000 toneladas/ano e passou a 250.000 toneladas/ano após a instalação da segunda fábrica, em 2007 (IMCOPA, 2014). Em 2009, a Selecta, localizada em Araguari, MG, também iniciou a produção de SPC, com uma planta de capacidade instalada de produção equivalente a 300 mil toneladas/ano (SELECTA, 2014). Em 2012, a Caramuru investiu mais de 100 milhões de reais para a instalação de uma unidade de produção de SPC (POLO, 2012) com produção em torno de 180.000 toneladas/ano. De forma geral, a maior parte da produção brasileira de SPC hoje é destinada à aquicultura, para a alimentação de peixes de

água fria como o salmão, truta e bacalhau, e uma menor porção, para substituintes lácteos na alimentação de bezerros e leitões em fase de desmame. A ADM iniciou um projeto para três unidades de produção de proteína de soja, com previsão de entrega em 2016. A primeira unidade de produção em Campo Grande deverá iniciar a operação já em 2015. O foco da indústria, no entanto, será a alimentação humana: proteínas para serem utilizadas em produtos de panificadoras, hambúrgueres, biscoitos, barras nutricionais, pratos prontos, antibióticos fermentados, salsichas, embutidos e nuggets, alimentos vegetarianos, cereais, salgadinhos, bebidas nutricionais, molhos e sopas. (A CRITICA, 2014).

A Europa também conta hoje com unidades de produção de SPC, sendo as principais unidades localizadas na Finlândia e na Sérvia. Na Finlândia, a Finnprotein produz SPC para a aquicultura, e, em menor proporção, para a alimentação animal (FINNPROTEIN, 2014). Na Sérvia, a maior processadora de soja é a SojaProtein com uma planta de capacidade instalada anual equivalente a 70.000 toneladas. De 60 a 70% da produção da empresa é destinada à alimentação humana, enquanto que o restante é comercializado para a alimentação animal e aquicultura (SOJAPROTEIN, 2014). A empresa HamletProtein, com sede na Dinamarca, também produz e comercializa SPC (HAMLETPROTEIN, 2014).

### **3.1.6 O Melaço De Soja**

O melaço de soja (Figura 7) é um subproduto da indústria processadora de soja. Trata-se de um xarope viscoso de coloração marrom, resultado do processo de extração alcoólica do farelo de soja, dessolventização e concentração (CHAJUSS, 2004).

O melaço de soja pode ter uma composição variável (Tabela 3). Seus principais constituintes são açúcares (oligo, di e monossacarídeos). A composição do melaço irá variar dependendo da variedade da soja, condições de crescimento, localidade e ano da safra. Em menores quantidades podem estar presentes saponinas, proteínas, lipídios, cinzas, isoflavonas e outros materiais orgânicos (CHAJUSS, 2004).

Figura 7 - Amostra de melaço de soja



Fonte: Acervo Autor

Tabela 3 - Composição do melaço de soja.

Parâmetros	Chajuss, 2004	Busato Júnior, 2009	Análise Imcopa
Umidade (%)	Nm	20-30	29,96
Sólidos totais (%)	Nm	70-80	70,04
Cinzas (%)	3-7	16-20	34,78
Glicose (%)	0,9-1,3	0,2-0,5	0,35
Frutose (%)	1,2-1,6	1,0-1,5	0,85
Galactose (%)	Nm	2,6-3,0	1,54
Sacarose (%)	26 – 32	17-26	24,56
Rafinose (%)	4-5	9-10	6,58
Estaquiose (%)	23-26	17-19	13,07
Carboidratos totais (%)	58 – 65	54-60	46,97
Proteína (%)	5-7	Nm	6,97
Lipídios (%)	4-7	Nm	9,72

Fonte: Acervo Autor

Pelo alto teor de carboidratos, o melaço pode ser aproveitado como matéria-prima em processos fermentativos. Siqueira (2007) desenvolveu um processo de produção de etanol a partir do melaço de soja produzido no processo de obtenção de Concentrado Proteico de Soja (SPC). O processo foi pioneiro na aplicação do melaço de soja como matéria-prima para a produção de etanol, iniciando suas pesquisas em 2006 com o apoio da FINEP. Além disso, a pesquisadora desenvolveu um processo especial para a queima do melaço, gerando grande economia no processamento de Concentrado Proteico, tecnologia protegida pela patente PI0900363-0 A2 (SIQUEIRA, 2010; BUSATO JUNIOR, 2009).

O melaço de soja também pode ser purificado, como descrito na patente US6913771 B2 (SEGLA e SHUSTER, 2002), para que o seu conteúdo em

oligossacarídeos seja posteriormente aproveitado. O método descrito inclui a remoção de fosfolipídios, substâncias causadoras de cor e odor, proteínas e minerais do melaço. A remoção de fosfolipídios é realizada com uma mistura de hexano e etanol 1:3 a 40- 50°C. Após agitação, a mistura separa em duas fases, sendo que os fosfolipídios são recuperados na fase do hidrocarboneto. Para a remoção dos demais constituintes, se utilizam resinas de troca iônica (CEGLA *et al.*, 2005).

De acordo com Chajuss (2004), o melaço de soja encontra ainda aplicações como ingrediente na alimentação animal, para ruminantes ou suínos. Além disso, o melaço pode ser usado na fabricação de determinados tipos de pães, como substrato para produção de ácido láctico, ou adesivo em madeira compensada. Alguns elementos nutracêuticos presentes na soja podem ser encontrados no melaço, como isoflavonas, que podem ser isoladas e/ou concentradas a partir dessa matéria-prima.

### 3.2 LECITINA

Lecitina é o nome popular e comercial da mistura de ocorrência natural de fosfatídeos, também denominados fosfolipídios ou fosfoglicerídeos. A maior fonte de lecitina é a soja, sendo esse um dos derivados de maior importância na indústria de processamento do grão (SOYINFO CENTER, 2007).

A palavra “lecitina” é derivada do termo grego *lekithos*, que significa gema de ovo. Em 1846, a lecitina foi isolada da gema de ovo, adquirindo o nome em 1850. O termo pode ser usado tanto para a mistura de fosfatídeos como ocasionalmente para o fosfatídeo puro fosfatidilcolina (SOYINFO CENTER, 2007).

A Codex Alimentarius Commission da FAO/WHO classifica as lecitinas (fosfatídeos ou fosfolipídios) como aditivos alimentares, com aplicação como antioxidantes e/ou emulsificantes, sob o número INS 322(i). Segundo a ficha disponibilizada pelo Codex, a lecitina é usualmente obtida a partir de sementes oleaginosas como a soja, podendo ser também extraída de fontes animais.

A lecitina é uma mistura complexa de fosfatídeos, entre os quais fosfatidilcolina (denominada também lecitina pura), fosfatidilinositol (ou inositol fosfatídeo) e fosfatidiletanolamina (ou *cephalin*), combinados com outras substâncias como triglicerídeos, ácidos graxos e carboidratos. (CODEX, 1993; SOYINFO

CENTER, 2007). A consistência da lecitina varia de plástica à fluída, e a cor de amarelo claro à marrom. (CODEX, 1993). A lecitina natural tem cor marrom. A cor pode ser atribuída à presença de componentes coloridos como carotenóides, melanóides e porfirinas, além de produtos resultantes de produtos das reações de Maillard e Amadori que podem ocorrer no processamento. (NIEUWENHUYZEN E TOMÁS, 2008).

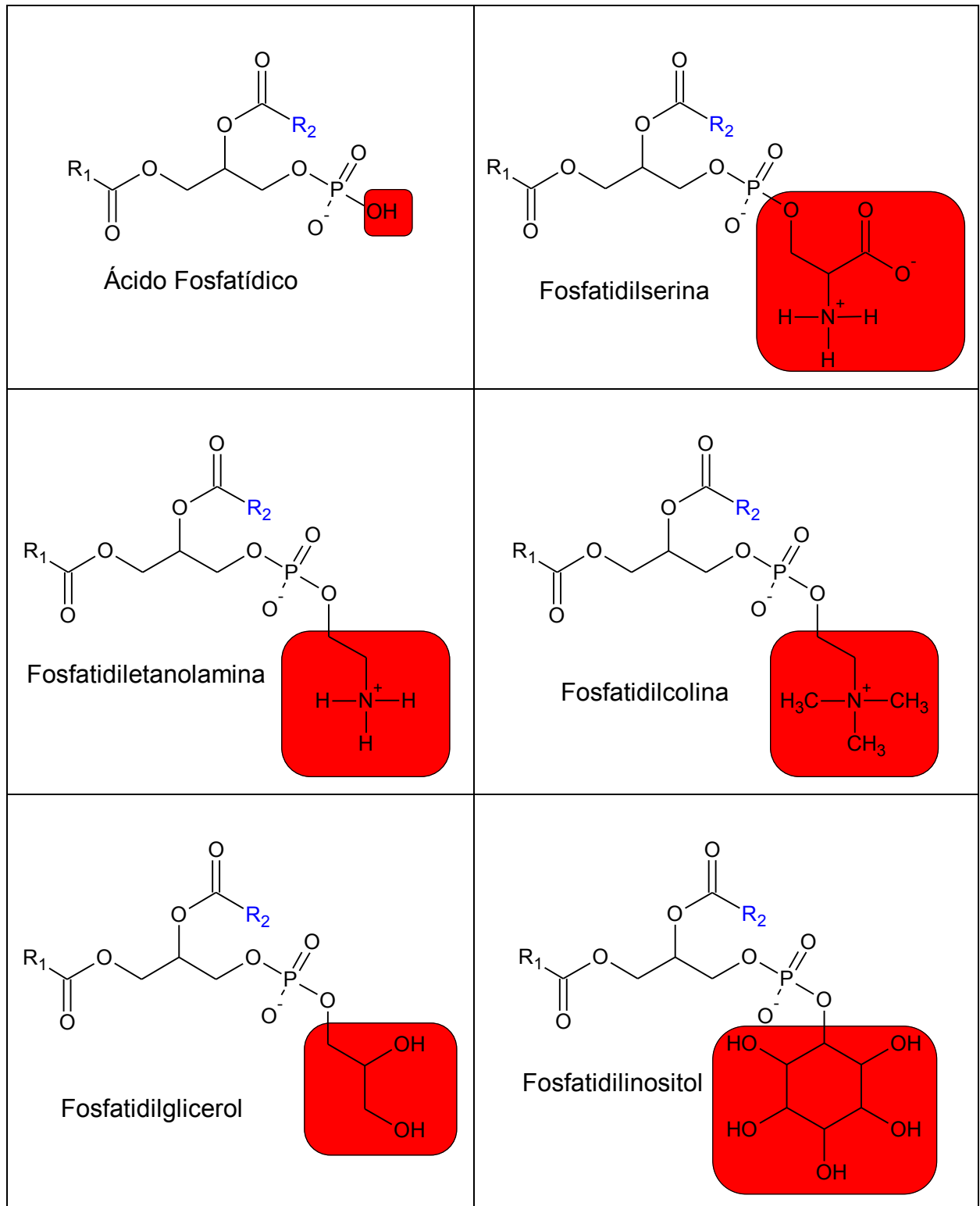
Nieuwenhuyzen e Tomás (2008) apresentam uma revisão sobre lecitinas de origem vegetal e fosfolipídios. Segundo os autores, as lecitinas vegetais contêm principalmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, e são obtidas comercialmente de sementes que contêm óleo, tais como grãos de soja, sementes de girassol e sementes de colza. (NIEUWENHUYZEN E TOMÁS, 2008). As fontes mais concentradas de lecitina são a soja (1,48-3,08% de lecitina), amendoim (1,11%), fígado de vitela (0,85%), trigo (0,61%), aveia (0,65%), e ovos (0,39%). A medula espinhal humana contém 6-10% de lecitina e o cérebro humano 4-6% de lecitina. Entre as substâncias refinadas, as fontes de lecitina incluem desidratado de gema de ovo, a gema de ovo natural, o germe de trigo, o óleo de soja e a gordura de manteiga. O óleo de soja tem o maior teor de lecitina e fosfatídeo em comparação a outros óleos conhecidos. Fosfatídeos de origem vegetal não contêm colesterol. (SOYINFO CENTER, 2007). As estruturas moleculares dos principais fosfolipídios presentes na lecitina são dadas na Figura 8.

O grupo de Beare-Rogers (1992) em trabalho colaborativo interlaboratorial publicado junto à IUPAC determinou a composição de concentrados de lecitina de soja comercialmente disponíveis, em relação aos níveis de fosfatidiletanolamina (9,45 – 15,80%), ácido fosfatídico (4,68 – 12,58%), fosfatidilinositol (7,67 – 12,43%) e fosfatidilcolina (9,33 – 19,01%), por cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com szuhaj e Nieuwenhuyzen, (2003) as lecitinas (comerciais) contêm aproximadamente 20% de fosfatidilcolina, 12% de fosfatidiletanolamina, 1,5% de fosfatidilserina, e fosfatidilinositol.

Os grãos de soja são a fonte principal de lecitina vegetal (NIEUWENHUYZEN E TOMÁS, 2008; GUNSTONE, 2007). O mercado mundial para lecitina comercial gira em torno de 150 a 170 mil toneladas, sendo um dos principais emulsificantes alimentícios. A lecitina também pode ser obtida de girassol e colza. Alguns países europeus, tais como Hungria, Ucrânia, França, e Argentina cultivam e processam sementes de girassol para a produção de óleo, e conseqüentemente,

lecitina de girassol. A lecitina de colza é produzida em algumas plantas de esmagamento canadenses e europeias. (NIEUWENHUYZEN E TOMÁS, 2008)

Figura 8 - Estruturas dos principais fosfolípidios.



Fonte : Acervo Próprio

As lecitinas são usadas como emulsificantes numa vasta gama de alimentos, ração, além de aplicações farmacêuticas e técnicas. (NIEUWENHUYZEN E TOMÁS, 2008). A lecitina é usada em produtos alimentícios tais como margarinas, chocolate e panificação, como suplemento alimentar no ramo de saúde e também no ramo industrial (CROWN, 2013). Na indústria, a lecitina encontra aplicações em artigos têxteis e couros, cosméticos, tintas ceras, vernizes, revestimentos de madeira e inseticidas, indústria de plásticos e borracha, vidro e processamento, papel e gráfica, de alvenaria e asfalto, produtos de cerâmica, indústria de petróleo, processamento de metais, pesticidas, adesivos, têxteis e couros. (SOYINFO CENTER, 2007). As lecitinas têm uma natureza anfipática, com isso, apresentam tendência a se posicionar no limite entre materiais imiscíveis tais como óleo e água. Dessa forma, elas servem a diversas funções que envolvem a modificação de superfícies:

- Emulsificantes: permite a mistura de substâncias naturalmente imiscíveis
- Solubilização: torna possível dissolver óleos em água
- Suspensão: permite, por exemplo, manter pigmentos dispersos em tintas
- *Wetting/instantizing*: permite que pós sejam dissolvidos em água
- Lubrificação e *release*..
- Controle de cristalização: controla a cristalização de açúcares em sistemas com gorduras, como o chocolate.
- Complexante: tende a retardar a cristalização do amido associada com o endurecimento de produtos de panificação
- Modificador de viscosidade
- Terapêutico e Antioxidante (SOYINFO CENTER, 2007).

Leonel (2008) estudou a lecitina de soja como tensoativo para a formação de micropartículas lipídicas. As micropartículas são formadas pela técnica de microencapsulação, e tem a finalidade de proteger o conteúdo das condições adversas do meio, como luz e umidade, além de mascarar propriedades indesejáveis e promover uma liberação controlada do recheio. As partículas lipídicas possuem várias vantagens quando utilizadas para esse fim: não são tóxicas, não utilizam solventes orgânicos, podem ser produzidas em larga escala, têm possibilidade de aplicação farmacológica por várias vias, entre outras. A adição de lecitina comercial, um tensoativo bastante usado em micropartículas lipídicas,

permite a incorporação do conteúdo à micropartícula, que aumenta linearmente com o aumento da concentração de lecitina até um determinado ponto. Esse efeito é atribuído à formação de micelas no meio da matriz lipídica. A tecnologia de microencapsulação encontra aplicações nas áreas: farmacêutica (produção de pílulas e comprimidos), de alimentos e nutrição (microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e a perda de substâncias voláteis, em aditivos naturais e ingredientes como corantes, temperos, acidulantes, vitaminas e minerais) e industrial (LEONEL, 2008). Os autores verificaram um efeito superior da lecitina de soja em relação ao triestearato de sorbitana na microencapsulação.

A lecitina comercial pode ser caracterizada quanto às propriedades físico-químicas de acordo com os seguintes métodos:

**a ) Insolúveis em Acetona (A.I.):**

Fosfolipídios são insolúveis em acetona, enquanto que triacilglicerídeos e ácidos graxos livres não. Esse percentual é usado industrialmente para representar a quantidade de fosfolipídios da lecitina comercial, muito embora o teor real de fosfolipídios seja inferior ao obtido por essa metodologia. A determinação é quantitativa pela precipitação do material em acetona e determinação do resíduo. Materiais livres de areia, farelo e outros resíduos insolúveis devem ser utilizados.

**b ) Índice de Acidez:**

Corresponde ao número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos de um grama de material. Valores elevados desse índice podem indicar degradação devida ao processamento impróprio ou sementes de má qualidade.

**c ) Material Insolúvel em Hexano:**

Indica o nível de resíduos e impurezas do material, como farelo da extração. Esse valor não deve exceder 0,3%.

**d ) Valor de Peróxido:**

Pela dissolução de uma porção de amostra conhecida em uma solução de ácido acético e clorofórmio contendo iodeto de potássio e titulação com tiosulfato de sódio e indicador de amido é possível determinar esse valor, que representa a oxidação dos lipídios no material.

**e ) Umidade:**

A umidade pode ser determinada pelo método de Karl-Fischer (ou estufa). Usualmente o conteúdo de água não ultrapassa 1%.



**f) Cor:**

A cor do produto pode ser medida pela escala de Gardner, ou pelo método de medição de cor com iodo.

**g) Viscosidade:**

A viscosidade pode ser determinada utilizando-se um viscosímetro Brookfield Synchro-lectric a temperatura ambiente (25°C).

**h) Ácidos Graxos Livres:**

Os ácidos graxos livres são determinados pela dissolução da porção solúvel em acetona em éter de petróleo e álcool etílico e titulação com fenolftaleína.

**i) Metais Divalentes:**

Determinados pelo método de Martell e Calvin, por dissolução em etanol aquoso e EDTA. Após adição de solução tampão pH 10, há titulação com sulfato de magnésio até coloração rosa.

**j) Índice de Iodo:**

Esse valor exprime o grau de insaturação de gorduras e óleos. O teste identifica a presença de ácido graxo insaturado. O iodo reage com as duplas ligações do ácido graxo insaturado (reação de halogenação). Se houver dupla ligação, o iodo será consumido e a coloração característica da solução de iodo diminuirá de intensidade.

**k) Fósforo:**

A determinação do total de fósforo é uma medida indireta do conteúdo de fosfolipídios. Diversos métodos são empregados: gravimétricos, colorimétricos, titulométricos, por absorção/emissão atômica, fluorescência, e espectrometria nuclear magnética.

**l) Métodos Cromatográficos:**

A cromatografia pode proporcionar informações sobre a composição do material em termos dos ácidos graxos, fosfolipídios, níveis de tocoferol, pesticidas e outros resíduos (SZUHAJ, 1989)

**3.2.1 Fosfolipídios**

Os lipídios compõem um grupo amplo de compostos solúveis em solventes orgânicos e pouco solúveis ou insolúveis em água. Ésteres de glicerol com ácidos graxos, que constituem 99% dos lipídios de plantas e animais, são tradicionalmente denominados óleos e gorduras, distinção baseada apenas no fato

do material ser líquido ou sólido a temperatura ambiente (LEONEL, 2008). A Figura 9 mostra a classificação dos lipídios

**Figura 9 - Classificação dos Lipídios**

Classe	Subclasse	Descrição
Lipídios simples	Acilgliceróis	Glicerol + ácidos graxos
	Ceras	Cadeia longa de álcool + cadeia longa de ácido graxo
Lipídios compostos	Glicerofosfolipídios	Glicerol + ácido graxo + fosfato + outro grupo geralmente contendo nitrogênio
	Esfingomielinas	Esfingosina + ácido graxo + fosfato + colina
	Cerebrosídeos	Esfingosina + ácido graxo + açúcar simples
	Gangliosídeos	Esfingosina + ácido graxo + carboidrato complexo
Lipídios derivados	Compostos que não se enquadram nas classificações de simples nem compostos	Carotenóides, esteróides, vitaminas lipossolúveis

Fonte: Leonel, 2008

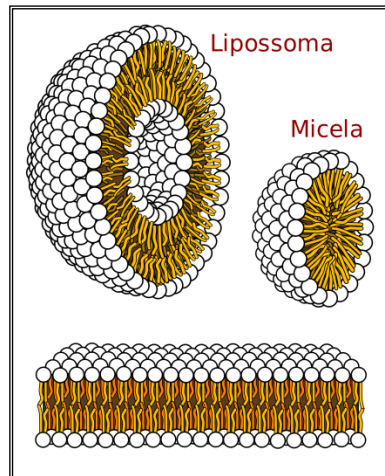
Sackeheim e Lehman (2001) dividem os fosfolipídios em duas categorias: fosfoglicerídeos (ou glicerofosfolipídios, segundo Leonel, 2008) e fosfoesfingosídeos (ou esfingomielinas, segundo Leonel, 2008), dependendo do álcool ser glicerol ou esfingosina.

Os ésteres são os derivados de ácidos carboxílicos mais importantes, amplamente distribuídos na natureza e com diversas aplicações. Os ésteres são formados pela reação entre um ácido carboxílico e um álcool, com a formação de um éster e água, denominada reação de esterificação. Os ésteres são componentes essenciais das células dos organismos vivos. Os fosfolipídios são substâncias de baixa polaridade que apresentam a função éster; são derivados de ácidos carboxílicos e do ácido fosfórico. Nos fosfoglicerídeos, o glicerol forma um éster com dois ácidos graxos adjacentes e uma unidade fosfato ligada a um substituinte derivado de um álcool de baixo peso molecular. O palmitol-oleil-fosfatidil-colina é um exemplo de um lipídeo (lecitina) desse tipo (VOLLHARDT e SCHORE, 2004).

Como os fosfoglicerídeos apresentam duas cadeias hidrofóbicas longas e um grupo polar (hidrofílico), ou seja, são moléculas anfipáticas, eles são

capazes de formar micelas em água (VOLLHARDT e SCHORE, 2004; SACKHEIM e LEHMAN, 2001), como pode ser observado na Figura 10.

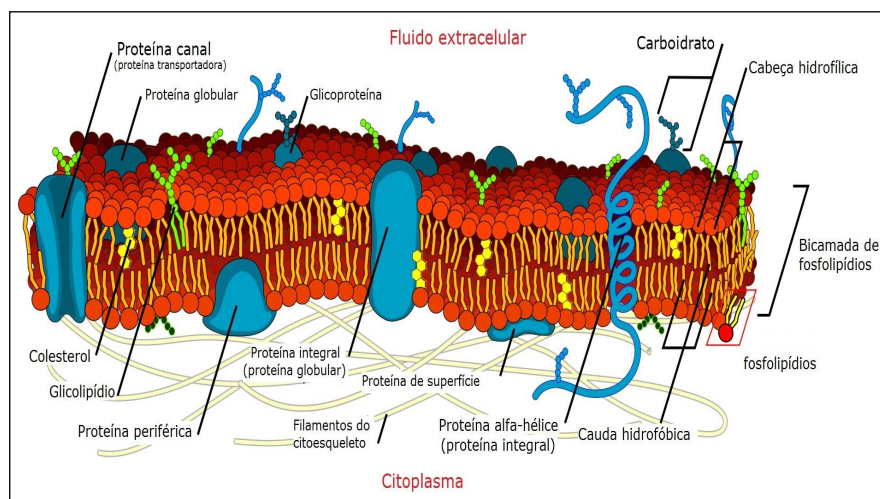
**Figura 10 - Organização dos fosfolipídios: lipossoma, micela e membrana celular das células.**



Fonte: Miyazawa (2013)

Nas micelas, as cadeias de ésteres se agrupam no interior da molécula (parte hidrofóbica) enquanto as unidades fosfatos são solvatadas pela água (porção hidrofílica). De forma alternativa, os fosfolipídios podem se agrupar formando camadas, que tem importância fundamental na formação das membranas celulares. As bicamadas lipídicas são relativamente estáveis (VOLLHARDT e SCHORE, 2004). A Figura 11 mostra uma representação da membrana celular.

