

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI

**DERIVATIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DE UM RESÍDUO
CELULÓSICO DA INDÚSTRIA TÊXTIL NA PURIFICAÇÃO DE
FOSFOLIPÍDIOS BRUTOS DE SOJA COMPARATIVAMENTE À
PRECIPITAÇÃO COM ORGANOSSOLVENTES.**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2018**

LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI

**DERIVATIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DE UM RESÍDUO
CELULÓSICO DA INDÚSTRIA TÊXTIL NA PURIFICAÇÃO DE
FOSFOLÍPIDIOS BRUTOS DE SOJA COMPARATIVAMENTE À
PRECIPITAÇÃO COM ORGANOSSOLVENTES.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental”.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius de Liz
Co-Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto

**CURITIBA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

W646d Wielewski, Leonardo Pellizzari
2018 Derivatização e aproveitamento de um resíduo celulósico da indústria têxtil na purificação de fosfolípidios brutos de soja comparativamente à precipitação com organossolventes / Leonardo Pellizzari Wielewski.-- 2018.
93 f.: il.; 30 cm.

Disponível em World Wide Web
Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2018
Bibliografia: p. 82-94

1. Celulose. 2. Lecitina. 3. Fosfatidiletanolamina.
4. Acetona. 5. Metiletilcetona. 6. Tecnologia ambiental
- Dissertações. I. Liz, Marcus Vinícius de, orient. II. Couto, Gustavo Henrique, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba
Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 108

A Dissertação de Mestrado intitulada DERIVATIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DE UM RESÍDUO CELULÓSICO DA INDÚSTRIA TÊXTIL NA PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS BRUTOS DE SOJA COMPARATIVAMENTE À PRECIPITAÇÃO COM ORGANOSOLVENTES, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Leonardo Pellizzari Wielewski**, no dia 05 de setembro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Couto - Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Francisco de Assis Marques – UFPR

Prof(a). Dr(a). Jonas Golart da Silva – UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 05 de setembro de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo coração a:

Deus e a todos os Seres que de alguma forma me auxiliaram nesta pesquisa.

Minha mãe, Sandra Mara Pellizzari, por todo o auxílio, toda paciência, toda compreensão, por me proporcionar a oportunidade de estudar e ser o pilar fundamental para que eu me tornasse quem sou hoje.

Prof. Dr. José Domingos Fontana, meu orientador durante toda a pesquisa, por toda paciência em suas explicações, dedicação, companheirismo nas jornadas noite a dentro para a realização dos experimentos, apoio, por abrir portas para que