**Figura 11 - Representação da membrana celular.**



Fonte: Miyazawa (2013)

Os fosfolipídios são importantes componentes da membrana celular das células (Figura 11) (VOLLHARDT e SCHORE, 2004). As membranas celulares são fundamentais para garantir a separação do conteúdo do interior das células do meio externo, além de garantir o suporte estrutural para proteínas que transportam íons e moléculas polares através da membrana. As membranas celulares compõem-se de aproximadamente 45% de lipídios, sendo que os fosfolipídios encontram-se ordenados em uma dupla camada segundo a teoria do mosaico fluido (SACKHEIM e LEHMAN, 2001)

Os fosfolipídios podem ser administrados terapeuticamente na forma de lecitinas. A administração de lecitinas por via oral ou injeção com fins terapêuticos é descrita há algum tempo, seus efeitos benéficos para inúmeras patologias, incluindo tuberculose, diabetes e depressão foram sugeridos em dicionários de Medicina datados de 1933. A lecitina se encontra largamente disponível como substância nutracêutica para alimentação ou suplemento farmacêutico. Os benefícios da suplementação nutricional com lecitina ainda são questionados, e os resultados dos estudos ocasionalmente são contraditórios. Seus prováveis benefícios para a saúde são relacionados à presença de fosfatidilcolina, a principal fonte exógena de colina, importante na formação do neurotransmissor acetilcolina e componente das membranas celulares (SZUHAJ e NIEUWENHUYZEN, 2003). Estudos também apontam para os benefícios cardiovasculares e no controle do colesterol pela administração de lecitina (SZUHAJ e NIEUWENHUYZEN, 2003; HAWTHORNE e LEKIM, 1982)

### 3.2.1.1 Fosfatidilcolina (PC)

A fosfatidilcolina é o fosfolipídio de maior ocorrência em plantas. Esse fosfolipídio tem funções essenciais que variam desde a manutenção da estrutura da célula, metabolismo de gorduras, memória, sinalização dos nervos, precursor de neurotransmissores e saúde do fígado (FARR e PROCTOR, 2012).

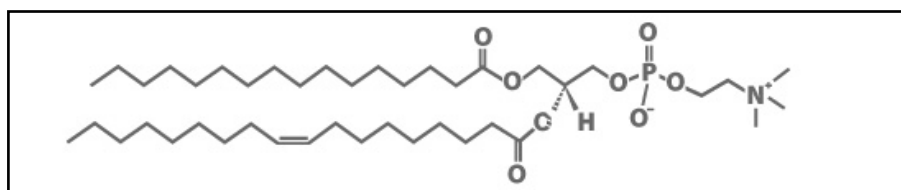
Diversos estudos apontam a colina como essencial na alimentação humana. A colina é necessária para o crescimento de células em cultura, além de desempenhar importantes papéis biológicos, no metabolismo de grupos metil e sinalização celular, e para o desenvolvimento fetal e de crianças. A colina é o precursor da síntese do neurotransmissor acetilcolina. A deficiência desse composto mesmo por poucas semanas, resulta em funcionamento anormal do fígado. Os níveis indicados de colina segundo o Conselho de alimentação e nutrição (*Food and*

*Nutrition Board*) são 125mg/d para bebês até seis meses, até 550 mg/d para mulheres em lactação e homens. Os fosfolipídios de colina, além de contribuírem como fonte dessa molécula, também atuam diretamente, por exemplo, na sinalização celular e na proteção do fígado contra danos causados pelo álcool ou outras substâncias. (SZUHAJ e NIEUWENHUYZEN, 2003).

A fosfatidilcolina proveniente de ovo ou soja é usada tanto em formulações de drogas como em excipientes inertes, atóxicos e estáveis. A demanda anual para a fosfatidilcolina girava em torno de 300 toneladas para cada aplicação em 2003. A fosfatidilcolina também é consumida como suplemento nutricional, em especial para atletas, apesar do seu modo de ação biológico não ser completamente entendido. (SZUHAJ e NIEUWENHUYZEN, 2003).

A estrutura da L-alfa-fosfatidilcolina é apresentada na Figura 12. Sua fórmula molecular é  $C_{42}H_{82}NO_8P$  quando extraída de ovo e  $C_{42}H_{80}NO_8P$  quando extraída de soja. Seu número CAS é 97281-44-2 (ovo) e 97281-47-5 (soja) (GOSHENBIOTECH, 2013).

**Figura 12 - Exemplo de estrutura para a fosfatidilcolina.**



Fonte: GoshenBiotech, 2013

### 3.2.1.2 Fosfatidilserina (PS)

A fosfatidilserina foi nomeada pelo Dr. Folch (Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research), ao isolar e caracterizar esse fosfolipídio do cérebro (FARR E PROCTOR, 2012). Tem sido bastante estudada quanto aos seus efeitos terapêuticos, sendo encontrada na camada interna da membrana plasmática de praticamente todas as células do corpo. Sua externalização é um importante mecanismo de sinalização celular para patologias, e esse fosfolipídio também atua na ativação de enzimas celulares. Estudos em animais indicam uma ação benéfica da administração desse fosfolipídio para a memória e outras funções cerebrais ocasionalmente associadas ao envelhecimento. Alguns produtos comercialmente disponíveis afirmam haver benefícios como o decrescimento do

nível de hormônios do estresse, sugerindo melhores performances para atletas, no entanto, maiores estudos são requeridos para comprovar tais afirmações (SZUHAJ e NIEUWENHUYZEN, 2003).

#### 3.2.1.3 Fosfatidilinositol (PI)

O fosfatidilinositol apresenta uma estrutura diferente em relação aos demais fosfolipídios, devido à presença de um anel. Esse fosfolipídio tem grande importância na sinalização celular (FARR E PROCTOR, 2012). Além da sua importância na transmissão de mensagens, o fosfatidilinositol, bem como seus metabólitos, tem importância em alguns hormônios, neurotransmissores, e fatores de crescimento, desde a superfície celular até o interior da célula. Os mecanismos de interação envolvem recepção de sinais, fosforilações e alterações na estrutura do fosfolipídio e transmissão de sinais para o interior da célula (SZUHAJ, 1989).

Frações enriquecidas de PI, obtidas após sua separação com etanol aquoso, são frequentemente usadas como emulsificador de água em óleo (w/o) na indústria de confeitos (WU e WANG, 2003).

#### 3.2.1.4 Fosfatidiletalamida (PE)

A fosfatidiletanolamina é também denominada cefalina. Sua estrutura é bastante similar à estrutura da fosfatidilcolina, com exceção dos grupos metil. A cefalina pode ser encontrada em todas as células vivas, sendo que nos seres humanos está mais presente no tecido nervoso. Em bactérias, esse é o principal fosfolipídio encontrado (FARR E PROCTOR, 2012).

#### 3.2.1.5 Ácido Fosfatídico (PA)

O ácido fosfatídico é um intermediário na síntese de glicerolipídios. (Weselake, 2008). Dentre os fosfolipídios, o ácido fosfatídico é o menos compreendido no processamento de óleos. Não se sabe se esse fosfolipídio apresenta alguma função industrialmente aproveitável. Ao contrário da fosfatidilcolina, o ácido fosfatídico não apresenta propriedades emulsificantes ou benefícios significativos para a saúde. Por outro lado, esse fosfolipídio é essencial

como substrato na síntese enzimática de outros fosfolipídios na célula, bem como de triacilgliceróis (FARR E PROCTOR, 2012).

#### 3.2.1.6 Fosfatidilglicerol (PG)

O fosfatidilglicerol é o principal componente das membranas bacterianas. Esse fosfolipídio foi isolado em algas pela primeira vez por Benson e Maruo. Esse fosfolipídio pode ser observado nas mais diversas fontes (membranas de animais, plantas, ou bactérias), mas com concentrações variadas. Uma das importantes funções desse fosfolipídio é a distribuição de surfactantes nos pulmões (FARR E PROCTOR, 2012).

### 3.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

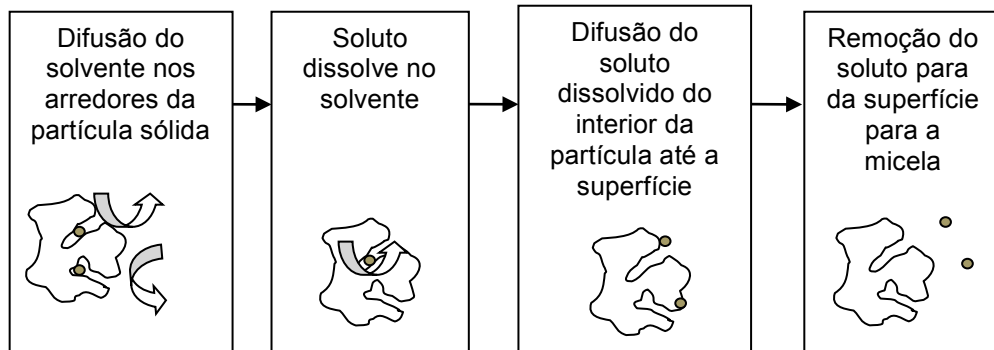
A extração sólido-líquido pode ser definida como o uso de um solvente para dissolver e remover uma fração solúvel de um sólido insolúvel e permeável (OZER, 2012). A extração sólido-líquido ou separação de solutos presentes no sólido por meio de solvente líquido é também denominada lixiviação. Nas indústrias de alimentos e materiais biológicos, bem como nas indústrias de processamento em geral, esse processo é bastante comum: produção de óleos vegetais, extração com água de açúcar de beterraba, obtenção de produtos farmacêuticos, remoção de taninos, obtenção de minerais puros são alguns exemplos. (GEANKOPOLIS, 2003).

Como um processo, a extração pode ser dividida em etapas (Figura 13). Na primeira, há difusão do solvente na partícula sólida, nos seus arredores, e também nos seus poros, ou seja, o material é “molhado” com o solvente. Na segunda etapa, há dissolução do soluto da partícula sólida no solvente. O extrato irá dissolver no solvente somente enquanto a concentração da micela (extrato + solvente) próxima ao soluto estiver abaixo da concentração de equilíbrio. A terceira etapa envolve a difusão do soluto dissolvido do interior da partícula sólida até a superfície desta, através dos poros. Por último, há a remoção do soluto dissolvido da superfície da partícula para a micela (OZER, 2012; GEANKOPOLIS, 2003).

Em geral, a taxa de transferência do solvente para a superfície do sólido não é a etapa limitante do processo. A taxa de transferência do solvente no interior do sólido, no entanto, pode ser rápida ou lenta. A dissolução do soluto no

solvente pode ser puramente física ou pode envolver reação química. A etapa limitante do processo em geral é a passagem do soluto do interior do sólido até a micela (GEANKOPOLIS, 2003).

**Figura 13 - Diagrama de Blocos do Processo de Extração Sólido – Líquido**



Fonte: Ozer 2012.

A diferença de concentração do extrato no interior da partícula sólida e da micela influencia na velocidade de extração, de acordo com a segunda lei de Fick da taxa de difusão (OZER, 2012). Em materiais de origem biológica (animais ou vegetais), a difusão de solutos do interior das células pode ser afetada de acordo com a quantidade de células que permaneceram intactas após etapas de moagem/quebra. No caso da extração de óleo de soja, os grãos são previamente quebrados para romper a parede celular e facilitar a ação do solvente. Em geral, há pouca resistência à passagem do soluto dissolvido da superfície do material para a micela, por outro lado, a resistência à difusão do soluto dissolvido no interior do sólido é apreciavelmente superior. Esse fato foi demonstrado para a extração de óleo de soja, uma vez que a agitação do solvente não produzia efeitos apreciáveis na taxa de extração (GEANKOPOLIS, 2003).

O tamanho da partícula também tem influência na velocidade de extração: partículas menores têm a vantagem de menores distâncias para o extrato percorrer, e maior área superficial. No entanto, sólidos muito finos podem resultar no efeito indesejado do empacotamento, interrompendo o fluxo de solvente no entorno das partículas, além de serem arrastados para a micela, necessitando de uma etapa extra de filtração. Deve-se buscar o menor tamanho de partícula possível, sem prejudicar o processo de extração (OZER, 2012). Para que haja melhor extração, é



necessário que o material não apresente umidade excessiva, podendo haver necessidade de secagem previamente à etapa de extração. (OZER, 2012).

Em relação ao solvente utilizado na extração, o ideal é buscar um solvente que permita a máxima solubilização dos solutos de interesse, sem que haja a extração simultânea de outros componentes indesejados. Em muitos casos, o uso de um único solvente não permite a extração de todos os componentes desejados: nesse caso são utilizadas misturas de dois ou mais solventes. Frequentemente são usadas misturas de álcoois e água e de solvente polares e não polares. A separação do material extraído também deve ser considerada na escolha do solvente apropriado. Solventes apolares não são miscíveis em água, tornando a separação mecânica mais simples, por outro lado, solventes como etanol (em água) irão requerer uma separação térmica. Outros pontos de consideração são os riscos ambientais, segurança, e a viabilidade financeira (custo) da aplicação de determinados solventes (OZER, 2012).

A escolha do solvente para a extração deve levar em conta ainda a sua volatilidade, ausência de impurezas, natureza tóxica ou reativa, capacidade de formar duas fases com água (para posterior separação), poder de extração, transparência na região UV para análises espectrofotométricas ou em HPLC e custo no processo (BRUM, 2004).

Além das características desejadas para o solvente, primariamente o alto limite de saturação e alta seletividade ao soluto que será extraído, também é importante considerar no processo de extração a temperatura e composição das correntes de saída. A temperatura deve ser escolhida para o melhor balanço de solubilidade, pressão de vapor do solvente, difusividade do soluto, seletividade do solvente e sensibilidade do produto (GREEN e PERRY, 2008)

Para o processo de extração sólido-líquido, podem ser usados diferentes equipamentos, por exemplo, com movimentação do sólido (*moving-bed leaching*), ou não (*fixed-bed leaching*), ou por agitação contínua das partículas (*agitated solid leaching*). Na extração de óleos vegetais o primeiro tipo de extrator é mais comum. Exemplos de extratores desse tipo são o extrator Bollman, o extrator Hildebrand, (GEANKOPOLIS, 2003), e o extrator Rotocel (MCCABE *et al.*, 2005), nos quais a extração ocorre em contracorrente. Green e Perry (2008) ainda citam os extratores Kennedy e Bonotto como possibilidades para a extração sólido-líquido.

### 3.3.1 Extração De Lipídeos

Os lipídeos apresentam diferentes graus de hidrofobicidade, sendo assim, é praticamente inviável a utilização de um único solvente para a extração dos lipídeos. Lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos com solventes apolares, enquanto que lipídeos polares requerem solventes polares capazes de romper as ligações eletrostáticas e de pontes de hidrogênio. Lipídios anfifílicos, como fosfolipídios, estão fortemente associados à água e proteínas. (BRUM, 2004).

Quando é feita a extração de óleo de um material, se o conteúdo de óleo é superior a 20% realiza-se uma pré-prensagem do material. Se o teor de óleo é inferior a 20%, utiliza-se a extração por solvente, diretamente. A extração de óleo com solventes é um processo físico, pois não ocorre reação química. A escolha do método de extração influencia de maneira significativa no resultado final, dependendo do tipo de material (tecido) do qual se pretende extrair o óleo. A metodologia escolhida para a extração da fração lipídica (solvente, temperatura e sistema) pode afetar tanto a quantidade extraída bem como a sua qualidade oxidativa (BRUM *et al.* 2009).

O método de Soxhlet é usado em condições de laboratório (análise) e apresenta vantagens como: a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta; é uma metodologia simples que não requer treinamento especializado e possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da micela após o término da extração, pois a amostra permanece envolta em um cartucho durante todo o procedimento. No entanto, ele deve ser escolhido quando não é necessária a utilização posterior do extrato (BRUM *et al.* 2009).

Os métodos que utilizam a mistura binária clorofórmio e metanol têm como vantagem a capacidade de extraírem tanto os lipídios neutros quanto os lipídios polares eficientemente. A mistura clorofórmio e metanol é bastante tóxica, mas eficiente na extração de lipídios polares e apolares (BRUM *et al.* 2009).

Folch e colaboradores desenvolveram um método usando uma mistura de clorofórmio e metanol, seguida pela adição de solução de cloreto de potássio, visando uma melhor separação das fases. Bligh & Dyer modificaram o método de

Folch. Apesar destes métodos apresentarem desvantagens, como a toxidez dos solventes e a indesejável extração de contaminantes não lipídicos, ambos são largamente utilizados, tanto como propostos originalmente, quanto modificados. O sistema proposto por Bligh & Dyer tem como vantagem a formação de um sistema bifásico a partir das proporções de solventes adicionados durante o processo de extração. A formação desse sistema bifásico está baseada na teoria do equilíbrio líquido-líquido dos componentes: clorofórmio, metanol e água. Esse método é recomendado quando se deseja utilizar o extrato após a extração (BRUM *et al.* 2009).

Brum (2004) utilizou quatro métodos de extração para a remoção de lipídios de aveia em flocos e peito de frango: Soxhlet com n-hexano, Folch com clorofórmio e metanol 2:1, Bligh & Dyer, com clorofórmio, metanol e água 1:2:0,8, e Hara e Radin, com n-hexano e isopropanol 3:2. Para a aveia em flocos, os métodos Soxhlet e Bligh & Dyer apresentaram melhores rendimentos de lipídios totais (7,71 e 7,76% respectivamente). Para o peito de frango, Soxhlet, Folch e Bligh & Dyer apresentaram rendimentos satisfatórios (1,56; 1,56; 1,65% respectivamente). No entanto, o método de Soxhlet afetou negativamente a qualidade da fração lipídica das amostras.

### **3.3.2 Fosfolipídios Residuais Na Soja E Seus Derivados**

Nas condições industriais de processamento da soja, os fosfatídeos extraídos para o óleo são aqueles que solubilizam em hexano, na temperatura de processo, ou em solventes apolares similares. Os fosfatídeos hidratáveis são aqueles que constituem a lecitina comercial, enquanto que permanecem no óleo os fosfatídeos não-hidratáveis, como inositídeos, além de lisolecitinas, acetalfosfatídeos, fitoglicolipídeos. Alguns fosfatídeos não extraíveis com hexano permanecem no farelo (NIELSEN, 1960).

A quantidade de lipídios residuais no farelo oscila entre 0,5 a 5% do seu peso seco (HAYES *et al.*, 1973), no entanto, esse valor pode ser ainda maior. Se viável econômica e tecnicamente, seria desejável a total remoção desses componentes, pois esses apresentam valor de mercado considerável, além de terem efeitos indesejados quando presentes farelo, para aplicação em alimentos, relacionados à cor, sabor e estabilidade. (HAYES *et al.*, 1973).

Nielsen (1960) isolou fosfatídeos do farelo de soja após extração com hexano (remoção do óleo), utilizando uma mistura de 80% de hexano e 20% de álcool absoluto. Os fosfatídeos extraídos foram fracionados e as seguintes substâncias foram encontradas: carboidratos com d-inositol na forma de metil éter, chamado pinitol; substâncias contendo nitrogênio, possivelmente resultado da decomposição das proteínas; ácido gliceroinositofosfatídico, além de ácidos graxos contendo fósforo, ácido fosfatídico de alto peso molecular, e a mistura dos glicerofosfatídeos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. Os fosfatídeos extraídos corresponderam a aproximadamente 0,5% em massa do grão de soja.

Para a extração de lipídios residuais do farelo, Haynes (1973) sugere a utilização de um meio de extração contendo um solvente hidrocarboneto (hexano, n-heptano, naftas, parafinas, e misturas) e um álcool monohídrico (metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, butanol, isobutanol, n-butanol e misturas desses). Os melhores resultados são obtidos com etanol, e uma mistura aconselhável é etanol: hexano 3:8. A ação do álcool melhora o desempenho do hidrocarboneto na solubilização dos lipídios residuais. Se a concentração do álcool for muito baixa (<10%) a eficiência de remoção é reduzida, se for muito alta (>70%), haverá uma significativa remoção de outros componentes, como açúcares. É desejável que a umidade da mistura (conteúdo em água) esteja entre 5 e 15%, não ultrapassando esse valor. No processo sugerido por Haynes (1973), o farelo obtido da extração com hexano não passa pela etapa de dessolventização (proporção solvente: sólido 1:1 até 1:3) e recebe etanol até a proporção adequada. Os autores sugerem na sequência uma extração com etanol aquoso, e as duas micelas resultantes são separadas do sólido e misturadas entre si, para então separarem naturalmente por gravidade em duas fases distintas. Na fase apolar são obtidos os lipídios, enquanto que a fase polar reúne os compostos solúveis em água e etanol. A recuperação desses lipídios residuais do farelo, segundo os autores, varia de 1 a 3% em massa.

O dióxido de carbono supercrítico (DCS) pode ser usado para remover óleos de sementes (MONTANARI *et al.*, 1999). Montanari *et al.* (1999) usaram essa estratégia combinada em duas etapas com etanol para a extração de fosfolipídios da soja. Na primeira etapa, os flocos de soja foram extraídos com DCS, e na segunda etapa, o farelo já desengordurado foi submetido à nova extração com DCS e etanol, resultando em uma fração rica em fosfolipídios. Diversas condições de pressão e

temperatura foram estudadas, e os autores conseguiram extrair um total de 9,54 e 9,65 mg de fosfolipídios/g de material na primeira e na segunda etapas, respectivamente.

Yao e Jung (2010) analisaram fosfolipídios presentes na soja e em farelos. O processo de preparo da soja consistiu na moagem dos grãos, seguida de ajuste da umidade, processo de extrusão e extração aquosa. A extração dos fosfolipídios presentes tanto no farelo obtido pelo processo de extrusão como no convencional foi realizada com uma mistura clorofórmio: metanol 2:1. Em seguida, os farelos sofreram lavagem de Folch com uma mistura de clorofórmio, metanol e 0,74% de uma solução aquosa de KCl (8:4:3 v/v/v). Os fosfolipídios extraídos foram concentrados com uma mistura hexano: solução de etanol 87%, com repetidas adições de etanol. A fase etanólica foi recolhida e clorofórmio e EDTA foram adicionados, para então a fase contendo clorofórmio ser dessolventizada e analisada. Rendimentos de extração de óleo entre 50 e 95% foram obtidos de acordo com o material inicial e processo de extração, sendo 0,09 a 0,75% do óleo bruto correspondente a fosfolipídios, e de 6 a 37% no óleo concentrado.

Lee *et al.* (2010) utilizaram uma mistura clorofórmio: metanol 1:1 para extração de lipídios da soja, sendo estes recuperados na fase orgânica. Os fosfolipídios foram posteriormente analisados e separados pelo método validado pelos autores. A média do total de fosfolipídios de 12 cultivares de soja foi 75,7 mg/kg.

Melton *et al.* (1979) extraíram lipídios de farelo, concentrado e isolado de soja, utilizando os métodos: extração Soxhlet com clorofórmio-metanol (1), com etanol-benzeno (2), extração com clorofórmio-metanol (3) e extração com hexano-etanol (4). O procedimento 2 extraiu mais lipídios do que o 1 para o isolado proteico e para o farelo. O procedimento 4 foi o que extraiu menos lipídios para todos os materiais. O percentual de lipídios em base seca para cada produto foi de 1,6 a 4,5% para o farelo, 0,9 a 1,4% para o concentrado e 0,3 a 1% para o isolado, sendo obtidos teores variados para lecitinas, lipídios neutros e polares de acordo com cada método e material utilizado.

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DE LECITINA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE FOSFOLIPÍDIOS

Os métodos analíticos encontrados na literatura para quantificação de fosfolipídios foram: cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por ultravioleta (UV), espalhamento de luz evaporativo (ELSD) e por acoplamento a espectrometria de massas (MS). Há registros também por espectroscopia de ressonância nuclear magnética (RMN). (YAO e JUNG, 2010)

Dos métodos por cromatografia líquida destacam-se aqueles aplicados para quantificação de fosfolipídios em lecitina de soja. Melton (1992) desenvolveu um método de quantificação de fosfolipídios da lecitina por HPLC ELSD utilizando um sistema com dois solventes para separação em fase normal. Contudo o método descrito não consegue a separação entre o fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA), dois dos quatro fosfolipídios majoritários presente na lecitina de soja. Montanari *et al.* (1998) descreve um método em fase normal, com gradiente de eluição para quantificação dos fosfolipídios majoritários fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA) por ELSD.

Há registros também de métodos cromatográficos que utilizam detecção por UV. Beare-Rogers *et al.* (1992) descrevem a separação e quantificação dos fosfolipídios majoritários da lecitina: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA) por HPLC com detecção por ultravioleta a 206 nm. O método desenvolvido por Hurst e Martin (1984) quantifica fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidil inositol (PI) por cromatografia em fase reversa com detecção UV a 205 nm. Os autores não citam o ácido fosfatídico (PA). Contudo, métodos que utilizam a detecção por ultravioleta em comprimentos de onda abaixo de 210 nm apresentam algumas limitações: poucos solventes não absorvem nessa faixa de comprimento de onda, pouca seletividade devido ao baixo comprimento de onda utilizado e alto limite de quantificação. Os fosfolipídios apresentam baixa absorvidade molar devido a sua estrutura química, as poucas duplas ligações existentes nos grupos funcionais carbonila, carboxila e aminoácido da molécula são responsáveis pela absorção em baixo comprimento de onda (JUNGALWALA *et al.* 1976).

Lee *et al.* (2010) recentemente utilizaram HPLC de fase reversa acoplado a um espectrômetro de massa com ionização por *eletrospray* para identificação e quantificação de fosfolipídios, apontando as vantagens de alta seletividade e possibilidade de utilização de fluxos de até 1 mL/min, reduzindo o tempo total de análise.

### 3.4.1 Validação Analítica Por Cromatografia

A qualidade e a confiabilidade dos ensaios realizados pelas indústrias e laboratórios de análise são de extrema importância e muito exigidas pelas agências reguladoras. Resultados analíticos impróprios, em sua maioria, acabam gerando decisões errôneas, prejuízos financeiros e danos ao consumidor. Com o objetivo de garantir resultados confiáveis, um método que é desenvolvido deve ser avaliado, essa avaliação é denominada validação analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método analítico tem como propósito garantir através de métodos experimentais que os resultados obtidos sejam confiáveis (ANVISA, 2003). Todos os métodos desenvolvidos, modificados, fora do escopo que foi concebido devem ser validados. Os métodos considerados oficiais ou normalizados como ISO, Farmacopeicos, AOCS etc, não necessitam de validação, desde que não sejam modificados. Os parâmetros analíticos avaliados para ensaios quantitativos de compostos majoritários são: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão e robustez (ANVISA, 2003, ICH, 2005, INMETRO, 2011).

#### 3.4.1.1 Seletividade

É a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003, ICH, 2005)

Este parâmetro em cromatografia pode ser avaliado pela comparação dos resultados obtidos com aqueles somente do analito e entre os do analito com matriz e impurezas, demonstrando que o resultado não altera a resposta do detector na presença dos mesmos (ANVISA, 2003, ICH, 2005), apresentando todos os interferentes bem resolvidos em relação ao analito e às impurezas (CDER, 1994).

O método de adição padrão é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Desse modo, compara-se a curva analítica com adição da substância de interesse na amostra com a curva analítica sem a presença da matriz, caso apresentem um coeficiente angular próximo, há um indicativo de que os componentes da matriz não interferem na quantificação dos analitos, portanto o método é seletivo (RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliada constantemente. Caso a seletividade do método não seja assegurada, os demais parâmetros de validação ficam comprometidos (RIBANI *et al.*, 2004, INMETRO, 2011).

#### 3.4.1.2 Linearidade e Faixa de Trabalho

Linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

A determinação da linearidade é feita através de uma análise estatística da curva de calibração do analito, realizada com, no mínimo, cinco concentrações diferentes e em triplicata. Os parâmetros analisados da curva de calibração são o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular (ICH, 2005, SHABIR, 2003). O coeficiente de correlação fornece uma estimativa da qualidade da curva, quanto mais próximo do valor um, menor é a dispersão dos resultados e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). Os critérios mínimos aceitos pela ANVISA são de um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99.

#### 3.4.1.3 Exatidão e Recuperação

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

O ICH (The International Conference on Harmonisation) e a ANVISA (Agência Nacional de vigilância Sanitária) estabelecem que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração



deve ser obedecido. Todas essas concentrações devem estar dentro do intervalo do método, sendo que para determinação da exatidão é preciso primeiramente determinar a seletividade e a linearidade do método (ANVISA, 2003, FDA, 2000, ICH, 2005).

A exatidão deve ser expressa como o percentual de analito recuperado no ensaio, em relação ao valor aceito como verdadeiro que corresponde a 100% (ICH, 2005). Não há uma faixa de valor de recuperação aceitável definida, tudo depende da matriz a ser trabalhada e a concentração dos analitos, mas quanto mais próximo de 100%, mais exato é o método. O FDA recomenda uma recuperação, para fármacos, em torno de  $\pm 2\%$  do valor real para matéria-prima, nas três concentrações testadas dentro do intervalo linear do método (SHABIR, 2003). A ANVISA, para ensaios bioanalíticos recomenda uma recuperação de  $\pm 15\%$  do valor nominal. Porém e ICH e INMETRO não definem valores de recuperação.

#### 3.4.1.4 *Precisão*

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003, ICH, 2005). Pode ser considerada em três níveis: repetibilidade ou repetitividade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) (INMETRO, 2011).

#### 3.4.1.5 *Repetibilidade ou Repetitividade (precisão intra-corrída)*

A repetibilidade é o termo utilizado pela ANVISA, o INMETRO utiliza o termo repetitividade, os dois termos referem-se ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, pelo mesmo analista dentro de um curto período de tempo, com a mesma instrumentação e método. A repetibilidade pode ser verificada pela avaliação do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, de um mínimo de nove determinações em três níveis de concentrações (alta, média e baixa), de acordo com o intervalo especificado, ou num mínimo de seis determinações para uma única concentração teste (ANVISA, 2003, ICH, 2005). Esse ensaio também não há um valor máximo aceitável definido, vai depender da matriz e

concentração do analito, contudo quanto menor for a dispersão dos resultados mais preciso é o método. A ANVISA, para ensaios bioanalíticos recomenda um desvio padrão relativo abaixo de 15 %. Porém a ICH e INMETRO não definem valores.

#### 3.4.1.6 *Precisão intermediária (precisão intercorrida)*

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003, ICH, 2005). O cálculo da precisão intermediária é feito também através do desvio padrão relativo. A precisão intermediária tem maior representatividade na variabilidade dos resultados do método em comparação a repetibilidade (RIBANI *et al.*, 2004, INMETRO, 2011).

#### 3.4.1.7 *Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)*

A reprodutibilidade é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Refere-se aos resultados de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em métodos oficiais (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

#### 3.4.1.8 *Robustez*

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações, quando não é afetada por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros, indicando sua confiança (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

A ANVISA recomenda alguns fatores que devem ser variados para cromatografia líquida: variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, e variações na temperatura e fluxo da fase móvel. Porém, não determina quanto cada fator citado pode ser variado, mas que essa variação não é significativa para influenciar na corrida analítica e a quantificação.

## **4.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ANÁLISES – METODOLOGIAS ANALÍTICAS EXISTENTES**

#### **4.1.1 Proteína**

As análises de proteína bruta foram realizadas pelo método Kjeldahl, conforme descrito no método Bc 4-91 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004). Nesse método, a amostra é submetida a um processo de digestão com ácido sulfúrico concentrado na presença de um catalisador, após o qual se forma sulfato de amônio. O material é então destilado com base para converter o sal de amônio em amônia, que é borbulhada em um frasco no qual há sua dissolução e conversão no íon novamente. Por último, é realizada uma titulação do frasco contendo os íons.

#### **4.1.2 Umidade**

A análise de umidade do farelo de soja desengordurado foi realizada em estufa pela perda de massa a temperatura de 130°C por três horas, conforme descrito na monografia Ac 2-41 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004). Para análise de umidade do melaço de soja foi utilizada a mesma metodologia, porém a temperatura de 105°C *overnight* foi utilizada uma vez que em maiores temperaturas há a queima da superfície do material e a secagem da parte inferior é prejudicada. A umidade da lecitina acabada foi determinada por Karl Fisher (AOCS método Ja 2b-87), no qual é feita a titulação com o reagente de Fisher, que reage quantitativamente com a água.

#### **4.1.3 Lipídios**

A análise de lipídios das amostras foi realizada por extração etérea sob aquecimento por 3 horas conforme descrito na monografia Ba 3-38 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS). De acordo com esse procedimento, a amostra foi moída, envolta em papel de filtro e extraída em equipamento adequado com éter de petróleo.

#### **4.1.4 Índice De Peróxido**

O índice de peróxido foi determinado em amostras de lecitina conforme o método AOCS Ja 8-87. A metodologia determina todas as substâncias que oxidam iodeto de potássio nas condições do teste. Em resumo, uma porção de teste de aproximadamente 5 gramas é misturada a uma solução de ácido acético e clorofórmio, homogeneizada e em seguida se adiciona o iodeto de potássio. A solução é titulada com tiosulfato de sódio e solução indicadora de amido. O resultado é expresso em meq de peróxido por 1000 g de amostra.

#### **4.1.5 Viscosidade**

A viscosidade da lecitina foi determinada a 25°C pelo método AOCS Ja 10-87. A amostra foi aquecida levemente e sua viscosidade foi determinada em centipoise com auxílio de viscosímetro Brookfield Syncho-Lectric.

#### **4.1.6 Índice de acidez**

Os índices de acidez das amostras de lecitina foram determinados pelo método AOCS Ja 6-55. Esse índice corresponde à quantidade de hidróxido de potássio em mg necessário para neutralizar os ácidos de 1g de amostra. Para a realização do método, 2g de amostra foram dissolvidos em 50mL de éter de petróleo, e em seguida se adicionou 50 mL de álcool neutro e 4 gotas de indicador. A mistura foi titulada com hidróxido de sódio.

#### **4.1.7 Insolúveis Em Acetona**

O valor dos insolúveis em acetona das amostras de lecitina foi determinados pelo método AOCS Ja 4-46. O método determina a matéria insolúvel em acetona da amostra, no caso da lecitina, representa principalmente fosfatídios. Em resumo, para a realização do procedimento a amostra foi levemente aquecida, misturada com acetona, homogeneizada, resfriada e centrifugada sucessivas vezes até resultar em um precipitado “limpo”, que foi seco em estufa de circulação de ar e teve sua massa determinada.

#### 4.1.8 Impurezas Na Lecitina

As impurezas na lecitina foram determinadas pelo valor dos insolúveis em hexano de acordo com o método AOCS Ja 3-87. De forma resumida, a amostra foi homogeneizada, misturada com hexano e filtrada. O material residual do filtro foi em seguida seco em estufa de circulação de ar forçado e teve sua massa determinada.

#### 4.1.9 Sensoriais

Foram realizadas análises de cor Gardner nas amostras de lecitina (conforme ASTM D – 1544). A cor foi determinada por comparação da amostra sem diluição com padrões por no mínimo dois analistas treinados, que apontaram os valores de cor mais próximos da escala. O valor final foi determinado pela média dos valores estipulados pelos analistas.

Amostras de lecitina foram submetidas a análises sensoriais (aroma, odor e cor) pela empresa CP- Lörrach.

#### 4.1.10 Microbiológicas

As amostras de lecitina foram submetidas a análises microbiológicas para detecção de: Coliformes fecais, totais e *Escherichia coli* (AOAC 991.14), Bolores e Leveduras (AOAC 997.02), contagem total de bactérias mesófilas (AOAC 990.12), *Salmonella* sp. (ISO 6579 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*), e Enterobacteriaceae (APHA *American Public Health Association; Manual de métodos de Análise Microbiológica de alimentos e água*).

Em resumo, no método para coliformes, uma amostra diluída adequadamente (1 mL) foi adicionada no centro de uma placa de cultivo contendo meio adequado, espalhada por pressão com um filme plástico (placa *Petrifilm™ E. coli/Coliform Count plate*) e incubada por 24h (48h para *E. coli*) a 35°C. Após a incubação, as colônias foram contadas (vermelhas correspondem a coliformes e azuis a *E. coli*). Para o método de contagem de bactérias mesófilas foi utilizada a placa *Petrifilm™ Aerobic count plate*, incubação por 48h e 35°C. Para o método de

bolores e leveduras, foram utilizadas placas *Petrifilm™ yeast and mold count plates* nas quais há a presença de nutrientes e antibióticos. Para esse ensaio, foi empregada temperatura de incubação entre 20 e 25°C por cinco dias. No método ISO para detecção de *Salmonella*, são realizadas cinco etapas com quatro incubações. A amostra é homogeneizada com água peptonada tamponada, e em seguida ocorre a primeira incubação (pré-enriquecimento, a 36°C) e a segunda incubação (enriquecimento seletivo). Na terceira incubação é feito o plaqueamento e diferenciação e por último, são feitas provas bioquímicas nas colônias suspeitas.

#### **4.1.11 Açúcares**

As análises de açúcares foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração, o modelo usado foi da Agilent Technologies 1200 e software Chemstation. A coluna usada foi coluna Supelcogel Ca 300 x 7,8 mm com pré-coluna Supelcoguard CA 50 x 4,6 mm da Supelco. A fase móvel foi água ultra pura. As condições cromatográficas empregadas foram: volume de injeção de 5 µL, fluxo da fase móvel 0.3 mL/min, temperatura do forno de coluna 80°C, tempo de corrida de 35 minutos

## **4.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS**

Este tópico é, de fato, um resultado deste trabalho. Optou-se, contudo, por descrever neste capítulo os materiais, equipamentos e procedimentos experimentais utilizados na execução deste estudo, e apenas os resultados principais que permitem discussão no Capítulo 5 - Resultados e Discussão.

Os teores de fosfolipídios das amostras de extração tanto de soja como de farelos de soja desengordurados (4.2 a 4.3.1) e da lecitina acabada (4.3.2) foram determinados por uma metodologia desenvolvida e validada em lecitina conforme é descrito a seguir (4.2.1).

#### 4.2.1 Validação de método cromatográfico de perfil de fosfolipídios em lecitina.

Os materiais utilizados no estabelecimento da metodologia para determinação cromatográfica de fosfolipídios foram provetas de 100, 250, 500 e 1000 mL; balões volumétricos calibrados de 5 mL; seringas de 5mL, filtros de seringa PVDF de 0,22 µm de poro, pipetas automáticas com suas ponteiros respectivas, *vials* de 1,5 mL com septo e lacre de alumínio, inserts de 250 µL e tubo falcon de 50 mL. Os reagentes e padrões utilizados foram: Isopropanol grau HPLC (J.T Baker), n-Hexano 95 % grau HPLC (MALLINCKR); Água ultrapura, Ácido acético glacial (Merck), Trietilamina (J.T Baker). Os padrões de referência PC (95,0%), PE (99,0%), PI (99,0%), PA (99,0%), PS (99,0%), e PG (99,0%) foram obtidos da *Avantis polar lipids*. A mistura de padrões de fosfolipídios foi fornecida pela Supelco. Utilizou-se uma lecitina fluida convencional no processo de validação do método de determinação de fosfolipídios, uma vez que é necessária a validação em uma matriz real (e não somente em uma mistura de padrões) para a avaliação do método frente à presença de possíveis interferentes.

Os equipamentos usados nos ensaios de validação foram: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Agilent, modelo 1200 series com detector Agilent 1260 Infinity ELSD, vortex (biomixer) e balança analítica (Bioprecisa).

Os teores de fosfolipídios foram quantificados por cromatografia líquida em fase normal com detecção de espalhamento de luz evaporativo. Foi usada uma coluna de sílica modelo Varian Pursuit XRS Si 100 x 4,6 mm, 3.0 µm, com uma temperatura de forno de 40 °C. A fase móvel usada foi uma mistura de solventes orgânicos divididos em dois grupos. A fase móvel A: n- hexano, 2-propanol, ácido acético glacial, trietilamina (820/165/10/0,8 v/v/v/v) e a fase B composta por 2-propanol, água ultrapurificada, ácido acético glacial, trietilamina (845/140/1,0/0,8 v/v/v/v). A eluição da fase móvel foi de forma gradiente, conforme descrito na Tabela 4. Os parâmetros do detector de espalhamento de luz foram: temperatura de 50 °C, com uma pressão de nitrogênio de 3,5 bar, ganho de 2 e filtro de 8s. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL.

O preparo dos padrões nas concentrações desejadas foi feito através de diluição direta com n-hexano como diluente. A lecitina foi preparada da seguinte

forma: cerca de 500 mg de lecitina foram pesados num tubo de 50 mL, diluídos em 10 mL de n-hexano grau HPLC, agitados em *vortex* por 5 min e filtrados em filtro de PVDF (0,22  $\mu$ m) antes da injeção.

**Tabela 4 - Gradiente de eluição do método.**

Tempo (min)	%A	%B	Fluxo (mL/min)
0,00	98	2	0,4
2,00	98	2	0,4
25,00	78	22	0,4
40,00	10	90	0,4
50,00	98	2	0,4

Para comprovação da confiabilidade do método desenvolvido houve a necessidade de execução dos testes de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade foi avaliada pelo método de adição de padrão, uma vez que não há possibilidade de se obter amostras de lecitina (matriz) isenta dos analitos de interesse (fosfolipídios). O método da adição do padrão consiste em um comparativo entre duas curvas analíticas, sendo uma obtida através de soluções padrão, e outra obtida através de uma matriz fortificada com padrões analíticos. As curvas analíticas foram feitas em triplicata, contemplando três níveis de concentração para cada fosfolipídio: PA (0,7; 2,0 e 4,0 mg/mL), PC (0,9; 2,7 e 5,8 mg/mL), PE (0,9; 1,8 e 4,0 mg/mL) e PI (0,5; 1,2; 3,0 mg/mL). As soluções padrões foram injetadas no cromatógrafo líquido e as áreas correspondentes de cada composto, em cada nível de concentração, registradas e submetidas a análise de regressão linear. Em seguida, 50  $\mu$ L de uma matriz de lecitina (diluída 1:40 g/v) foram adicionados a um *vial* de 250  $\mu$ L sendo esta matriz fortificada nos mesmos níveis de concentração das soluções padrão. O procedimento foi realizado em triplicata. As amostras fortificadas foram injetadas no cromatógrafo sendo as áreas obtidas registradas e submetidas à análise de regressão linear. Foram calculados os valores médios, desvio padrão e desvio padrão relativo para as duas curvas.

A linearidade foi determinada através do método da padronização externa, no mínimo, cinco níveis de concentração contemplando uma faixa 0.25 a 7.5 mg/mL dependendo da proporção de cada fosfolipídios na amostra. Os níveis de concentração avaliados para o PE (0.5 a 7.5 mg/mL), PA (0.25 a 7.5 mg/mL), PS (0.25 a 3.5 mg/mL), PG (0.25 a 3.0 mg/mL), PI (0.5 a 7.5 mg/mL), PC (0.5 a 7.5



mg/mL). Para a realização deste ensaio, uma triplicata de soluções de trabalho foi diluída em n- hexano para obtenção de cada ponto da curva de calibração. As amostras foram filtradas em filtro de PVDF (0,22 µm), as áreas obtidas com os diferentes analitos em diferentes níveis de concentração submetidas à análise de regressão linear.

A repetibilidade foi determinada utilizando soluções padrões de trabalho preparadas em três níveis de concentração para o PE (0,79; 1,01; e 1,26 mg/mL), PA (0,92; 3,63 e 6,15 mg/mL), PI (0,70; 3,5 e 6,0 mg/mL) para o PC (0,77; 3,80 e 6,77 mg/mL). As amostras foram preparadas em triplicata, em um período curto de tempo, no mesmo dia pelo mesmo analista. As injeções foram realizadas em um mesmo equipamento em condições idênticas de uso. Os resultados foram avaliados pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR), a fim de se verificar a dispersão dos resultados obtidos entre as duas corridas analíticas. Além do DPR foi calculado o limite de repetibilidade para um intervalo de confiança de 95%, que, para um mínimo de seis amostras, pode ser feito utilizando a seguinte fórmula:

$$r = 2,8 \times S$$

**Equação 2**

Na qual “S” representa o desvio padrão das amostras e “r” o limite de repetibilidade.

A precisão intermediária foi determinada por um segundo analista, nos mesmos níveis de concentração da repetibilidade, porém dois dias após este ensaio. O mesmo tratamento matemático da repetibilidade foi utilizado na comparação entre os resultados obtidos pelos dois analistas.

A reprodutibilidade não é um teste necessário para essa finalidade.

A exatidão foi realizada através do método da adição do padrão. Este ensaio consistiu na determinação da percentagem de erro relativo entre a concentração teórica e a concentração experimental dos analitos. Para a obtenção da concentração teórica, soluções de trabalho foram preparadas em triplicata de modo a se obter três níveis distintos de concentração para o PC (0,54; 2,85 e 5,30 mg/mL), para PI (0,50; 3,0 e 5,7 mg/mL) para o PA (0,79; 2,35 e 4,10 mg/mL) e para PE (0,86; 1,93, e 3,09 mg/mL). Essas soluções foram injetadas no Cromatógrafo Líquido, sendo os teores obtidos de cada composto, em cada nível de concentração, considerados como teóricos.

Para a obtenção da concentração experimental, inicialmente a lecitina foi diluída 1:40 m/v em n-hexano, agitado em *vortex* por 5 min. O procedimento foi executado em triplicada sendo as amostras filtradas e injetadas no Cromatógrafo Líquido. Os teores correspondentes de cada fosfolípido metabólito na matriz diluída foram registrados. Em seguida, os fosfolípidos metabólitos foram misturados à matriz junto com soluções padrão, de modo a fortificar a matriz com os mesmos níveis da concentração teórica do ensaio. A concentração experimental dos analitos foi calculada subtraindo os teores encontrados nas amostras fortificadas, daqueles obtidos nas amostras sem fortificação.

Ao final do experimento, a percentagem de recuperação (exatidão) foi calculada através da equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad \text{Equação 3}$$

Para avaliar o parâmetro de robustez, uma sextuplicata de amostra foi preparada e injetada nas seguintes condições:

- Condições nominais do método;
- Com aumento no fluxo de 0,4 para 0,42 mL/min;
- Com redução no fluxo de 0,4 para 0,38 mL/min;
- Com aumento na temperatura de forno de 40 para 45 °C;
- Com redução na temperatura de forno de 40 para 35 °C;
- Com aumento na proporção de Fase B (3%);
- Com redução na proporção de Fase B (1%).

Ao final dos ensaios os resultados obtidos com o método nominal foram por fim comparadas com os resultados obtidos com o método modificado. Para verificar se há diferença significativa entre as condições testadas foi realizado o Teste T de Student, para amostras de tamanhos e variâncias iguais, com nível de confiança de 95%, teste bicaudal e grau de liberdade igual a 6. O valor crítico encontrado na tabela para essa condição foi 2,969. Portanto, podemos afirmar com 95 % de confiança que valores encontrados para *t-student* são significativamente iguais, ou seja, as alterações do método não provocam mudanças no resultado. Por outro lado, valores fora dessa faixa, tanto acima como abaixo, indicam que a mudança avaliada no método apresenta alteração significativa.

#### 4.2.2 Estudo de quantificação de fosfolipídios em matrizes sólidas

A quantificação de fosfolipídeos em matrizes sólidas requer inicialmente a extração destes. Para se avaliar o melhor sistema de extração para o preparo de amostras destinadas à análise cromatográfica, foram testados três sistemas de extração. Compararam-se os rendimentos de extração obtidos com extração por hexano, com a mistura hexano: etanol (4:1 v/v) e utilizando o método descrito por Bligh & Dyer (BLIGH & DYER, 1959; B&D), no qual se emprega solução aquosa de clorofórmio e metanol. Os resultados das extrações com a mistura hexano: etanol e B&D foram comparados com a extração com hexano apenas, por ser esse o solvente utilizado no processo industrial. A escolha dos métodos para preparo de amostras de quantificação de fosfolipídios baseou-se na literatura disponível (revisada em 3.2.4).

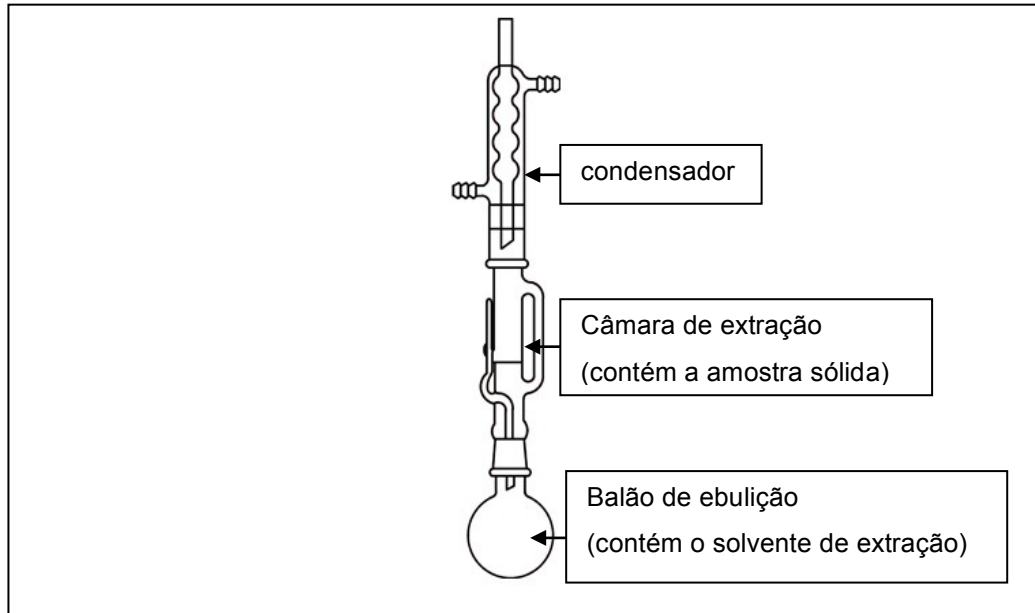
O teste foi realizado com amostras de farelo de soja desengordurado e soja inteira, ambas obtidas em uma processadora de soja. Ambas as amostras foram moídas em moinho de facas, analisadas quanto ao teor de umidade e extraídas. As extrações com hexano e hexano: etanol foram realizadas por 24 horas em equipamento Soxhlet (Figura 14). No processo de extração em Soxhlet, a amostra sólida é acondicionada em papel de filtro qualitativo e colocada no interior da câmara de extração. Os solventes são colocados no balão, e, no processo de ebulição, o vapor sobe até a câmara de extração, condensa no condensador e enche a câmara de extração, até o ponto em que o solvente contendo o extrato escorre pelo braço lateral voltando para o balão. O processo repete sequencialmente durante todo o tempo de extração. A extração pelo método Bligh & Dyer (1959) foi realizada conforme o procedimento descrito pelos autores, e ilustrado na Figura 15.

Todos os extratos obtidos foram analisados em relação ao teor de fosfolipídios conforme o método definido no estudo efetuado segundo metodologia descrita em 4.2, avaliando-se também alterações nos perfis de fosfolipídios obtidos em cada método estudado. O teor de fosfolipídios do farelo seco foi calculado conforme equação 4.

$$\text{Rendimento de extração (\%)} = \frac{M_{\text{extrato}} \times PL_{\text{extrato}}}{M_{\text{farelo úmido}} \times (100-U)}$$

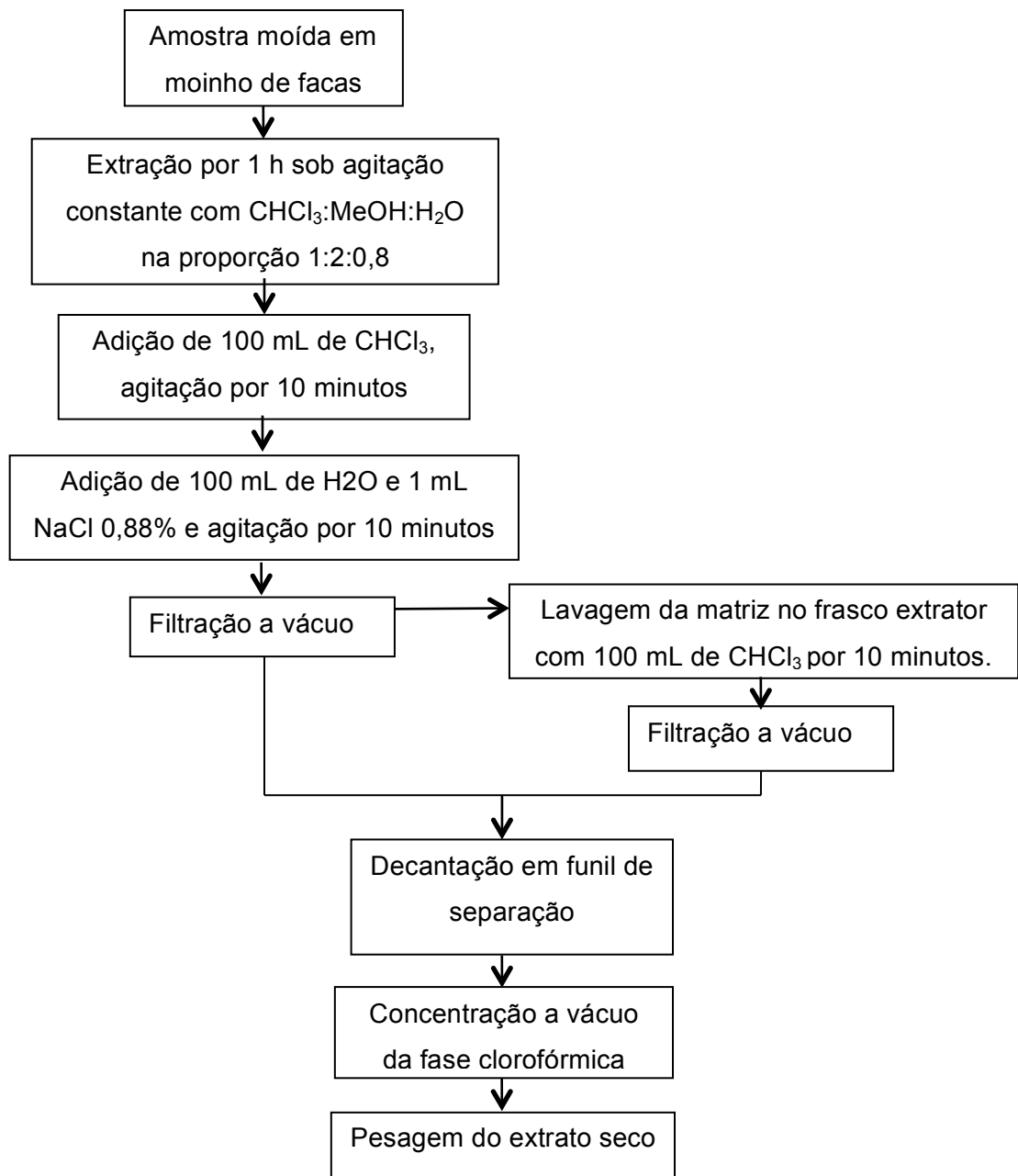
Equação 4

Figura 14 - Esquema representativo da extração em Soxhlet



Na Eq.4  $M_{\text{extrato}}$  é a quantidade de extrato obtida, livre de umidade, em gramas;  $PL_{\text{extrato}}$  é o teor de fosfolipídios quantificados no extrato seco, em porcentagem massa/massa;  $M_{\text{farelo úmido}}$  é a massa de farelo colocada no extrator, em gramas; e  $U$  é a umidade do farelo colocado no extrator, em porcentagem massa/massa.

Figura 15 - Fluxograma da extração com o método Bligh & Dyer (1959).



### 4.3 TESTES LABORATORIAIS

Três testes em escala de laboratório foram planejados para avaliar a extração de fosfolipídios remanescentes no farelo de soja após extração do óleo bruto da soja com hexano. O primeiro experimento foi conduzido para avaliar a eficiência de extração de quatro diferentes sistemas de solventes: hexano, hexano: etanol, etanol aquoso e clorofórmio: metanol (4.3.1), comparando-se os sistemas de solventes quanto ao rendimento, pureza do extrato obtido e perfil de fosfolipídios.

Com o intuito de verificar se a concentração do sistema de solventes selecionada no primeiro teste era a mais adequada (75% v/v etanol aquoso), e visando uma recuperação industrial e produção simultânea de concentrado proteico de soja e lecitina, um segundo experimento foi conduzido variando-se a concentração de etanol utilizada em solução aquosa (4.3.2). Ainda utilizando como solvente a solução alcoólica, o terceiro experimento foi realizado com objetivo de estudar as solubilidades dos fosfolipídios de acordo com a concentração alcoólica e a temperatura, sendo que neste experimento a lecitina em pó foi utilizada como matéria prima por apresentar um teor elevado de fosfolipídios (4.3.3).

#### **4.3.1 Avaliação Extração Fosfolipídios Do Farelo Desengordurado De Soja com Diferentes Solventes**

Avaliou-se a eficiência de extração dos fosfolipídios do farelo desengordurado por diferentes solventes empregados para esse fim, em comparação com o etanol 75%, que é o solvente utilizado na extração do SPC (concentrado proteico de soja). Nesse experimento, uma amostra de farelo desengordurado de soja de aproximadamente 2 kg, foi coletada e moída em moinho analítico padronizando sua granulometria abaixo de 0,50mm (35 mesh).

Uma alíquota de aproximadamente 100g foi colocada em papel filtro (qualitativo), procurando-se minimizar a compactação da amostra. Na parte superior do papel foi colocada uma porção de algodão para promover melhor distribuição do solvente no leito. A amostra foi então colocada em extrator de Soxhlet de 500 mL.

Em um balão de fundo arredondado foram colocados os solventes de extração para cada experimento: etanol 75%, hexano: etanol (4:1), hexano e clorofórmio: metanol (2:1), com um volume três vezes superior ao volume do extrator (1,5L). O experimento foi realizado em capela com exaustão.

As amostras foram extraídas exaustivamente por 24 horas, procurando garantir assim uma extração completa dos fosfolipídios possíveis pelo solvente. Após a extração o farelo foi dessolventizado em estufa com circulação de ar a 75°C, enquanto o material extraído foi concentrado em evaporador rotativo Fisatom modelo 803 a aproximadamente 60°C e 500 mmHg. Os procedimentos de extração foram realizados em triplicata.

Nos extratos concentrados quantificou-se o teor de fosfolipídios (4.2). e o rendimento de extração foi calculado conforme a equação 4.

#### **4.3.2 Otimização Do Processo De Extração**

Com o objetivo de otimizar a extração de fosfolipídios do farelo de soja desengordurado simultaneamente com o processo de extração de açúcares para concentração de proteína e produção de SPC, foram realizados experimentos variando-se o teor de etanol do solvente de extração.

Os ensaios foram realizados em um balão de extração aquecido e agitado por chapa aquecedora magnética e conectado a um condensador. As condições da extração foram: temperatura de ebulição do solvente; farelo desengordurado moído, com granulometria inferior a 0,5 mm; massa inicial de farelo igual a 100g; volume de solvente de 1,6 litros; tempo de extração de 45 minutos, considerados a partir do início da ebulição do solvente; agitação constante.

Após a extração filtrou-se o farelo em papel filtro qualitativo, com auxílio de bomba de vácuo e funil de Büchner, e em seguida lavou-se o farelo com 300 mL de solvente limpo, na temperatura de ebulição. O farelo foi acondicionado em copo de Becker tarado e seco em estufa de circulação para posterior pesagem.

O solvente, contendo os extratos, foi filtrado para remoção de qualquer resíduo sólido, concentrado em evaporador rotativo e pesado.

Analisaram-se os teores de proteína e umidade dos farelos residuais e o teor de fosfolipídios dos extratos. Os teores de fosfolipídios extraídos por cada solvente foram calculados conforme a equação 4.

#### **4.3.3 Avaliação Comportamento Dos Fosfolipídios Individuais Em Diferentes Concentrações de Etanol e Temperatura**

A solubilidade de um soluto em um solvente é um parâmetro fundamental no processo de extração sólido-líquido. Nesse processo, o solvente ideal é aquele que permite a máxima solubilização do soluto de interesse (e menor solubilização de outros materiais) (OZER, 2012). A amostra irá dissolver até um limite de saturação, sendo assim sua solubilidade no solvente de extração deve ser considerada (GREEN e PERRY, 2008).

Baseando-se nesse conceito elaborou-se um experimento para avaliar o comportamento dos diferentes fosfolipídios empregando-se variadas concentrações de etanol e condições de temperatura, definindo-se as concentrações de saturação dos mesmos. A temperatura influi na extração e deve ser escolhida de forma a se obter o melhor balanço de solubilidade, difusividade do soluto, seletividade do solvente e sensibilidade do produto (GREEN e PERRY, 2008).

Em primeiro lugar, estudou-se o comportamento da lecitina em pó (Solec F, Solae do Brasil - Indústria e Comércio de Alimentos Ltda.) quando solubilizada em diferentes sistemas solventes variando-se a concentração alcoólica de zero (água deionizada) a 100% (etanol anidro). Como os rendimentos de extração e o perfil de fosfolipídios foram avaliados a partir das extrações empregando como matéria-prima o farelo de soja desengordurado (4.3.1 e 4.3.2) optou-se pela realização deste experimento de solubilidade de fosfolipídios utilizando a lecitina em pó, por ser essa uma matriz livre de possíveis interferentes e com alto teor de fosfolipídios (aproximadamente 97% de insolúveis em acetona e 73 % de fosfolipídios , o primeiro de acordo com o fabricante e o segundo análise interna). A lecitina em pó utilizada também apresentava um valor máximo de 36 mg KOH/g para o índice de acidez, cor amarelo-clara, máximo de 0,02% de insolúveis em hexano e umidade inferior a 1,1%, de acordo com o fabricante.

A mistura de solventes (nesse caso, etanol e água), é frequentemente empregada em processos de extração (OZER, 2012). O primeiro estudo foi realizado em temperatura ambiente, pois se entende que o aumento de temperatura aumentará a solubilidade em qualquer proporção de solvente testada.

Adicionou-se aproximadamente 1g de lecitina em pó e 100 mL de solução alcoólica, anotando-se os pesos exatos da lecitina pesada e da mistura final em balança analítica. A solubilização foi feita em Erlenmeyer de 250 mL, por duas horas em mesa agitadora orbital, mantida a 25°C. Após solubilização as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo e em seguida centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, pois se observou a presença de precipitados em algumas das amostras após a filtração. Os sobrenadantes foram analisados quanto ao teor de fosfolipídios conforme método descrito.

Obtido o perfil de solubilidade da lecitina em relação ao grau alcoólico, escolheram-se os pontos de maior e menor solubilidade e um ponto intermediário para estudo dos perfis de solubilidade em função da temperatura (25 até 75°C). Em



balão de fundo chato colocou-se 17g de lecitina em pó e 1,7 litros de solvente. As concentrações de etanol testadas foram 50, 75 e 90%. Ao balão de fundo chato acoplou-se um condensador e todo o sistema foi levado ao aquecimento em agitador magnético por duas horas. Cada solvente foi testado nas temperaturas de 25, 40, 50, 60 e 75°C. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de centrifuga, sendo submetidas à centrifugação a 4.000 rpm por cerca de 10 minutos na temperatura de extração. Os sobrenadantes das amostras foram filtrados e analisados quanto ao teor de fosfolipídios. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.4 TESTES INDUSTRIAIS E PILOTO**

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de laboratório, foram elaborados três testes em escalas piloto e industrial, a fim de verificar o comportamento do material em condições reais e estudar a possibilidade de aplicação da tecnologia desenvolvida industrialmente. No primeiro teste, foram estudadas condições para a recuperação dos fosfolipídios da micela alcoólica por centrifugação, em escala industrial (4.4.1). Em um segundo teste, a goma do teste de centrifugação industrial foi seca em rotaevaporador e analisada em laboratório para avaliação de sua qualidade em relação a parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Após análise da qualidade da lecitina final obtida, amostras foram enviadas para cliente para avaliações rigorosas e aplicação da lecitina produzida em seus produtos (4.4.2). Por último, em um terceiro teste, a goma recuperada foi utilizada a fim de se estabelecer condições apropriadas de secagem em secador contínuo e as amostras de lecitina produzidas foram avaliadas quanto à cor e umidade (4.4.3).

##### **4.4.1 Teste industrial de recuperação**

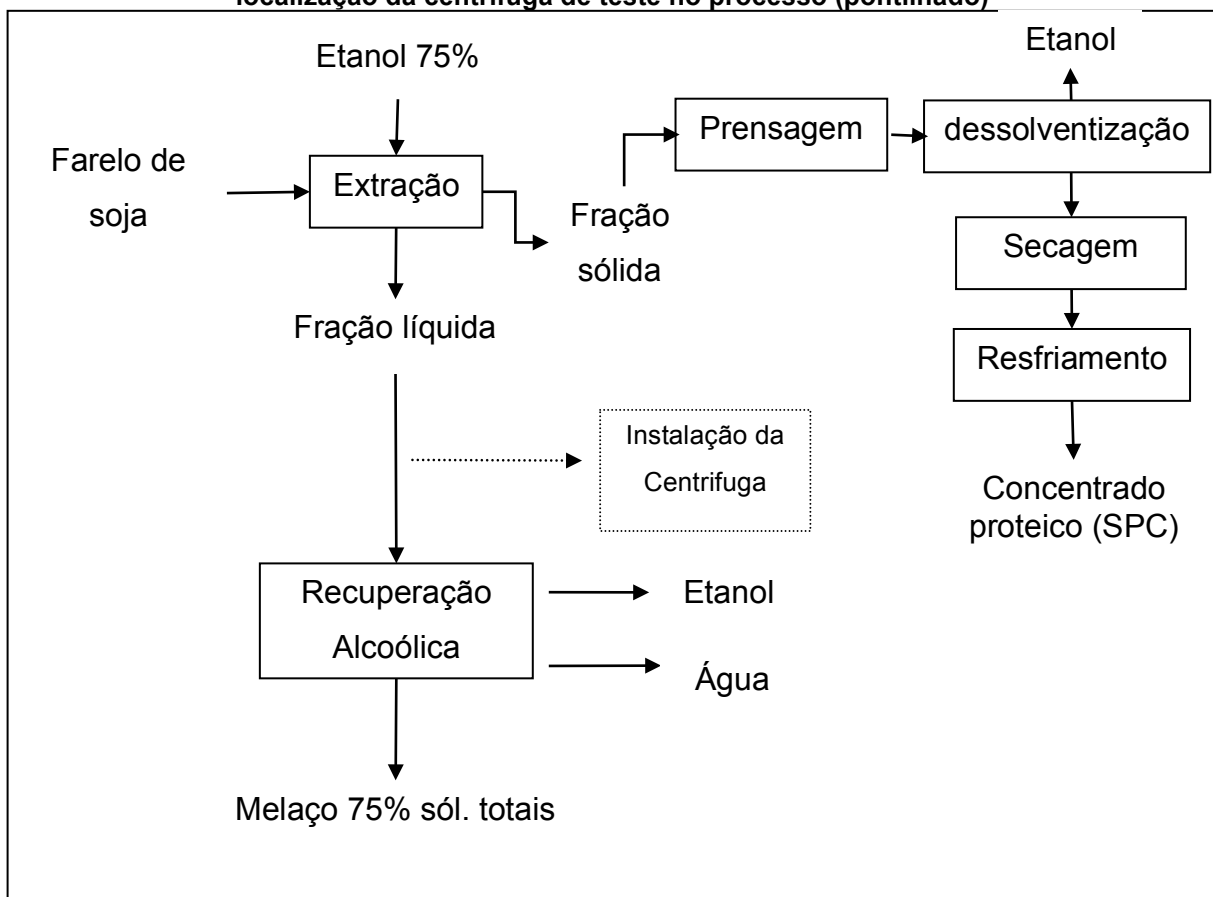
Uma centrífuga industrial foi instalada (Figura 16) para se avaliar a separação de fosfolipídios da micela alcoólica do processo de produção de concentrado proteico. Devido à alta concentração de solvente inflamável, utilizou-se um sistema de inertização por nitrogênio para diminuir o risco de explosão.

Figura 16 - Centrífuga utilizada durante a execução dos ensaios industriais



Fonte: Acervo Próprio

Figura 17 - Esquema do funcionamento da fábrica de concentrado proteico de soja (SPC) e localização da centrífuga de teste no processo (pontilhado)



Fonte: Acervo Próprio

O diagrama de blocos da Figura 17 apresenta de forma simplificada a posição onde foi inserida a centrífuga, após a etapa de extração da fábrica de produção de concentrado proteico de soja (SPC).

A micela foi enviada para a centrífuga através de uma bomba centrífuga durante sete dias, 24 horas por dia, sendo que ensaios industriais foram programados em um período de estabilidade da planta industrial, tanto em condições operacionais quanto de limpeza e manutenção, colaborando com a linearidade do processo.

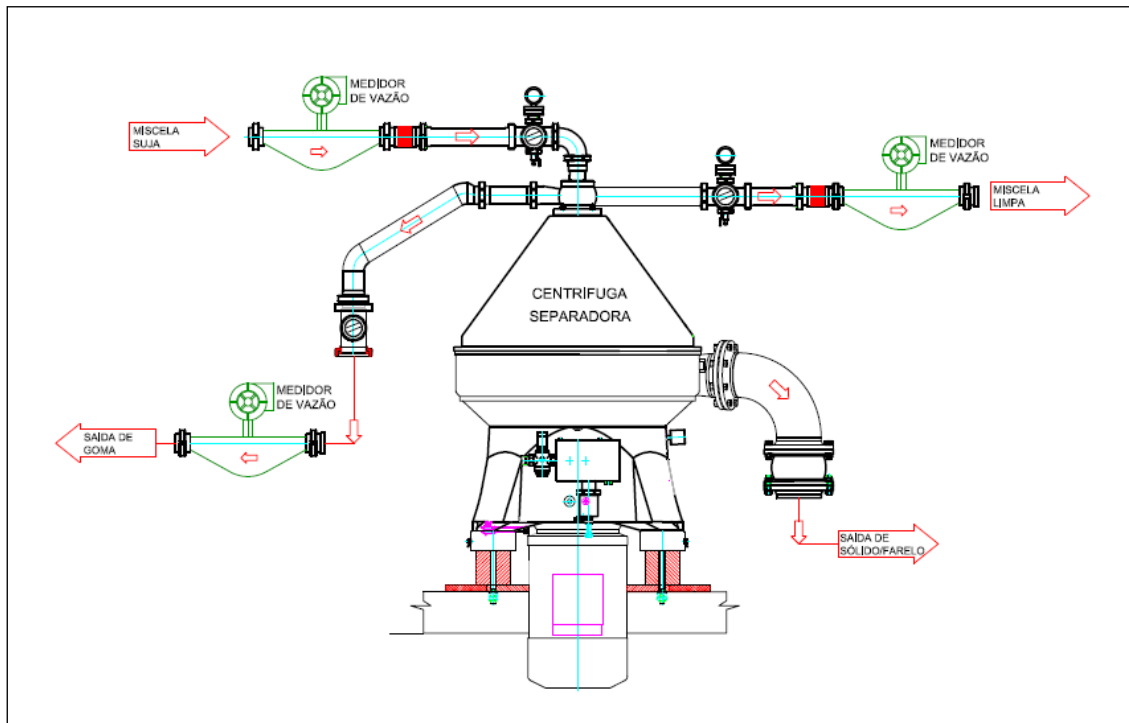
Para avaliação da recuperação de goma com a centrífuga de teste industrial, foram utilizadas duas abordagens. Na primeira, as medidas das vazões mássicas do processo possibilitaram a determinação de rendimentos do processo. Utilizou-se ainda uma abordagem de checagem em laboratório, pelo recolhimento de amostras do processo industrial (entrada e saída da centrífuga), centrifugação em centrífuga de bancada e determinação do rendimento relativo da centrífuga industrial.

A estimativa do teor de fosfolipídios das amostras foi realizada pela determinação do teor de insolúveis em acetona. Essa medida foi utilizada nesse ensaio em particular pela elevada quantidade de amostras, bem como por ser a linguagem empregada industrialmente para representar o teor de fosfolipídios de um material.

As quantificações foram realizadas por meio de medidores de vazão mássicos estrategicamente instalados no sistema. Com isso, a quantidade de goma produzida diariamente era conhecida permitindo posteriormente os cálculos de balanço de massa. A Figura 18 ilustra a localização de alguns desses medidores de vazão. Os seguintes dados também foram coletados: massa de goma na saída da centrífuga (kg), de micela na entrada da centrífuga (kg) e de farelo desengordurado na alimentação da SPC (kg). As amostras de micela retiradas na entrada e na saída da centrífuga industrial foram homogeneizadas, fracionadas em porções de aproximadamente 200 gramas e submetidas à centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 20°C, em centrífuga de bancada. A goma precipitada após centrifugação em laboratório teve sua massa determinada, e os percentuais de goma na entrada e na saída foram determinados em relação à massa total de micela centrifugada. A goma residual foi determinada por diferença. Com esses valores, calculou-se o

rendimento da centrífuga industrial relativo a centrífuga de bancada (goma residual/goma de entrada).

**Figura 18 - Ilustração da localização dos medidores de vazão utilizados para o balanço de massa da centrifugação industrial**



Fonte: Acervo Próprio

Amostras de goma úmida recuperada foram coletadas com um intervalo de coleta de amostra e dados de 2 horas, também 24 horas por dia, realizando-se, na sequência, as análises de caracterização físico-químicas de: insolúveis em acetona, umidade e impurezas. Neste ensaio industrial a estimativa do teor de fosfolipídios das amostras foi realizada pela determinação do teor de insolúveis em acetona. Essa medida foi utilizada nesse ensaio pela quantidade elevada de amostras.

Ao final do período do ensaio, uma fração da goma foi separada para secagem, avaliação da qualidade e avaliação por clientes (4.4.2), e uma amostra de aproximadamente um metro cúbico de goma úmida foi armazenada em recipiente fechado (IBC) para testes de secagem piloto (descritos em 4.4.3).

#### **4.4.2 Produção De Amostra E Avaliação De Clientes**

Amostras de goma úmida provenientes da centrifugação (4.4.1) foram secas em sistema de rotoevaporação piloto e analisadas em relação a: odor, cor, aroma, aspecto, umidade, insolúveis em acetona, insolúveis em hexano, índice de acidez, valor de peróxido, viscosidade, ferro, além de análises microbiológicas, conforme metodologias descritas em 4.1. Após a verificação da qualidade da lecitina final obtida, uma amostra do material foi enviada para o cliente (Kraft Foods Alemanha).

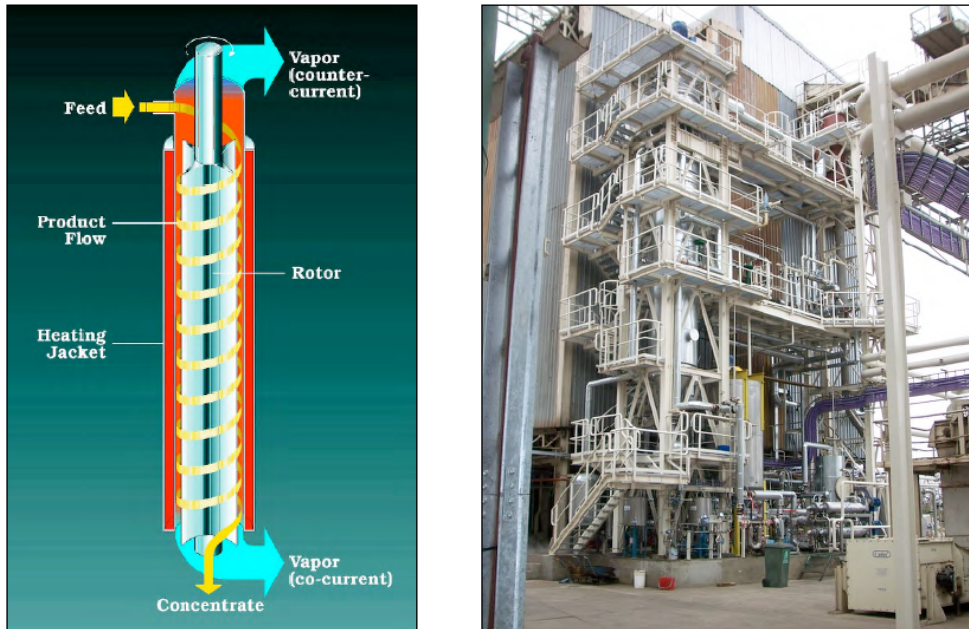
A Kraft avaliou o perfil de fosfolipídios da lecitina recebida, bem como conduziu testes para introduzir a lecitina em seus produtos (chocolate Milka e Milka Branco). Para os testes a lecitina fornecida foi comparada a uma lecitina padrão empregada pela Kraft. A avaliação foi realizada pela viscosidade (viscosímetro KJS750, taxa da rampa de cisalhamento controlada). Duas abordagens foram utilizadas. Na primeira, a lecitina usual foi substituída pela nova lecitina na proporção 1:1. Na segunda abordagem o nível ótimo foi determinado pela mistura simultânea dos flocos, da gordura, da pasta de avelãs e do surfactante (ou, no caso do chocolate branco, somente a gordura e o surfactante), por 10 min a 50°C e 150 rpm. Os produtos (chocolate) produzidos com a nova lecitina também foram avaliados sensorialmente pela empresa CP- Lörrach.

#### **4.4.3 Teste De Secagem Piloto**

Um teste de secagem com a goma separada pela centrífuga no teste industrial foi realizado com o objetivo de verificar a eficácia da secagem de forma contínua em condições piloto e a qualidade da lecitina final obtida. Para isso, as condições de operação do secador (pressão de vapor e temperatura) foram variadas de forma a avaliar seu impacto sobre a qualidade da lecitina, em especial a cor e a umidade. Realizou-se um ensaio de secagem da goma úmida em um secador piloto contínuo de película delgada de lecitina (Figura 19). , sendo este escolhido por apresentar vantagens como altas capacidades, bons resultados (produto com cor satisfatória e baixa umidade), baixa necessidade de supervisão e poucos picos de uso de utilidades (como vapor e eletricidade). Para a realização do teste, aproximadamente um metro cúbico de goma (oriundo do teste de remoção de goma

por meio de centrífuga industrial: Figura 20) foi enviado ao centro de teste. Nessa goma foi realizada, em uma etapa anterior, a adição de óleo refinado e ácido graxo suficiente para que o produto final, após a secagem, atendesse às especificações em relação ao teor de insolúveis em acetona (62%) e índice de acidez (30%).

**Figura 19 - Representação esquemática do evaporador vertical (esquerda), e evaporador vertical (direita).**



Fonte: Acervo Próprio

**Figura 20 - Amostra de uma tonelada de goma enviada.**



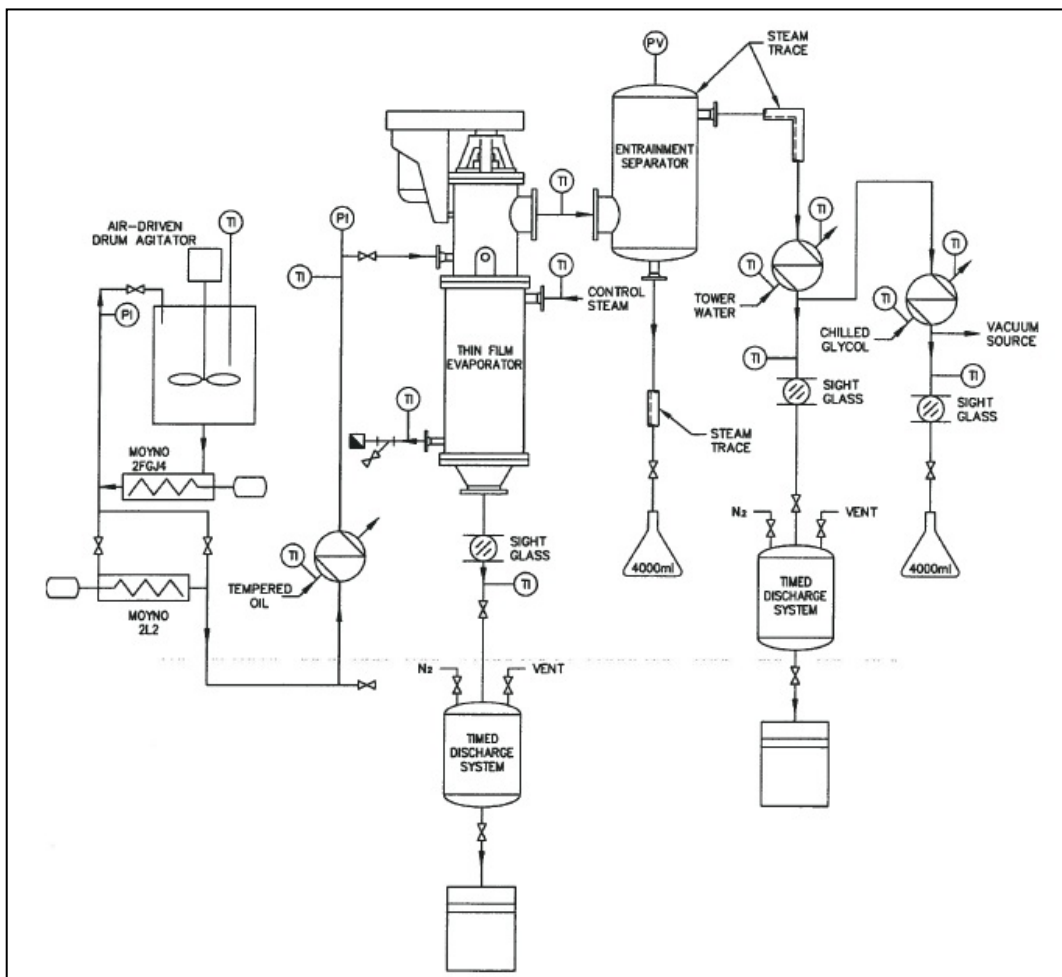
Fonte: Acervo Próprio

O sistema do teste era composto por duas bombas de deslocamento positivo: a primeira responsável pela recirculação do material dentro do “IBC” e a

segunda pela alimentação do secador. A goma foi bombeada para um pré-aquecedor a vapor e então encaminhada para o secador. O secador era aquecido com vapor. Nesse sistema, o fluxo de vapor ocorria em contracorrente com o fluido, e três frações foram obtidas: o concentrado (lecitina seca), o primeiro e o segundo destilado. A Figura 21 mostra o fluxograma do evaporador e equipamentos acessórios usados na secagem de lecitina.

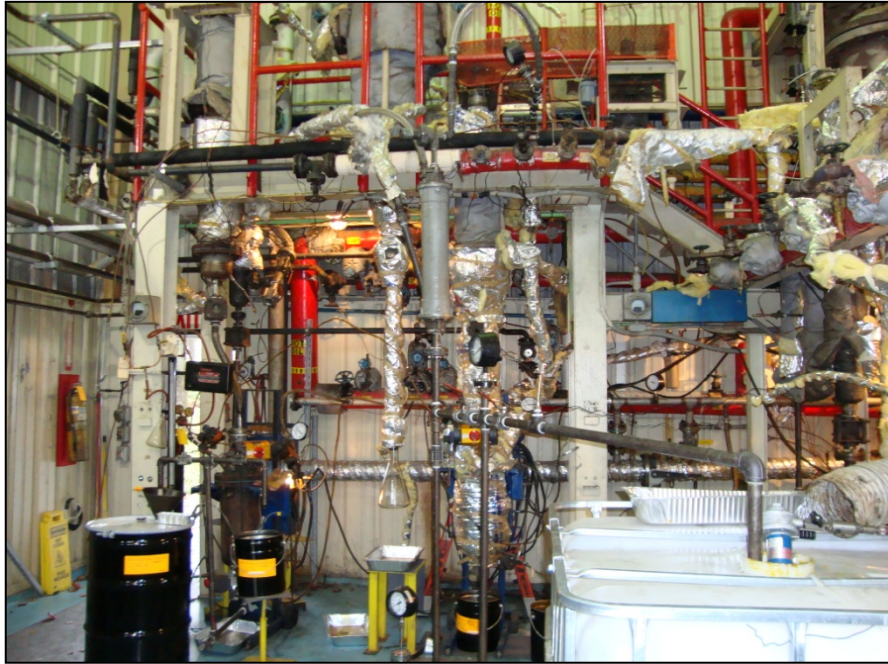
Foi possível monitorar a influência da temperatura da corrente de alimentação do secador, a temperatura de saída da lecitina do secador, pressão de vapor, e vazão de alimentação sobre a qualidade do produto final obtido. Durante a realização do teste, quando um parâmetro era modificado, aguardava-se a estabilidade da planta, e fazia-se a coleta de uma ou mais amostras. As amostras foram armazenadas para análises de umidade, cor e conteúdo de fosfolípidos, conforme descrito em 4.1.

**Figura 21 - Fluxograma do evaporador e equipamentos acessórios usados na secagem de**



Fonte: Acervo Próprio

**Figura 22 - Visão geral do sistema piloto**



Fonte: Acervo Próprio



## **5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE FOSFOLIPÍDIOS**

O estudo da recuperação dos fosfolipídios residuais no farelo de soja desengordurado requeria quantificação de fosfolipídios. Amostras de farelos enviadas para análise no exterior mostraram resultados divergentes, oriundos de diferentes métodos de extração dos fosfolipídios da matriz sólida e diferentes métodos de análises, indicando, pois, a necessidade do estudo de um método de extração dos fosfolipídios do farelo e validação de um método de quantificação do extrato obtido para uso neste estudo. Dentre os pesquisados na literatura, o método cromatográfico mostrou-se ser o mais indicado para a quantificação de fosfolipídios e foi então estudado em detalhes, conforme descrito no Capítulo 4.2.1.

A quantificação de fosfolipídios para matrizes sólidas (farelo desengordurado e soja), requeria inicialmente extração destes. Não há no Brasil laboratórios habilitados para realizar essa quantificação e os resultados obtidos das análises no exterior são divergentes no Brasil. Uma vez que não existe metodologia oficial para avaliar a quantidade de fosfolipídios em matrizes sólidas (farelo desengordurado e soja), foram estudadas e descritas no Cap.4.2.2, diversas metodologias para extração dos fosfolipídios do farelo de soja desengordurado e da soja inteira. O método selecionado foi utilizado para obtenção dos extratos analisados pelo método cromatográfico desenvolvido e validado conforme descrito no Cap.4.2.1.

Os resultados obtidos no desenvolvimento e validação de um método cromatográfico para detecção de fosfolipídios em lecitina estão descritos em 5.1.1. Os resultados do estudo de extração para determinação do método mais adequado para obtenção dos extratos de fosfolipídios da soja e do farelo desengordurado (matrizes sólidas estão descritos em 5.1.2..

#### **5.1.1 Validação De Método Cromatográfico De Perfil De Fosfolipídios**

Durante o período de desenvolvimento do método foram avaliadas diferentes misturas de solventes para a fase móvel, gradientes e fluxo de eluição, diferentes fases estacionárias e temperatura do forno de coluna. O método descrito

no item 4.2.1. foi o que apresentou a melhor separação dos fosfolipídios e reprodutibilidade durante o período de testes, tendo sido, por esse motivo, o método escolhido para validação.

A validação do método teve como objetivo confirmar, através de experimentos definidos e cálculos estatísticos, que o método cromatográfico proposto tem capacidade de desempenho consistente em sua aplicação. A validação foi confirmada após a comprovação do desempenho do método por meio dos parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

#### 5.1.1.1 Seletividade

A seletividade do método para os fosfolipídios majoritários foi avaliada através da comparação entre os coeficientes angulares obtidos entre as curvas analíticas do padrão e amostra fortificada. Como critério de resultado, é desejável um desvio padrão relativo (DPR) inferior 5% entre os coeficientes angulares obtidos com as duas curvas analíticas. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram os valores de DPR entre os coeficientes angulares das soluções padrão e das amostras fortificadas inferiores a 3.5 %. Essa baixa dispersão do coeficiente angular indica que a matriz tem pouca interferência na quantificação dos fosfolipídios majoritários, ou seja, o método é seletivo.

**Tabela 5 - Avaliação da seletividade.**

<b>Analito</b>	<b>Média Coeficiente Angular Padrão</b>	<b>Média Coeficiente Angular Fortificado</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
PA	1654.8	1715.4	1685.1	42.85	2.54
PE	2239.8	2182	2210.9	40.87	1.85
PI	1070	1124	1097	38.18	3.48
PC	1675.9	1606.5	1641.2	49.07	2.99

DPR – desvio padrão relativo PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

#### 5.1.1.2 Linearidade

O estudo da linearidade foi realizado para os fosfolipídios dentro da faixa de sensibilidade do detector e espalhamento de luz que variou de 0.25 mg/mL a 7.5 mg/mL para os fosfolipídios testados. Os dados de concentração e de

unidades de área de cada fosfolípido foram usados para determinação da equação da reta e o coeficiente de correlação, conforme indicado na Tabela 6. Os valores do coeficiente de correlação dos fosfolípidos avaliados apresentaram-se adequados, indicando a linearidade do método para cada um dos fosfolípidos dentro da faixa de concentração avaliada.

**Tabela 6 - Linearidade dos Fosfolípidos dentro da faixa estudada.**

Analito	Faixa	Equação de reta	Coef. de Correlação
PE	0.5 a 7.5 mg/mL	$y = 2185,2x - 1694,4$	0,9935
PA	0.25 a 7.5 mg/mL	$y = 1608,1x - 959,8$	0,9938
PS	0.25 a 3.5 mg/mL	$y = 504,1x - 350,1$	0,9951
PG	0.25 a 3.0 mg/mL	$y = 565,3x - 226,4$	0,9932
PI	0.5 a 7.5 mg/mL	$y = 1248,4x - 740,7$	0,9989
PC	0.5 a 7.5 mg/mL	$y = 1603,5x - 621,9$	0,9995

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

### 5.1.1.3 Precisão

As variações obtidas para os diferentes fosfolípidos, majoritários nos três diferentes níveis de concentração, estão apresentados na Tabela 7. De acordo com os valores apresentados, não houve DPR maiores que 5% tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária e sendo assim o método foi considerado preciso. Os valores de limite de repetibilidade e de precisão intermediária estão descritos na tabela 7. Esses valores não são usados como critério de aceitação dos ensaios de precisão, mas sim, como limites máximos aceitos durante uma análise do produto feita em triplicatas.

**Tabela 7 - Precisão dos Fosfolípidos dentro da faixa estudada.**

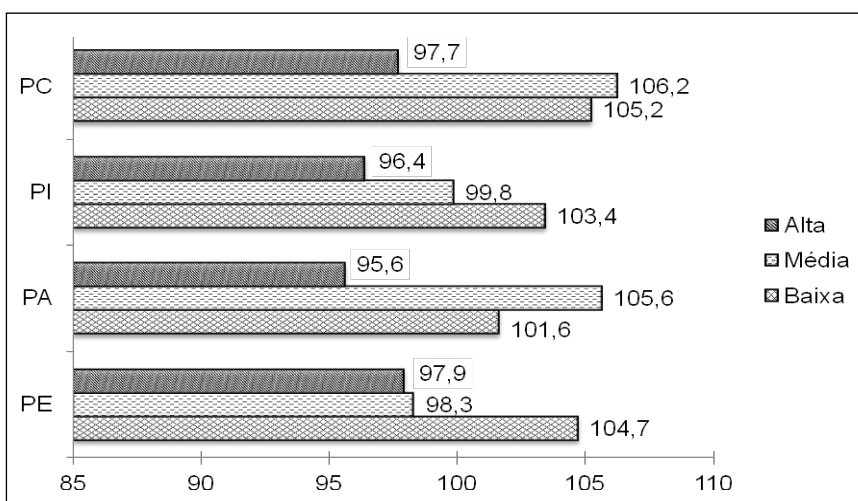
Nível	Precisão					
	Repetibilidade			Precisão Intermediária		
	Analito	DPR	R	Analito	DPR	R
Baixo	PE	3.04	3.16	PE	3.60	3.72
	PA	3.40	27.44	PA	3.45	27.94
	PI	3.18	43.88	PI	3.08	44.60
	PC	3.05	47.91	PC	3.27	48.97
Médio	PE	3.72	53.17	PE	4.55	63.56
	PA	3.58	334.4	PA	3.15	292.29
	PI	2.25	113.3	PI	2.45	260.12
	PC	0.75	312.2	PC	1.70	333.68
Alto	PE	0.74	22.0	PE	3.87	113.43
	PA	0.20	34.5	PA	2.46	424.23
	PI	0.83	278.5	PI	2.63	825.27
	PC	0.97	221.6	PC	2.96	693.90

DPR – desvio padrão relativo; r- ; R- ; PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

#### 5.1.1.4 Exatidão

Os resultados de exatidão calculados pela recuperação de fosfolipídios na Lecitina estão descritos na Figura 23. Os valores de recuperação no ensaio variou de 95,58 a 106,22% para os fosfolipídios em todos os níveis de concentração. Essa variação, de aproximadamente 10%, foi considerada adequada ao tipo de matriz (lecitina), considerando-se ainda uso da técnica de fase normal com detecção ELSD, a qual apresenta uma variação constitucional maior que os demais detectores.

**Figura 23 - Valores de Recuperação dos Fosfolipídios**



PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

#### 5.1.1.5 Robustez

Os resultados obtidos através do ensaio de robustez encontram-se descritos nas Tabelas 8 a 13. Foram variados o fluxo, a temperatura do forno e a proporção da fase B (ver 4.2.1.). De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 8 a 13, podemos afirmar, com 95 % de confiança, que a variação testada para o fluxo não alterou significativamente os resultados do método para os analitos avaliados. A redução da temperatura do forno de colunas também não alterou os resultados, mas o aumento de temperatura alterou o resultado de forma significativa, embora exclusivamente para o PE. A adição ou redução de porcentagem de fase móvel B apresentou alterações significativas para os analitos testados.

**Tabela 8 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolípidios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com o aumento da temperatura do forno.**

<b>Aumento da temperatura do forno (45 °C)</b>			
<b>Analitos</b>	<b>Área nominal a 40 °C</b>	<b>Área nominal a 45 °C</b>	<b>Valor de <math>p</math> para Teste T</b>
PE	9578.93	8761.78	4.59
PA	4736.48	4469.73	2.90
PI	9605.85	9547.88	0.51
PC	13600.58	13715.28	-0.63

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

**Tabela 9 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolípidios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com a redução da temperatura do forno.**

<b>Redução de temperatura (35 °C)</b>			
<b>Analitos</b>	<b>Área nominal a 40 °C</b>	<b>Área nominal a 35 °C</b>	<b>Valor de <math>p</math> para Teste T</b>
PE	9578.93	9354.83	0.67
PA	4736.48	4652.83	0.50
PI	9605.85	9528.1	0.28
PC	13600.58	13884.2	-1.20

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

**Tabela 10 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolípidios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com o aumento de ácido (Fase B) na fase móvel.**

<b>Aumento de Fase B na fase móvel</b>			
<b>Analitos</b>	<b>Área nominal 2 % Fase B</b>	<b>Área nominal 3 % Fase B</b>	<b>Valor de <math>p</math> para Teste T</b>
PE	9578.93	9422.13	0.61
PA	4736.48	4527.18	1.46
PI	9605.85	8997.95	3.32
PC	13600.58	12545.00	5.56

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

**Tabela 11 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com a redução de ácido (Fase B) na fase móvel.**

Redução de Fase B na fase móvel			
Analitos	Área nominal 2 % Fase B	Área nominal 1 % Fase B	Valor de $p$ para Teste T
PE	9578.93	9059.65	1.96
PA	4736.48	4470.475	1.81
PI	9605.85	9380.875	0.99
PC	13600.58	12863.6	3.61

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

**Tabela 12 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com o aumento de fluxo.**

Aumento de fluxo (Fluxo 0.42 mL/min)			
Analitos	Área nominal fluxo 0.4 mL/min	Área nominal fluxo 0.42 mL/min	Valor de $p$ para Teste T
PE	8378.03	8173.3	1.02
PA	4010.41	3864.325	1.20
PI	8549.56	8491.4	0.33
PC	12232.70	12011.20	0.91

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

**Tabela 13 - Resultados comparativos entre as áreas obtidas por detecção ESLV para as mesmas amostras de fosfolipídios operando-se com o método CLAE nominal e as obtidas com a redução do fluxo.**

Redução do fluxo (Fluxo 0.38 mL/min)			
Analitos	Área nominal fluxo 0.4 mL/min	Área nominal fluxo 0.38 mL/min	Valor de $p$ para Teste T
PE	8378.03	8286.675	0.46
PA	4010.41	3900.425	1.04
PI	8549.56	8458.375	0.56
PC	12232.70	11841.35	1.39

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

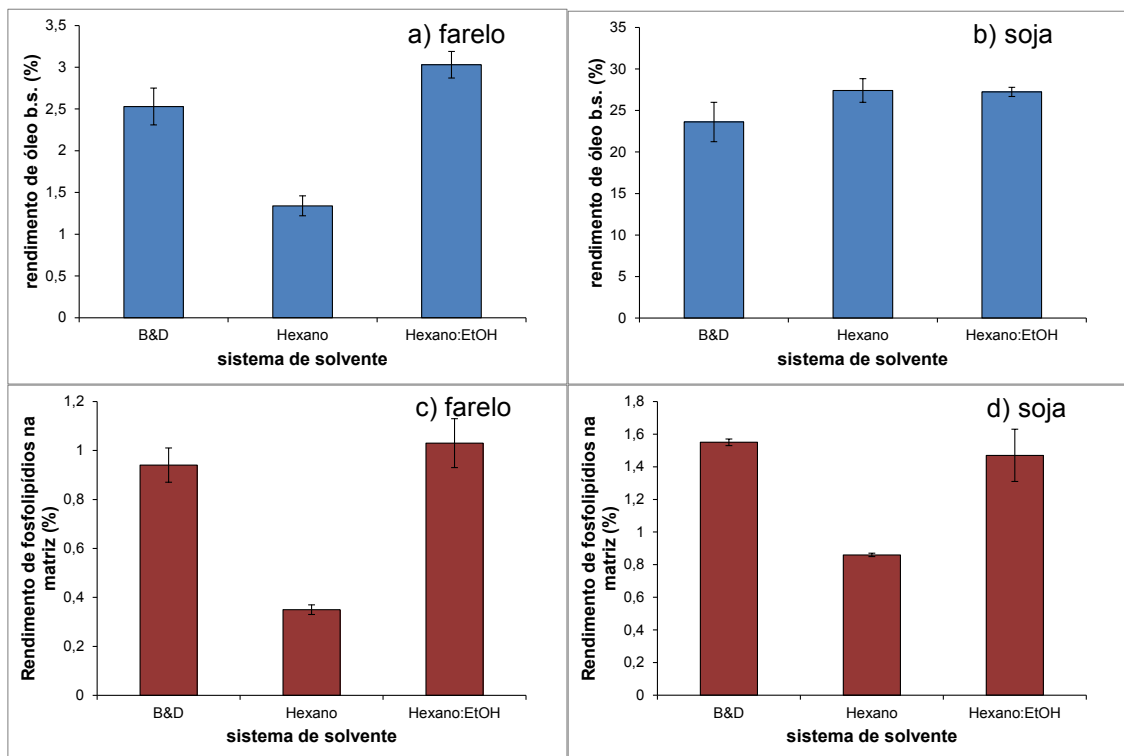
O presente método demonstrou-se seletivo, linear, preciso e exato dentro da faixa de concentração avaliada para a lecitina de soja. Além disso, o método demonstrou-se robusto frente a modificações de temperatura e fluxo avaliados. O único parâmetro que se demonstrou crítico foi a porcentagem de fase móvel B, o qual deve se ter muito critério ao prepará-la, para evitar que os resultados sofram alterações significativas.

### 5.1.2 Estudo Da Quantificação De Fosfolipídios Em Matrizes Sólidas

O estudo da extração de fosfolipídios no farelo desengordurado e na soja bruta foi iniciado testando-se como solvente uma mistura de hexano: etanol (em Soxhlet) e pelo método de Bligh e Dyer (1959), descrito em detalhes na Figura 15. O teste foi realizado com o objetivo de selecionar o melhor sistema para preparo de amostras para determinação do perfil de fosfolipídios por cromatografia (5.2).

O método de B&D é indicado pela literatura para a extração de fosfolipídios de diversas amostras. A extração com hexano: etanol também é indicada por ser uma mistura de um solvente polar e um não-polar. Os resultados após a extração com esses solventes foram comparados estatisticamente através do teste de Turkey da diferença significativa (TSD) com intervalo de confiança de 95%, com a extração realizada na mesma matriz de amostra, utilizando hexano (usualmente empregado na indústria para extração de óleo da soja) em Soxhlet conforme Figura 24.

**Figura 24 - Rendimentos de extração de óleo (a, b) e fosfolipídios (c, d) para a soja (b, d) e o farelo desengordurado (a, c) por diferentes metodologias de extração.**



Como observado na Figura 24 a) , o rendimento de extração de óleo do farelo desengordurado foi superior significativamente quando se utilizou a mistura hexano: etanol (3,03%) do que empregando o método B&D (2,53%), ou hexano puro (1,54%). A comprovação dessa diferença é feita através do teste de Turkey (TSD), conforme a tabela 14 , indica que a hipótese de igualdade entre os solventes é rejeitada com 5% de significância entre a comparação dos três solventes de extração.

**Tabela 14 - Resultados Cálculo de Turkey da diferença significativa (TSD), para rendimento de extração de Fosfolipídios em Soja.**

Teste	Matriz	Níveis	Centro	N	K	Intervalo de Confiança	Turkey (TSD)
Rendimento de Óleo	Farelo	Hex-B&D	0,9905	3	9	95%	0,2913
		Hex:EtOH-B&D	0,4937				
		Hex:EtOH-Hex	1,4842				
	Soja	Hex-B&D	3,7999	3	9	95%	2,3624
		Hex:EtOH-B&D	3,6274				
		Hex:EtOH-Hex	0,1725				
Rendimento de fosfolipídios	Farelo	Hex-B&D	0,6751	3	9	95%	0,1059
		Hex:EtOH-B&D	0,0942				
		Hex:EtOH-Hex	0,7693				
	Soja	Hex-B&D	0,6892	3	9	95%	0,1343
		Hex:EtOH-B&D	0,0815				
		Hex:EtOH-Hex	0,6077				

Para a soja o rendimento de extração de óleo foi similar empregando os dois sistemas de solvente (hexano 27,41% e hexano: etanol 27,24%, conforme Figura 24 b), o sistema solvente B&D (23,61%) apresentou-se significativamente diferente dos demais. O teste de Turkey mostrou que aceitamos a hipótese de igualdade apenas para a comparação entre os solventes hexano e hexano: etanol, conforme a tabela 14.

Em relação à extração de fosfolipídios, os métodos de B&D e com hexano: etanol tiveram rendimentos de fosfolipídios similares, e superiores aos obtidos na extração com hexano, tanto empregando soja quanto farelo desengordurado (Figura 24 c/d).

Para a soja os rendimentos de extração de fosfolipídios foram:  $1,55 \pm 0,02\%$  (B&D),  $0,86 \pm 0,01\%$  (hexano) e  $1,47 \pm 0,16\%$  (hexano: etanol), conforme Figura 24d. Os resultados entre o B&D e hexano:etanol são estaticamente semelhantes e diferem do hexano. Conforme demonstrado na tabela 14, aceitamos



a hipótese de igualdade apenas para a comparação entre o sistema de extração hexano: etanol e B&D, as demais comparações rejeitam-se a hipótese de igualdade.

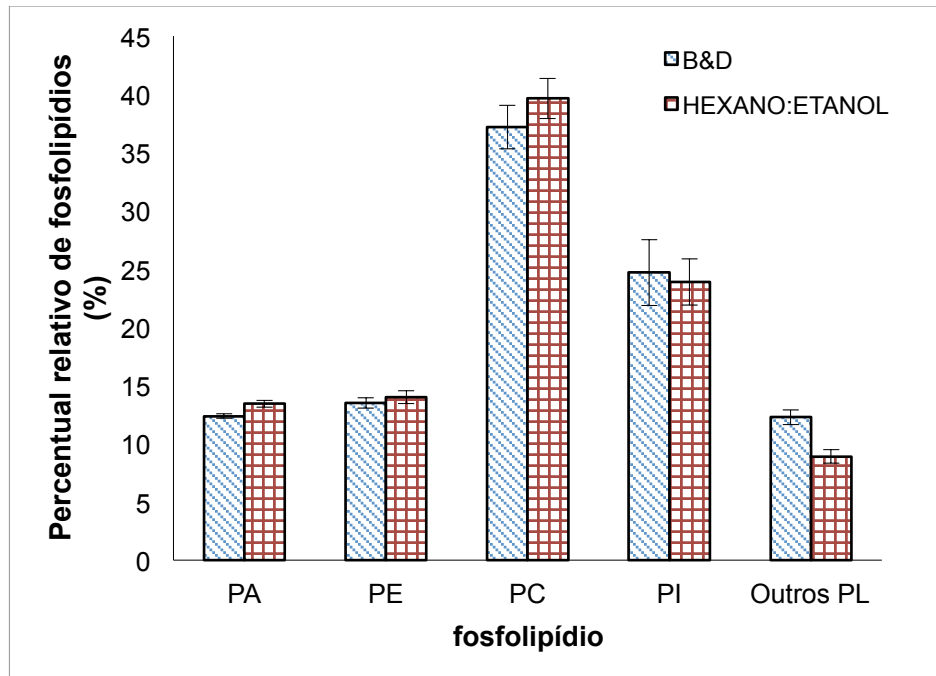
Para o farelo desengordurado, os rendimentos de extração de fosfolipídios foram:  $0,94 \pm 0,07\%$  (B&D),  $0,35 \pm 0,02\%$  (hexano) e  $1,03 \pm 0,10\%$  (hexano: etanol), conforme conforme Figura 24c. A comparação estatística por Turkey, tabela 14, mostrou que a hipótese de igualdade entre os solventes hexano:etanol e B&D é válida e a comparação entre os sistemas solventes com hexano rejeitamos a hipótese de igualdade, indicando que o rendimento da extração com hexano é diferente dos demais.

Ao contrário dos triacilgliceróis, que são componentes apolares de óleos e gorduras, os fosfolipídios apresentam polaridade, pois além das duas cadeias hidrofóbicas longas também possuem um grupo polar (VOLLHARDT e SCHORE, 2004; SACKHEIM e LEHMAN, 2001). A dissolução do soluto (fosfolipídios) no solvente é uma etapa necessária no processo de extração. Sendo assim, espera-se que sua extração seja menor em um solvente apolar como o hexano, e maior em sistemas de solvente com certa polaridade, como foi o ocorrido no ensaio.

A escolha do método mais adequado para extração de amostras e realização de análise por cromatografia depende de diversos fatores. O rendimento de extração foi considerado em primeiro lugar, sendo assim, a extração com hexano mostrou-se uma alternativa inadequada para esse caso. Em relação a outros fatores, a extração por B&D é uma extração mais rápida, no entanto, mais trabalhosa, pois envolve mais etapas. O método com hexano: etanol em Soxhlet é menos trabalhoso, mas a extração tem duração total de 24h, sendo portanto, mais demorada. Extrações com Soxhlet podem não ser favoráveis para o preparo de amostras, especificamente, já que as condições de aquecimento e tempo de extração podem prejudicar a qualidade da amostra por degradação ou alteração dos seus componentes (Brum *et al.* 2009). A fim de se verificar essa afirmação, os perfis de fosfolipídios das amostras extraídas pelos métodos de Soxhlet (hexano:etanol) e B&D foram comparados (Figura 25). Houve pouca variação no perfil de fosfolipídios quando se empregou os métodos de extração de B&D e com hexano:etanol (por Soxhlet), com exceção de PC, que apresentou um teor ligeiramente superior na amostra extraída com hexano: etanol. Os resultados indicaram, portanto, não haver

degradação e modificação aparente dos fosfolipídios ao se utilizar o método de Soxhlet nesse caso.

**Figura 25 - Perfil de fosfolipídios obtido pelos métodos de B&D e hexano: etanol para a soja e o farelo desengordurado**



PA: Ácido fosfatídico; PG: fosfatidilglicerina; PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; PI: fosfatidilinositol; Outros PL: Acetilfosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerina e lisofosfatidilcolina

Os resultados indicaram que tanto o método B&D quanto o método de extração com hexano: etanol em Soxhlet foram válidos para o preparo de amostras de soja e farelo desengordurado para a análise de fosfolipídios por cromatografia líquida de alta eficiência. O método de extração por hexano: etanol apresentou tendência de vantagem em teor de PC ( $39,65 \pm 1,73\%$ ) em relação ao método de B&D ( $37,17 \pm 1,87\%$ ). Contudo essa vantagem não é significativa, devido a variação dos resultados associado à medição.

Além dos fatores citados, também podem ser levadas em consideração na escolha do melhor método de extração para o preparo de amostras a toxicidade dos reagentes. Nesse caso, o método de B&D é desvantajoso por empregar clorofórmio e metanol, solventes mais tóxicos do que hexano e etanol.

## 5.2 TESTES LABORATORIAIS

### 5.2.1 Determinação Do Método De Extração De Fosfolipídios Do Farelo Desengordurado De Soja

Estudou-se em escala de laboratório a eficiência de extração de fosfolipídios remanescentes no farelo de soja após extração do óleo bruto da soja com hexano. Quatro diferentes sistemas de solventes foram comparados: hexano; hexano: etanol (4:1, v/v); clorofórmio: metanol (2:1, v/v); e solução aquosa de etanol a 75% (v/v), esse último sendo o solvente empregado industrialmente na extração do farelo desengordurado para produção de concentrado proteico de soja. As extrações foram realizadas em Soxhlet. O estudo teve como objetivo determinar o sistema de solventes que promove o maior rendimento de extração, além de compará-los com a extração com etanol 75% v/v.

Os resultados obtidos em 24 horas de extração com etanol 75%, hexano, etanol: hexano (4:1) e clorofórmio: metanol (2:1) estão mostrados na Tabela 15. Observou-se que os solventes com maiores capacidades de extração dos fosfolipídios do farelo de soja desengordurado foram o etanol 75% e a mistura hexano: etanol. Os rendimentos obtidos (expressos em massa de fosfolipídios por massa de farelo desengordurado seco) foram 1,48% para o etanol 75% e 1,44% para a mistura hexano: etanol, enquanto para o hexano, solvente usualmente empregado pelas empresas esmagadoras de soja, foi de 0,43%. Os resultados de rendimento mássico da extração indicam que tanto etanol 75% quanto a mistura hexano:etanol parecem ser igualmente satisfatórios para a extração do teor residual de fosfolipídios. Contudo, se analisarmos a composição dos extratos obtidos, verifica-se que com etanol 75% obteve-se 8,10% de fosfolipídios em relação à massa de extrato seco, enquanto o extrato obtido com a mistura hexano:etanol teve 40,61% (massa de fosfolipídios/massa de extrato seco). Essa diferença ocorre devido à extração conjunta de fosfolipídios e açúcares pelo solvente etanol 75%.

Conforme relatado por Brum *et al.* (2009), Nielsen (1960) e Hayes *et al.* (1973) todas as misturas contendo solventes polares foram superiores ao hexano na extração dos fosfolipídios. Para a extração de farelo desengordurado com hexano:etanol, os resultados obtidos foram superiores aos relatados previamente na

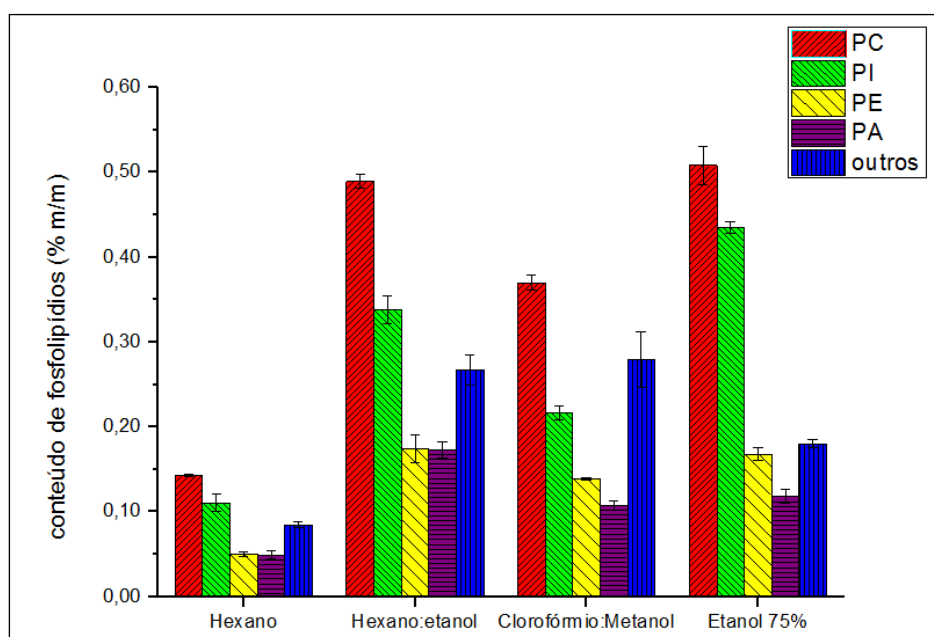
literatura: Nielsen (1960) obteve um rendimento de aproximadamente 0,5% ao empregar uma mistura de hexano:etanol 4:1.

**Tabela 15 - Rendimentos de extração de fosfolipídios obtidos para diferentes solventes com 24 horas de extração em Soxhlet.**

Solvente	Rendimento de fosfolipídios na matriz em % ( $\text{g}_{\text{fosfolipídio}}/\text{100 g}_{\text{farelo seco}}$ )	Teor de PL no extrato seco ( $\text{g}_{\text{fosfolipídio}}/\text{100 g}_{\text{extrato seco}}$ )
Hexano	0,43 $\pm$ 0,01	34,81 $\pm$ 1,45
Hexano:Etanol (4:1)	1,44 $\pm$ 0,03	40,61 $\pm$ 4,64
Clorofórmio: Metanol (2:1)	1,08 $\pm$ 0,07	22,05 $\pm$ 1,89
Etanol 75% (v/v)	1,48 $\pm$ 0,01	8,11 $\pm$ 0,11

A Figura 26 mostra uma comparação entre os rendimentos de extração de cada solvente para os quatro principais fosfolipídios (PC, PI, PE e PA) e para o somatório dos PLs minoritários. Para todos os solventes, a fosfatidilcolina (PC) foi o fosfolipídio majoritário, seguida do fosfatidilinositol (PI). As relações entre os teores de fosfolipídios de cada extrato foram muito similares, com exceção do etanol 75%, no qual se obteve maior extração de PI e menor extração de PA e dos PLs minoritários em relação aos fosfolipídios totais. O clorofórmio:metanol apresentou acentuada seletividade para os PLs minoritários.

**Figura 26 - Perfil de fosfolipídios obtido para cada solvente testado na extração de farelo desengordurado de soja.**



PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

Comparando-se o perfil de PLs dos extratos de etanol 75% e hexano:etanol (4:1), que tiveram eficiências de extração similares, observa-se que o etanol 75% extraiu seletivamente maiores quantidades de PI e menores quantidades de PA e PLs minoritários (Figura 26). Em contrapartida, o hexano:etanol teve menor eficiência de extração para o PI e maior para o PA e os PLs minoritários.

Considerando que os maiores rendimentos de extração foram obtidos para as misturas etanol: água e hexano:etanol e que os rendimentos de extração não foram os mesmos para alguns fosfolipídios, pode-se afirmar que nenhum dos solventes foi capaz de extrair 100% dos PLs existentes no farelo de soja desengordurado.

Analisando o teste na íntegra, observamos que apesar da pureza do extrato obtido com hexano: etanol ter sido muito superior em relação à do extrato com etanol 75%, o rendimento de extração foi similar para ambos. Portanto, ambos os sistemas de solventes se mostraram igualmente satisfatórios. Como a intenção desse trabalho foi viabilizar a produção simultânea de SPC e lecitina a partir do farelo desengordurado, optou-se por prosseguir os estudos com o etanol aquoso.

### **5.2.2 Otimização Do Processo De Extração**

O processo de extração de açúcares do farelo desengordurado de soja para produção de SPC (Concentrado Proteico de soja) foi mimetizado em escala de laboratório com o intuito de otimizar a extração de açúcares e fosfolipídios simultaneamente com a concentração de proteínas, variando-se o teor de etanol do solvente.

O objetivo do processo industrial de produção de SPC é obter um farelo concentrado, com o maior teor de proteína possível, e o maior rendimento em massa. Nesse processo, a proteína é concentrada pela remoção dos açúcares solúveis do farelo desengordurado de soja. Para isso emprega-se, industrialmente, uma concentração de etanol entre 60 até 75% (v/v). Os açúcares são solubilizados pela presença de água, enquanto que o etanol tem o papel de manter a proteína insolúvel, uma vez que esta também apresenta certa solubilidade e dispersibilidade em solução aquosa. Dentro dessa lógica, a extração de fosfolipídios para a micela foi monitorada em laboratório simultaneamente com o teor de proteína do farelo, visando atingir o melhor ponto de concentração de etanol possível para maximizar a extração de fosfolipídios sem prejudicar os rendimentos de SPC e teor proteico.

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos para os rendimentos de extração de fosfolipídios para a micela e o teor de proteína em base seca no farelo residual (SPC).

**Tabela 16 - Rendimentos das extrações de fosfolipídios e proteína com diferentes proporções de etanol: água.**

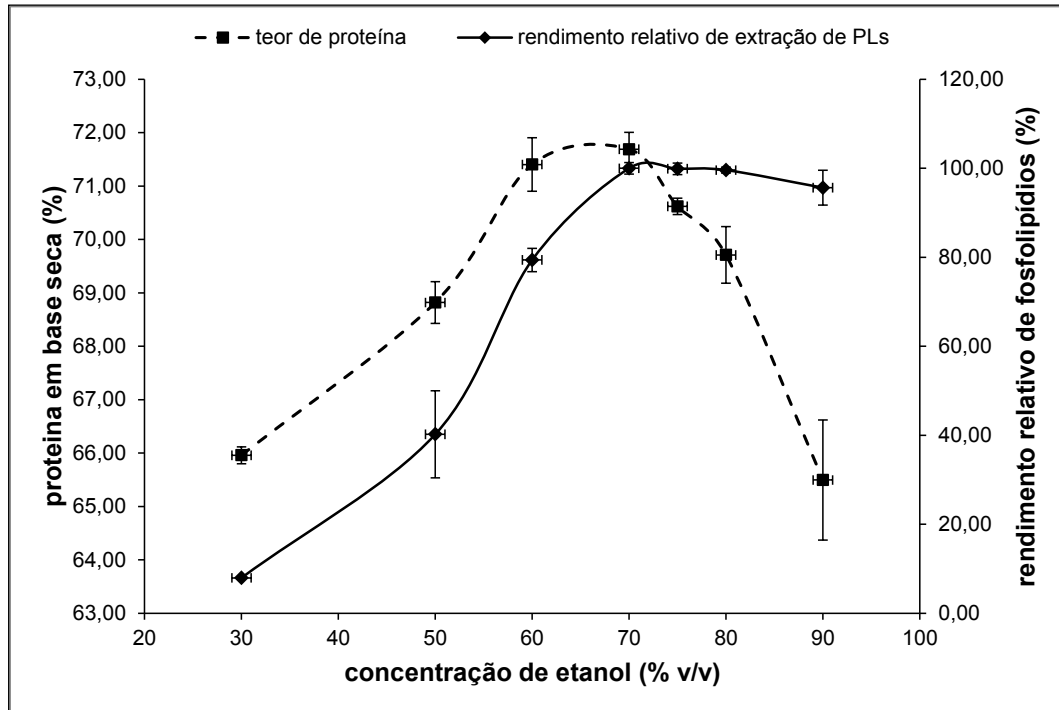
<b>Concentração de etanol</b>	<b>Rendimento de extração de fosfolipídios (% m/m)</b>	<b>Proteína em base seca no farelo residual da extração (% m/m)</b>
30%	0,12 ±0,00	65,96 ± 0,16
50%	0,61 ±0,15	68,82 ± 0,39
60%	1,21 ±0,04	71,40 ± 0,50
70%	1,53 ±0,02	71,69 ± 0,32
75%	1,53 ±0,02	70,62 ± 0,15
80%	1,52 ±0,01	69,71 ± 0,53
90%	1,46 ±0,06	65,50 ± 1,12

Como pode ser observado nos resultados da Tabela 16, a extração dos fosfolipídios totais do farelo de soja desengordurado foi aumentando conforme o aumento da proporção de etanol no solvente, com os melhores resultados obtidos entre 70 e 80% de etanol (v/v). Os valores dos rendimentos relativos de recuperação de fosfolipídios (considerando o valor de 1,53 g como 100% de recuperação) foram obtidos e colocados em gráfico juntamente com o valor da proteína recuperada, a fim de se obter o ponto ótimo de processo (Figura 27).

Segundo Haynes *et al.* (1973), quando a concentração do álcool é baixa, a eficiência de remoção de lipídios é reduzida, o que está de acordo com os resultados obtidos (Figura 27).

A Figura 27 mostra que o rendimento de extração de fosfolipídios aumentou com o aumento da concentração de etanol no sistema. Segundo Hayes *et al.* (1973) a quantidade de lipídios residuais no farelo pode estar entre 0,5 a 5% do seu peso seco, ou ser ainda maior, no entanto, os teores residuais obtidos pelos autores foram entre 1 e 3%. Melton *et al.* (1979) obtiveram rendimentos entre 1,6 e 4,5% de fosfolipídios residuais no farelo desengordurado. A forma de quantificação, no entanto, foi diferente entre os autores. O maior rendimento de extração de fosfolipídios obtido neste trabalho, em laboratório, utilizando etanol como solução de extração foi de 1,53 g/100g na condição de 70-75% v/v de etanol.

**Figura 27 - Recuperação de proteína (linha pontilhada) e rendimentos de extração de fosfolipídios (linha contínua) do farelo desengordurado de soja em função do teor de etanol no solvente de extração.**



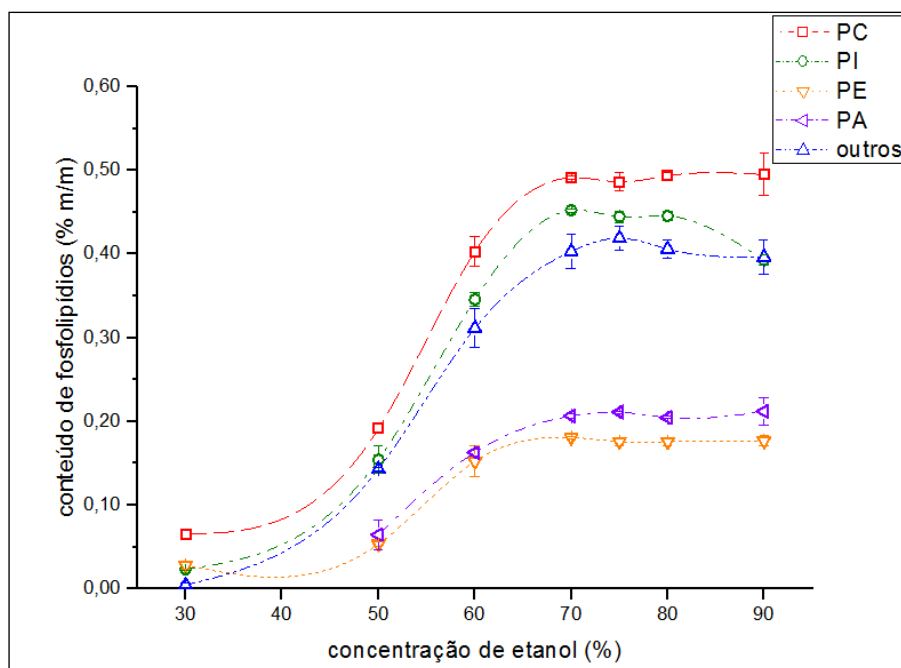
No processo industrial de produção de SPC, o teor de proteínas no farelo residual é o fator de importância fundamental. Seria desejável, portanto, obter a maior extração de fosfolipídios residuais possível, sem, no entanto, comprometer a de proteína do farelo. Observou-se um maior teor de proteínas no SPC, próximo de 72% em base seca, quando se utilizou uma concentração de etanol entre 60 e 70% v/v (Figura 27). Em valores baixos de concentração de etanol, assim como em valores elevados, o teor de proteínas no SPC foi menor, em torno de 66% para concentrações de etanol iguais a 30 e 90%.

Entre 70 e 75% de etanol, o conteúdo de fosfolipídios recuperado permaneceu constante, em torno de 1,53%, no entanto, o teor de proteínas do SPC foi reduzindo a partir de 75% de etanol, sendo assim, concluiu-se que a concentração ótima de etanol para um processo no qual se deseja obter SPC (farelo com teor elevado de proteínas) e micela contendo a maior quantidade de fosfolipídios possível, simultaneamente, seria em torno de 70% v/v.

A Figura 28 mostra os rendimentos das extrações dos fosfolipídios PC, PI, PE, PA e o somatório dos demais PLs com a variação da concentração de etanol. Foi possível verificar, observando os fosfolipídios isoladamente, que os fosfolipídios PC, PE, PA e somatório dos demais PLs apresentaram o mesmo

comportamento descrito em comparação com a soma total dos fosfolipídios (Figura 27), ou seja, atingiram o ponto máximo de extração quando o solvente apresentou uma concentração de 70%. Apenas o PI mostrou uma queda significativa quando a concentração alcoólica aumentou de 80 para 90%. Essa característica de PI, de menor solubilidade em teor de etanol elevado, vem de encontro ao observado previamente na literatura, por autores como Wu e Wang (2003).

**Figura 28 - Variação dos rendimentos nas extrações dos principais fosfolipídios em função do teor alcoólico. Resultados expressos em fosfolipídios por farelo desengordurado seco (g/100g)**



PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

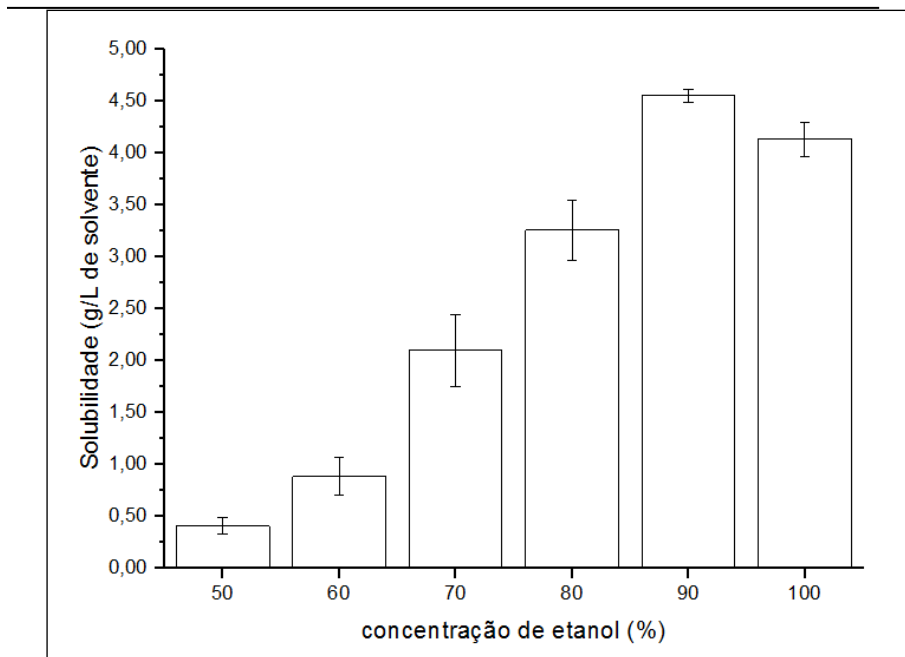
### 5.2.3 Avaliação Do Comportamento Dos Fosfolipídios Individuais Em Solução Etanólica

Por sua natureza lipídica, fosfolipídios não são solúveis em água, mas formam emulsões estáveis. A ocorrência deste fenômeno pode ser observada através da turbidez obtida nos ensaio com teor alcoólico inferior a 20% (v/v). A partir de 30% de etanol observou-se a presença de uma pequena quantidade de precipitado sólido após a centrifugação, mas o sobrenadante ainda se mostrava turvo. A partir de 50% foi possível verificar a presença de grande quantidade de material precipitado, com o sobrenadante se mostrando límpido, podendo-se afirmar que o material quantificado na fase líquida era realmente lecitina dissolvida. Nesta



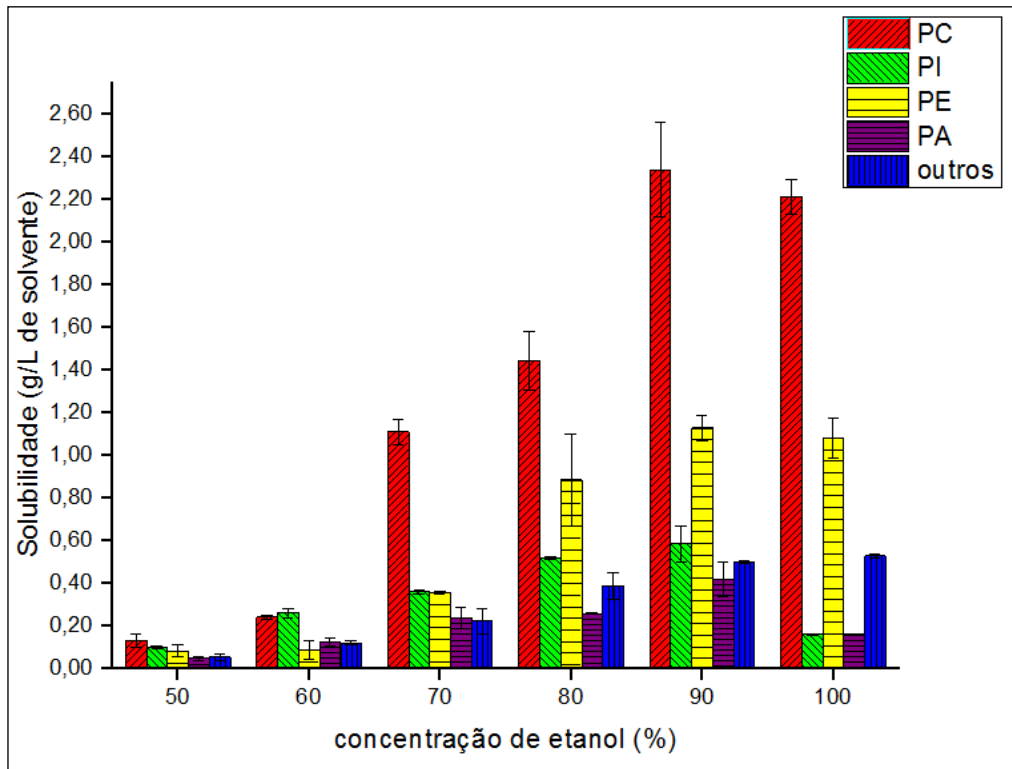
condição apenas 0,41 g/L de fosfolipídios, dos 7,03 g/L adicionados, foram encontrados em solução. A partir desse ponto, a solubilidade aumentou linearmente com a concentração de etanol na solução até atingir a máxima solubilidade em 90% de etanol: 4,93 g/L. Em solução de etanol anidro a solubilidade sofreu um decréscimo para 4,14 g/L (Figura 29).

**Figura 29 - Solubilidade dos fosfolipídios totais presentes na lecitina em pó em função da concentração alcoólica. Resultados expressos em gramas de fosfolipídios totais por litro de solvente.**



A Figura 30 mostra o perfil de solubilidade dos fosfolipídios individualmente. Nota-se que todos se comportaram de maneira semelhante, sendo a fosfatidilcolina (PC) a mais influenciada pelas alterações do teor alcoólico. Todos os fosfolipídios aumentaram a solubilidade com o aumento da concentração alcoólica, atingindo a solubilidade máxima em 90%. Em etanol anidro (99,3%) apenas as solubilidades do PI e do PA mostraram reduções significativas. O PC em etanol 90% e anidro foi totalmente solubilizado, ou seja, as 2,22 g/L adicionadas foram dissolvidas. Como tivemos 100% de solubilidade não conseguimos visualizar a concentração de saturação deste fosfolipídio. Wu e Wang (2003) utilizaram a propriedade dos fosfolipídios de apresentarem diferentes solubilidades em etanol para obter frações ricas em um ou outro fosfolipídio. Segundo os autores, PC é mais solúvel em etanol do que PI, possibilitando sua separação.

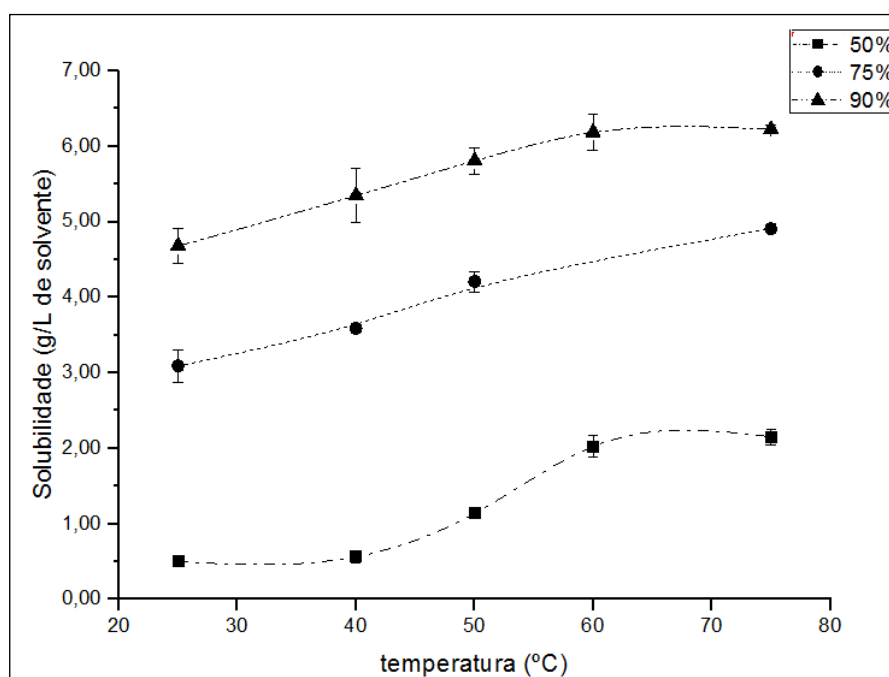
**Figura 30 - Perfil de solubilidade dos principais fosfolipídios em função do teor alcoólico.**



PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

A seguir, investigou-se a influência da temperatura na solubilidade dos fosfolipídios. Seleccionaram-se as concentrações de 50, 75 e 90% de etanol para avaliação do perfil de solubilidade a diferentes temperaturas. A Figura 31 indicou que, conforme esperado, a solubilidade dos fosfolipídios aumentou com o aumento da temperatura para as três concentrações de etanol testadas. A solubilidade mínima observada foi de 0,499 g/L, em 50% de etanol a 25°C, e máxima de 6,225 g/L em 90% de etanol a 75°C. Os resultados das concentrações de saturação dos fosfolipídios em diferentes teores alcoólicos e temperatura são mostrados na Tabela 17. As concentrações de saturação do PC não foram determinadas devido a total solubilidade deste em etanol 90%.

**Figura 31 - Solubilidades dos fosfolipídios totais em função da temperatura nas concentrações alcoólicas fixas de 50, 75 e 90%.**



**Tabela 17 - Concentrações de saturação dos quatro principais fosfolipídios em diferentes condições de teor alcoólico e temperatura.**

CONDIÇÃO	PC	PI	PE	PA	PLs TOTAIS	
50% (v/v)	25°C	0,147 ± 0,018	0,149 ± 0,001	0,088 ± 0,013	0,046 ± 0,026	0,499 ± 0,052
	40°C	0,155 ± 0,006	0,163 ± 0,019	0,102 ± 0,020	0,073 ± 0,013	0,564 ± 0,078
	50°C	0,366 ± 0,019	0,306 ± 0,000	0,188 ± 0,007	0,140 ± 0,007	1,137 ± 0,013
	60°C	0,669 ± 0,042	0,479 ± 0,019	0,461 ± 0,047	0,236 ± 0,012	2,024 ± 0,144
	75°C	0,739 ± 0,059	0,549 ± 0,035	0,421 ± 0,029	0,266 ± 0,027	2,153 ± 0,105
75% (v/v)	25°C	1,332 ± 0,117	0,497 ± 0,021	0,758 ± 0,035	0,288 ± 0,007	3,091 ± 0,215
	40°C	1,552 ± 0,031	0,591 ± 0,010	0,857 ± 0,003	0,337 ± 0,001	3,587 ± 0,018
	50°C	1,791 ± 0,047	0,670 ± 0,006	1,038 ± 0,029	0,384 ± 0,003	4,209 ± 0,135
	75°C	2,028 ± 0,006	0,817 ± 0,008	1,254 ± 0,018	0,421 ± 0,003	4,909 ± 0,031
90% (v/v)	25°C	-	0,556 ± 0,059	1,415 ± 0,056	0,381 ± 0,059	4,679 ± 0,236
	40°C	-	0,642 ± 0,182	1,501 ± 0,304	0,381 ± 0,060	5,348 ± 0,355
	50°C	-	0,802 ± 0,070	1,732 ± 0,038	0,417 ± 0,005	5,807 ± 0,177
	60°C	-	0,878 ± 0,056	1,885 ± 0,065	0,496 ± 0,002	6,183 ± 0,236
	75°C	-	0,978 ± 0,055	1,874 ± 0,010	0,505 ± 0,003	6,225 ± 0,059

PC- fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina PL- fosfolipídios

### **5.3 TESTES INDUSTRIAIS**

A partir dos resultados dos ensaios em escala de laboratório, foram elaborados estudos em escala piloto/industrial, a fim de se verificar a possibilidade real de recuperação de fosfolipídios da micela alcoólica proveniente do processo de extração do SPC. No teste, a recuperação dos fosfolipídios foi estudada com uma centrífuga industrial e os resultados dos ensaios são discutidos em 5.3.1. Em um segundo conjunto de experimentos, a goma do teste de centrifugação industrial foi seca em rotaevaporador e analisada em laboratório para avaliação de sua qualidade em relação a parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Após análise da qualidade da lecitina final obtida, amostras foram enviadas para cliente para avaliações rigorosas e aplicação da lecitina produzida em seus produtos (5.3.2). Por último, os fosfolipídios recuperados foram utilizados com o objetivo de se estabelecer condições de secagem em secador contínuo e as amostras de lecitina produzidas foram avaliadas quanto à cor e umidade (5.3.3).

#### **5.3.1 Teste Industrial De Recuperação**

Para avaliação da recuperação de goma com a centrífuga de teste industrial, foram utilizadas duas abordagens. Na primeira, as medidas das vazões mássicas do processo possibilitaram a determinação de rendimentos do processo. Utilizou-se ainda uma abordagem de checagem em laboratório, pelo recolhimento de amostras do processo industrial (entrada e saída da centrífuga), centrifugação em centrífuga de bancada e determinação do rendimento relativo da centrífuga industrial.

No ensaio industrial a estimativa do teor de fosfolipídios das amostras foi realizada pela determinação do teor de insolúveis em acetona. Essa medida foi utilizada nesse ensaio em particular pela elevada quantidade de amostras, bem como por ser a linguagem empregada industrialmente para representar o teor de fosfolipídios de um material. A lecitina comercial fluída apresenta um teor de insolúveis em acetona de 62%, o que em geral corresponde a um valor de 47% de fosfolipídios, quando determinados por método analítico.

A Tabela 18 apresenta os dados dos medidores de vazão de entrada de micela e saída de goma da centrífuga industrial, coletados a cada oito horas de

operação, bem como a quantidade de micela gerada durante a produção do SPC, umidade e voláteis da goma e insolúveis em acetona da goma, determinados em laboratório. Os valores de umidade e voláteis e insolúveis em acetona foram determinados para amostras coletadas a cada duas horas de operação, e os resultados são representados como médias de quatro amostras. A partir dos dados de micela, índice de insolúveis em acetona e umidade foram calculados os rendimentos do processo, apresentados em A.I./micela (Tabela 18). O teor de insolúveis em acetona do período foi calculado como a multiplicação entre o teor de insolúveis em acetona da micela e a quantidade de micela (em kg). O valor médio calculado para o rendimento em termos de A.I./micela foi 0,65 %. É importante considerar, para um futuro projeto industrial, que o rendimento de (A.I) insolúveis em acetona provenientes da micela pode oscilar por outras razões além das relacionadas ao processo, como a safra da soja, matéria-prima original, uma vez que a composição da mesma sofre alteração de acordo com as condições de solo, clima, etc.

O rendimento da centrífuga industrial foi estabelecido considerando-se como máximo o rendimento obtido em uma centrífuga de laboratório. As amostras de micela da entrada e da saída da centrífuga industrial foram centrifugadas na centrífuga de laboratório e o valor da goma retida foi obtido por diferença. Os resultados são apresentados na Tabela 19.

**Tabela 18 - Resultados do ensaio de centrifugação industrial e análises de umidade e voláteis da goma e teor de insolúveis em acetona da goma determinados em laboratório.**

Tempo (h)	Micela (kg)	Goma (kg)	Umidade e voláteis da goma (%)	A.I. da goma	A.I. no período (kg)	Rendimento A.I./micela (%)
8	148592	38	34,75 ± 1,15	56,45 ± 1,52	21,62	0,01
16	185189	1896	37,17 ± 3,18	54,13 ± 3,24	1.026,47	0,55
24	171700	2298	41,20 ± 0,89	50,3 ± 0,98	1.155,64	0,67
32	163611	1441	46,68 ± 8,26	45,95 ± 7,67	661,91	0,40
40	172200	2671	43,24 ± 2,27	49,31 ± 2,30	1.317,22	0,76
48	183928	3575	42,17 ± 2,38	50,47 ± 1,98	1.804,20	0,98
56	167784	2721	43,53 ± 0,23	49,84 ± 0,84	1.356,05	0,81
64	98888	2001	40,39 ± 2,43	52,53 ± 2,02	1.051,18	1,06
72	186204	2190	41,90 ± 3,15	52,07 ± 2,63	1.140,07	0,61
80	185396	2802	40,84 ± 0,54	52,5 ± 1,11	1.471,10	0,79
----		1145	37,35 ± 2,35	55,29 ± 1,74	632,79	----
96	177315	688	36,83 ± 3,17	55,58 ± 2,48	382,28	0,22
104	115945	1363	40,84 ± 0,54	51,62 ± 1,51	703,68	0,61
112	185250	1316	41,36 ± 4,43	50,67 ± 4,72	666,77	0,36
120	179490	1476	42,85 ± 0,74	50,06 ± 0,82	739,04	0,41
128	178656	2407	40,30 ± 6,41	52,84 ± 5,99	1.271,65	0,71
136	165054	2217	44,16 ± 2,49	49,68 ± 2,66	1.101,46	0,67
144	167200	3293	45,29 ± 3,26	46,86 ± 5,06	1.543,19	0,92
152	187100	2016	42,71 ± 1,10	50,33 ± 1,26	1.014,60	0,54
160	182650	2250	42,24 ± 3,27	51,34 ± 2,57	1.154,94	0,63
168	185050	2177	42,04 ± 1,03	51,32 ± 0,54	1.117,39	0,60
Valor médio:	170453	2097	41,55	51,13	1.065,58	0,65

A.I.: índice de insolúveis em acetona

A partir dos resultados da Tabela 19 foi possível estimar o rendimento da centrífuga industrial, em relação à centrífuga de laboratório, como sendo igual a  $79,24 \pm 5,35\%$ . A partir dos resultados das amostras obtidas no processo de centrifugação industrial (teor de insolúveis em acetona da goma e umidade, Tabela 19) foi possível calcular o valor de teor de insolúveis em acetona da goma em base seca (%) médio do processo, equivalente a  $85,53 \pm 1,25\%$ .

**Tabela 19 - Rendimento relativo da centrífuga industrial**

Tempo (h)	A.I. precipitado da micela de entrada (%)	A.I. precipitado da micela de saída (%)	A.I. retido (%)	Rendimento relativo da centrífuga industrial (%)
8	0,3572	0,0784	0,2788	78,06
16	0,4305	0,0630	0,3675	85,37
24	0,4061	0,0514	0,3547	87,34
32	0,4575	0,0617	0,3958	86,52
40	0,4241	0,0797	0,3444	81,21
48	0,4395	0,0861	0,3534	80,41
56	0,4986	0,0840	0,4146	83,16
64	0,4712	0,0891	0,3821	81,09
72	0,3778	0,0900	0,2878	76,19
80	0,4022	0,0938	0,3084	76,68
88	0,4086	0,0925	0,3161	77,36
96	0,5101	0,1760	0,3341	65,49
104	0,5294	0,1259	0,4035	76,21
112	0,3547	0,0912	0,2634	74,28
120	0,5050	0,0810	0,4241	83,97
128	0,3881	0,1208	0,2673	68,87
136	0,5363	0,1097	0,4266	79,55
144	0,5243	0,0959	0,4283	81,70
152	0,4690	0,0964	0,3727	79,45
160	0,4857	0,1041	0,3816	78,57
168	0,5770	0,1002	0,4767	82,63

A.I.: índice de insolúveis em acetona

A produção de goma do processo pôde ser acompanhada por um visor de linha instalado no processo, mostrado na Figura 32.

**Figura 32 - Visor de linha da saída de goma úmida do sistema de recuperação**

Fonte: Acervo Autor

### 5.3.2 Produção De Amostras E Avaliação De Clientes

A goma separada no teste de centrifugação industrial foi seca em rotaevaporador e analisada em laboratório para avaliação de sua qualidade em relação a parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Os resultados são apresentados na Tabela 20. Após análise da qualidade da lecitina final obtida, amostras (Figura 33) foram enviadas para cliente para avaliações rigorosas e aplicação da lecitina produzida em seus produtos.

**Tabela 20- Resultados analíticos das amostras**

PARÂMETROS	RESULTADOS	LIMITES	UNIDADES
Umidade	0,36	Max. 0,5	%
Insolúveis em acetona	62	Mín. 62	%
Insolúveis em hexano	0,04	Max. 0,1	%
Índice de acidez	28,35	Max. 30	%
Acidez	14,25	Max. 15	%
Cor Gardner (10% SOL.)	8	Max. 10	-
Valor de peróxido	0,8	Max. 3,00	meq/kg
Viscosidade a 25 °C	89	Max. 120	Poise
Ferro	14	Max. 100	Ppm
Salmonella sp.	Ausente/25g	Ausência em 25 g	Ausência/Presença/25 g
Coliformes fecais	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência em 1 g	Ausência/Presença/1 g
Coliformes totais	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência em 1 g	Ausência/Presença/1 g
Escherichia coli	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência em 1 g	Ausência/Presença/1 g
Enterobacteriaceae	Ausente/1g	Ausência em 1 g	Ausência/Presença/1 g
Bolores e Leveduras	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	100 UFC/ g Máximo	UFC/g

**Figura 33 - Amostra de Lecitina enviada para cliente**



Fonte: Acervo Autor



As análises físico-químicas realizadas demonstraram a qualidade do produto final obtido, que atendeu a todas as especificações (Tabela 20). Uma das propriedades físico-químicas que está relacionada diretamente com a qualidade de processamento do produto é a cor. A cor é um aspecto muito importante da qualidade da lecitina, uma vez que uma lecitina mais clara é mais bem aceita no mercado. Os clientes desejam uma lecitina de coloração mais clara e transparente, pois essa terá menos interferência no produto final (alimentos ou tinta). A especificação de cor para lecitina (escala de Gardner 10% sol.) é de no máximo 10. A lecitina tradicional em geral fica próxima da especificação (10). A lecitina produzida apresentou um valor igual a 8. O teor de ferro também tem importância, a especificação para lecitina é 100 ppm no máximo. A lecitina tradicional apresenta um valor de 50 ppm, em geral, enquanto que a nova lecitina apresentou um valor igual a 14 ppm (Tabela 20).

As amostras de lecitina produzidas a partir da extração do farelo desengordurado também foram analisadas por clientes. A Kraft Foods, uma empresa que utiliza lecitina em suas formulações, realizou testes com a nova lecitina produzida. Foi realizada uma comparação entre produto tradicional (padrão utilizado pela empresa) e o novo produto, análises sensoriais em produtos acabados (chocolates) e análises reológicas.

A lecitina foi avaliada em relação ao teor de fosfolipídios. A análise revelou que a nova lecitina apresentou um conteúdo maior de agentes surfactantes ativos, ou fosfolipídios, (~48%), em comparação com outras amostras analisadas pela empresa (~41%) e maior conteúdo de PC (~16%) e PI (~15%), em comparação com o padrão (~13% e ~10%, respectivamente). Tal resultado implica em uma lecitina com característica mais hidrofílica, o que se espera resultar em um produto mais funcional. As propriedades de interesse comercial da lecitina são oriundas dos fosfolipídios. Sendo assim, valor dos mesmos é de grande importância comercial. Dentro desses fosfolipídios, a fosfatidilcolina é o principal fosfolipídio da lecitina. Por estar diretamente relacionada com o poder emulsificante, bem como as propriedades nutricionais e funcionais, quanto mais alto o seu percentual, melhor é a lecitina.

Em relação à análise sensorial, a lecitina nova pura foi caracterizada por um aroma frutado, com tons de mel e azeite. Em relação à cor, observou-se coloração mais clara que a lecitina padrão. O MILKA com 0,7% da nova lecitina

apresentou aroma frutado picante, sem tons de azeite. O MILKA branco com 0,5% de lecitina nova apresentou aroma adocicado ou frutado.

De forma geral, os resultados obtidos pela Kraft Foods indicaram uma melhoria nas propriedades de escoamento, além de observações quanto à melhoria na cor, e maior funcionalidade devido a um maior caráter hidrofílico para a lecitina nova produzida em comparação com um padrão de lecitina empregado pela empresa.

### 5.3.3 Teste De Secagem Piloto E Avaliação De Amostras

Após o processo de centrifugação, a goma recuperada, armazenada em um IBC, foi destinada para secagem em um secador contínuo piloto de película delgada. Os resultados dos testes realizados são apresentados na Tabela 21..

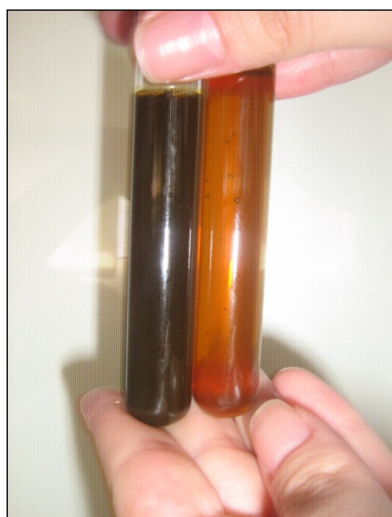
Durante o teste de secagem piloto foi possível monitorar a temperatura da corrente de alimentação do secador, a temperatura de saída da lecitina do secador, a pressão e temperatura de vapor, as vazões de alimentação e de saída tanto da lecitina como dos destilados. A pressão e temperatura de vapor e a vazão de alimentação foram variadas a fim de se verificar sua influência sobre a qualidade da lecitina obtida. A Tabela 21 mostra um resumo das condições de operação e também os resultados obtidos para o teor de umidade e cor na escala Gardner.

**Tabela 21 - Resumo condições de operação e umidade final da lecitina obtida**

AMOSTRA	VAZÃO DE ENTRADA (kg/h)	ENTRADA (°C)	SAÍDA (°C)	VAPOR (°C)	UMIDADE FINAL (%)	COR
B-1	38,1	18,6	68,0	141,2	<b>2,72</b>	-
B-2	44,0	19,4	84,2	157,5	<b>1,26</b>	-
B-3	42,4	19,8	85,7	174,1	<b>2,16</b>	-
B-4	42,6	20,2	77,6	123,5	<b>4,42</b>	-
B-5	42,6	47,2	108,0	139,1	<b>0,56</b>	<b>9</b>
B-6	43,6	46,0	112,0	148,6	<b>0,46</b>	<b>10</b>
B-7	32,2	46,8	110,0	125,5	<b>0,38</b>	<b>9</b>
B-8	32,6	46,6	110	125	<b>0,35</b>	<b>8</b>
B-9	43,1	46,2	119	147,3	<b>0,2</b>	<b>9,5</b>
B-10	42,6	46,6	120	146,8	<b>0,13</b>	<b>9</b>
B-11	32,2	46,5	116	124,7	<b>0,30</b>	<b>9</b>
B-12	42,2	46,4	112	124,8	<b>0,16</b>	<b>9</b>
B-13	58,1	45,9	109,6	124,9	<b>0,31</b>	<b>8</b>

Para a realização do teste de secagem da lecitina, inicialmente a amostra contida dentro do IBC foi homogeneizada, pois se observou a formação de três fases, contendo goma, ácido graxo e óleo refinado. Após o preparo do secador por injeção de vapor no seu interior, a lecitina começou a ser bombeada, inicialmente à temperatura ambiente (amostras B1 a B4 da Tabela 21). Nos primeiros testes, a temperatura de aquecimento do evaporador permaneceu entre 123 e 178°C. Nessas condições, a umidade da lecitina produzida manteve-se acima da especificação (entre 1,26 e 4,42%), sendo assim, as condições de secagem foram alteradas nos testes subsequentes. A umidade do produto final deve ser baixa para evitar contaminações. Os testes seguintes ocorreram com uma temperatura entre 139 e 148°C (B5 e B6, Tabela 21). No entanto, a goma de entrada passou a ser pré-aquecida para aproximadamente 46°C (antes da entrada no sistema), de forma a se atingir a umidade final proposta sem danificar a qualidade do produto. Temperaturas elevadas no evaporador resultam em menor umidade, no entanto, a cor do produto obtido é mais escura (Figura 34). Nos testes B7 e B8 se utilizou a temperatura de 125°C e taxa de alimentação menor, em torno de 30 kg/h. Entre B9 e B13 a temperatura foi de 147°C, e entre B11 a B13 a vazão diminuiu e a temperatura foi de 125°C. Nos ensaios de secagem da lecitina, observou-se que quanto menor era a pressão de vapor utilizada para a secagem, mais clara era a lecitina obtida, no entanto, maior era o teor de umidade (Figura 35).

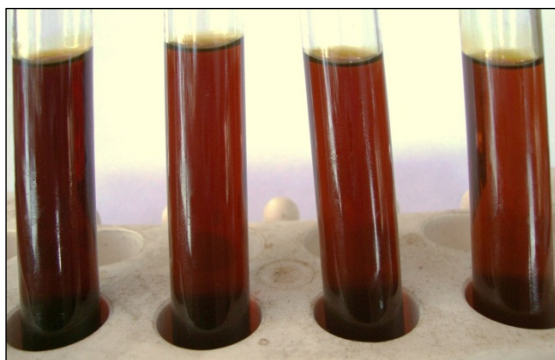
**Figura 34 - Comparação amostras de lecitina obtidas com condições de secagem diferentes: quanto mais escura a lecitina, maior a pressão de vapor utilizada no processo de secagem**



Fonte: Acervo Autor

A cor é um aspecto importante na qualidade da lecitina, como foi discutido anteriormente. A especificação de cor para lecitina é no máximo 10. A nova lecitina (produzida a partir do farelo desengordurado) atingiu um valor igual a oito, o que é vantajoso comercialmente (amostra B8 e B13, Tabela 21). Além da melhoria de cor, a “cristalinidade” obtida na nova lecitina conferiu ainda um diferencial ao novo produto. A Figura 35 mostra amostras de lecitina após a secagem.

**Figura 35 - Amostras de lecitina obtidas do teste de secagem**



Fonte: Acervo Autor

Ainda em relação à qualidade do produto, outro parâmetro importante é a soma dos fosfolípidios principais (%) e a proporção entre fosfolípidios. As amostras B5 a B13 foram analisadas e os resultados são apresentados na Tabela 22. Os teores de fosfolípidios das amostras foram similares, em média,  $47,33 \pm 0,33\%$ , com maiores teores de PC e PI.

**Tabela 22 - Resultados para o teor de fosfolípidios das amostras de lecitina após secagem**

AMOSTRA	PC	PI	PE	PA	OUTROS	TOTAL
B-5	15,94%	14,00%	6,47%	4,63%	1,20%	47,46%
B-6	15,89%	14,14%	6,47%	4,57%	1,12%	47,40%
B-7	16,01%	14,16%	6,59%	4,63%	1,16%	47,79%
B-8	16,08%	13,93%	6,50%	4,59%	1,18%	47,39%
B-9	15,98%	13,88%	6,38%	4,55%	1,25%	47,22%
B-10	15,84%	13,51%	6,44%	4,48%	1,33%	46,72%
B-11	15,83%	13,61%	6,51%	4,60%	1,14%	46,92%
B-12	16,12%	13,85%	6,51%	4,63%	1,36%	47,58%
B-13	16,15%	13,90%	6,59%	4,60%	1,17%	47,45%

fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PS- foafatidilserina PA- Ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina

Os testes de secagem demonstraram sucesso operacional na secagem da goma úmida em equipamento contínuo, resultando em amostras que atenderam às especificações de umidade e cor.

## 6.0 CONCLUSÕES

A produção de concentrado proteico de soja a partir do farelo desengordurado gera como subproduto uma micela alcoólica, que após a recuperação do etanol e concentração, resulta em um produto açucarado denominado melação de soja. A micela alcoólica apresenta, no entanto, não somente açúcares, etanol e água, mas também uma fração oleosa contendo fosfolipídios. Os fosfolipídios, principais componentes da lecitina, apresentam valor comercial elevado. Essa observação motivou a realização desse trabalho.

Na primeira etapa do trabalho foi possível elaborar e validar uma metodologia analítica para quantificação de fosfolipídios. Essa validação ocorreu em paralelo com a análise do melhor método para extração tanto de farelo de soja desengordurado como de soja para a etapa analítica. Foi possível estabelecer e validar uma metodologia de análise por cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal com detecção por espalhamento de luz evaporativo. Tanto o método de extração descrito por Bligh e Dyer (1959), utilizando metanol, clorofórmio e água, quanto o processo de extração com hexano:etanol demonstraram ser boas estratégias de preparo de amostras (extratos contendo fosfolipídios) para o procedimento analítico. O método de extração por hexano:etanol, no entanto, apresentou ligeira vantagem em relação ao método de B&D, pois com ele a recuperação de fosfatidilcolina, fosfolipídio de maior importância, foi superior.

Em relação ao comportamento dos fosfolipídios individuais em solução etanólica, todos tiveram comportamento similar. No entanto, a fosfatidilcolina foi mais influenciada pela concentração de etanol. A maior solubilidade encontrada em temperatura ambiente foi de 4,93 g/L obtida na concentração de etanol 90% , diminuindo novamente quando se utilizou etanol anidro.

Diversos sistemas de solventes foram testados para a extração de fosfolipídios do farelo de soja desengordurado, com o objetivo de verificar o melhor rendimento de extração, bem como o perfil de fosfolipídios extraídos na amostra e o efeito sobre a recuperação de proteínas. Como a intenção era a produção simultânea de Concentrado Proteico e a recuperação de fosfolipídios , a mistura etanol: água , portanto, foi mais profundamente estudada. Nesse sistema, alcançou-se um rendimento de 1,53 g/100g na condição de 70-75% v/v de etanol. O comportamento individual de cada fosfolipídio (PC, PA, PE) foi similar. Entre 70 e

75% de etanol, o conteúdo de fosfolipídios recuperado permaneceu constante. No entanto, o teor de proteínas do concentrado proteico (fração sólida resultante do processo de extração) foi reduzindo a partir de 75% de etanol. Sendo assim, concluiu-se que a concentração ótima de etanol para um processo no qual se deseja obter simultaneamente SPC (farelo com teor elevado de proteínas) e micela com alto teor fosfolipídios seria em torno de 70% v/v.

Industrialmente foram realizados testes de centrifugação da micela com base nos resultados obtidos em laboratório e recuperação de fosfolipídios, bem como secagem do material obtido em secador contínuo, além de análises analíticas e comerciais do produto, puro ou como componente de chocolates. Os valores dos rendimentos obtidos no teste em escala industrial indicou ser possível recuperar em termos de A.l/micela  $0,65 \pm 0,22\%$ . As análises físico-químicas realizadas após o processo de secagem da lecitina comprovaram a qualidade da lecitina final obtida, que atendeu a todas as especificações, além de possuir como diferencial um elevado teor de fosfolipídios.

Os resultados desse trabalho demonstraram a possibilidade de aproveitamento de um resíduo da produção de concentrado proteico de soja, presente na micela alcoólica residual do processo. O ajuste das condições de processo a partir dos resultados apresentados nesse trabalho aponta a possibilidade de recuperação dos fosfolipídios da micela, sem prejudicar a recuperação das proteínas na fração sólida. O trabalho apresentado tem potencial para contribuir no aproveitamento racional de um resíduo da indústria processadora de soja, além de possibilitar o aumento do faturamento da indústria pela recuperação de um produto com alto valor agregado.

Para aplicação do processo com sucesso em escala industrial, é necessária a elaboração de um projeto industrial, o qual está em fase de desenvolvimento atualmente, bem como a análise da viabilidade econômica do projeto. Outro ponto que pode ser trabalhado é referente à qualidade do produto final obtido, em especial na avaliação e ajuste do odor para as aplicações a que será destinado.

Sugere-se também um estudo aprofundado da recuperação dos fosfolipídios após a extração com o sistema de solventes hexano: etanol, caso deseje-se a recuperação dos fosfolipídios do farelo de soja desengordurado independente da produção de SPC.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACRITICA. **Fábrica de proteína de soja da ADM deve operar a partir de 2015 em MS.** 02 de Junho de 2014. Disponível em: <<http://www.acritica.net/?conteudo=Noticias&id=119589>>. Acesso em Junho de 2014.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 fev. de 2003.
- BRIGHAM, E. F., *et al.* **Administração financeira: Teoria e prática.** Trad. Alexandre Loureiro Guimarães Alcântara, José Nicolas Albuja Salazar. Revisão técnica José Carlos Guimarães Alcântara. São Paulo: Atlas, 2001.
- BARBOSA, L.C.A. Introdução à Química Orgânica. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004.
- BEARE-ROGERS, J.L., BONEKAMP-NASNER A.; DIEFFENBACHER A. Determination of the phospholipid profile of lecithins by high performance liquid chromatography. Technical Report IUPAC, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 64, No. 3, pp. 447-454, 1992.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BRUM, A.A.S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica.** (Dissertação: Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.
- BRUM, A.A.S., ARRUDA, L.F., DARCE, M.A.B.R. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal** Quim. Nova, Vol. 32, No. 4, 849-854, 2009.
- BUSATO JÚNIOR, F.J. IMCOPA. Imcopa Importação Exportação e Indústria de óleos Ltda. (Araucária, PR). **Processo industrial de produção do farelo concentrado de soja e melão de soja** BR. n. PI0704760-6A2. 30 nov. 2007, 28 jul. 2009.
- BUSATO JÚNIOR F. J. IMCOPA. Imcopa Importação Exportação e Indústria de óleos Ltda. (Araucária, PR). **Processo industrial de produção de álcool etílico de soja.** BR. n. PI0800529-0A2. 31 Jan 2008, 22 set. 2009.
- CARAMURU. Caramuru. Disponível em: <[www.caramuru.com](http://www.caramuru.com)>. Acesso em Junho de 2014.



CEGLA, U.G. SHUSTER, M., TIKVA, P. **Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof.** United State Patent. US6913771 B2. 5 Jul 2005.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods.** nov. 1994.

CHAJUSS, D. Soy Protein Concentrate: Technology, properties, and applications. In: LIU, K. **Soybeans: as Functional Foods and Ingredients.** Champaign: AOCS PRESS, 2004. p. 121-133.

CHAJUSS, D. **Soy molasses: Processing and utilization as a functional food.** Chapter 10. in: Liu, K. Soybeans as functional foods and ingredients. Illinois: AOCS Press, 331 p., 2004.

CODEX Alimentarius. **Lecithin.** Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=77> Acesso em agosto de 2013.

CODEX Alimentarius. **Lecithin.** 41st JECFA (1993). Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-250-m4.pdf> Acesso em agosto de 2013.

CROWN Iron Works Company. **Edible Lecithin Processing.** Disponível em: <http://www.crowniron.com/userImages/Edible%20Lecithin%20Processing.pdf> Acesso em agosto de 2013.

DAYTON, C.L.G.; GALHARDO, F. **Enzymatic Degumming.** In: Farr, W.E.; Proctor, A. Green vegetable oil processing. Illinois: AOCS Press. 296 p. 2012.

DERSJANT-LI, Y. **The Use of Soy Protein in Aquafeeds.** Nutricion Acquicola VI, 2002.

EMBRAPA SOJA. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/> Acesso em agosto de 2013.

EMBRAPA SOJA. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/> Acesso em maio de 2014.

ERICKSON, D.R. **Practical Handbook of soybean processing and utilization.** Illinois: AOCS Press and Missouri: United Soybean Board, 1995.

FARR, W.E.; PROCTOR, A. **Green vegetable oil processing.** Illinois: AOCS Press. 296 p. 2012.

FERNANDES, G.R.; MIGUEL, D.P. **Detecção Dos Açúcares Da Soja.** Cadernos De Pós-Graduação Da Fazu, V. 2., 2011.

FERREIRA, P. **Pioneirismo mundial troca resíduos de soja por soluções. Inovação em Pauta.** FINEP. 2008. Disponível em:

[http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/terceira\\_edicao/inovacao\\_em\\_pauta3\\_41a43.pdf](http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/terceira_edicao/inovacao_em_pauta3_41a43.pdf) Acesso em 2013

FINNPROTEIN. Finnprotein. Disponível em: <<http://www.finnprotein.fi/en/>> Acesso em junho de 2014.

GALHARDO, F.; DAYTON, C. **Edible Oil Processing**. Enzymatic degumming. Disponível em: <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-enz/index.htm> Acesso em março 2014

GANDHI, A.P.; *et al.* **Studies on alternative solvents for the extraction of oil- soybean**. International Journal of Food Science and Technology, 38, 369-375, 2003.

GEANKOPLIS, C.J. **Transport processes and separation process principles**. Prentice Hall, 4<sup>a</sup>ed., 2003.

GoshenBiotech. **Lecithin**. 2013. Disponível em: <http://www.lecithin.co.kr/en/lecithin-history.php> Acesso em dezembro de 2013.

GREEN, D.M.; PERRY, R.H. **Perry's chemical engineers' handbook**. McGraw Hill, 8<sup>a</sup> ed. 2008.

GUNSTONE, F.D., HARWOOD, J.L., DIJKSTRA, A.J. **The lipid handbook**. Taylor & Francis Group: CRC Press. 3 edição. 2007.

GUPTA, M.K. **Practical Guide to vegetable oil processing**. Illinois: AOCS Press, 2007.

HAMLETPROTEIN. HamletProtein. Disponível em: <<http://hamletprotein.com/me/process-2>> Acesso em junho 2014.

HAYES, L.P.; SIMMS, R.P. **Defatted soybean fractionation by solvent extraction**. U.S. 3.737.901. 22 Mai 1973.

HAWTHORNE, J.N.; LEKIM, D. **Soya Lecithin dietetic applications. Proceedings of the Second Colloquium on Soya Lecithin**. England, 1982.

HURST, J.W.; ROBERT, A.M.J. **The Analysis of Phospholipids in Soy Lecithin by HPLC**. Journal of the American Oil Chemists Society, 61, 1462-1463, 1984.

ISO 11701. **Animal and vegetable fats and oils – Determination of Phospholipids content in lecithins by HPLC using a light scattering detector**. International Standard, Suíça, 2009.

IMCOPA. Imcopa. Disponível em: <[www.imcopa.com.br](http://www.imcopa.com.br)>. Acesso em Junho de 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008. jul. de 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology** Q2(R1). nov. de 2005.

JEFFREY W. H., ROBERT A.; MARTIN, JR. **The Analysis of Phospholipids in Soy Lecithin by HPLC**. Journal of American Oil Chemists' Society, Hamburg, v 61, no. 9, p. 1462, 1984.

JUNGALWALA, F. B., J. E. EVANS, and R. H. MCCLUER. **High performance liquid chromatography of phosphatidylcholine and sphingomyelin with detection in the region of 200 nm**. Biochem. J. 155:55, 1976.

KOLAROVIC L.; FOURNIER N.C. **A Comparison of Extraction Methods for the Isolation of Phospholipids from Biological Sources**. Analytical Biochemistry, 156, 244-250, 1986.

LEE, S. J. *et al.* **Determination of phospholipids in soybean (Glycine max (L.) Merr) cultivars by liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. Journal of Food Composition and Analysis, 23, 314–318, 2010.

LEONEL, A.J. **Produção e caracterização de partículas lipídicas constituídas por ácidos graxos, gordura vegetal hidrogenada e lecitina na encapsulação de um composto hidrofílico de baixa massa molar**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, 2008.

LETTER, W.S. **A rapid method for phospholipid class separation by HPLC using an evaporative light-scattering detector**. Journal of liquid chromatography, 15, 253-266, 1992.

LIANG J., CHI, F. KOTOWSKI, D.C. RENESSEN LLC. Monsanto Technology LLC. Cargill Incorporated. **Alimento de soja com alto teor de proteína**. BR. n. PI0507088-0A. 26 Jan 2005, 19 Jun 2007.

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**. Illinois: AOCS Press, 2004.

MARSMAN, G. **Chemical, physical and nutritional changes in soybean meal as a result of toasting and extrusion cooking**. Tese (Wageningen Agricultural University). 1998.

MCCABE, W.L.; SMITH, J.C.; HARRIOT, P. **Unit operations of chemical engineering**. McGraw Hills, 7<sup>a</sup> ed., 2005.

MELTON, S.L. **Analysis of Soybean Lecithins and Beef Phospholipids by HPLC with an Evaporative Light Scattering Detector**. JAOCS, 69, 1992.

MELTON, S.L.; MOYERS, R.E.; PLAYFORD, C.G. **Lipids extracted from soy products by different procedures**. Journal of the American Oil Chemists' Society, 56, 489-493, 1979.

MIRANDA, L.C. **Obtenção e caracterização de hidrolisados enzimáticos de proteínas do farelo de soja**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2012.

MIYAZAWA, F.M. **Biologia 1**. Biologia celular. Disponível em:  
<http://www.cursodebiologia.com.br/biologia-celular/>

MONTANARI, L.; FANTOZZI, P.; SNYDER, J.M.; KING J.W. **Selective extraction of phospholipids from soybeans with supercritical carbon dioxide and ethanol**. The Journal of Supercritical Fluids, 14, 87-93, 1999.

NIELSEN, K. **The Composition of the Difficultly Soybean Phosphatides Extractable** The Journal Of The American Oil Chiemists' Society, v.37, 217 – 219, 1960.

NIEUWENHUYZEN, W.; TOMÁS, M.C. **Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies**. European Journal of Lipid Science and Technology, Volume 110, Issue 5, p. 472–486, No. 5, 2008.

NIEUWENHUYZEN, W. **Lecithin Production and Properties**. J. Am. Oil Chemists' Soc., (VOL. 53), 1976.

OZER, R.W. **Algae Drying and extraction**. In: FARR, W.E.; PROCTOR, A. Green vegetable oil processing. Illinois: AOCS Press, 2012.

PARDUN, H. **Progress in the recovery and processing of plant lecithins**. In: HAWTHORNE, J.N.; LEKIM, D. Soya Lecithin dietetic applications. Proceedings of the Second Colloquium on Soya Lecithin. England, 1982.

PEISKER, M. **Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition**. Cahiers Options Mediterraneennes. 54, 103-107, 2001.

POLO, E. Brasil Econômico. **Dono da Caramuru entra para a lista dos sojicultores do país**. 2012. Disponível em:  
<<http://economia.ig.com.br/empresas/agronegocio>>. Acesso em Junho de 2014

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2003.

RIBANI, M. *et al.* **Validation for chromatographic and electrophoretic methods**. Quimica Nova, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RITTNER, H. Sementes oleaginosas: subprodutos e resíduos de extração. In:\_\_\_\_\_. **Tecnologia matérias graxas: Extração**, Volume 1. São Paulo: Sem editor. 2002. P. 981-1074.

RUSSEL, J.B. **Química Geral**. São Paulo: Makron Books do Brasil McGraw-Hill, 2ª edição, v.1, 1994.

RYDBERG, J.; MUSIKAS, C.; CHOPPIN, G.R. **Principles and practices of solvent extraction**. New York: M.Dekker, 1992.

SCHMIDT J.C.; ORTHOEFER F.T. A.E. Staley Manufacturing Co, cap. 10. **Lecitinas modificadas**. Decatur, IL.

SELECTA. Selecta. Disponível em: <[www.selecta.com.br](http://www.selecta.com.br)>. Acesso em Junho 2014.

SIQUEIRA, P. F. **Production Of Bio-Ethanol From Soybean Molasse By *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná. 2007.

SIQUEIRA, P. F. IMCOPA. Imcopa Importação Exportação e Indústria de óleos Ltda. (Araucária, PR). **Processo de queima de resíduos industriais vegetais, equipamento de queima de resíduos industriais vegetais, caldeira geradora de vapor**. BR. n. PI0900363-0A2. 02 fev. 2009, 26 out. 2010.

SOJAPROTEIN. Sojaprotein. Disponível em: <[http://www.sojaprotein.rs/sites/sojaprotein.com/files/katalozi/tradkon\\_spc\\_katalog\\_2013\\_-\\_english.pdf](http://www.sojaprotein.rs/sites/sojaprotein.com/files/katalozi/tradkon_spc_katalog_2013_-_english.pdf)> Acesso em Junho de 2014

SOYINFO CENTER. **History of Soy Lecithin**. 2007 Disponível em: <<http://www.soyinfocenter.com/HSS/lecithin1.php>> Acesso em Dezembro de 2013

STANLEY, J. Production and utilization of lecithin. In: MARKLEY, K.S. **Soybeans and Soybean Products**, Volume 2. New York: Interscience, 1951. p. 593-597.

SZUHAJ, B.F. **Lecithins: Sources, manufacture & uses**. Illinois: The American Oil Chemists' Society, 1989.

SZUHAJ, B.F.; NIEUWENHUYZEN, W. **Nutrition and Biochemistry of Phospholipids**. Illinois: AOCS Press, 2003.

VINCENTIM, D.J.; MARTINS, S. **Parâmetro de solubilidade**. Cap 6 *in*: Garbelotto, P. Solventes industriais: seleção, formulação e aplicação. São Paulo: Ed. Blucher: Rhodia, 2007.

VOLLHARDT, K.P.; SCHORE, N. E. **Química orgânica**. Estrutura e função. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

YAO, L.; JUNG, S. **<sup>31</sup>P NMR Phospholipid Profiling of Soybean Emulsion Recovered from Aqueous Extraction**. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 4866–4872.

WESELAKE, R.J. **Teaching innovations in lipid science**. Boca Raton: AOCS Press. 263 p. 2008.

WU, Y.; WANG, T. **Soybean lecithin fractionation and functionality** Journal of the American Oil Chemists' Society, V. 80, 4, 319-326, 2003.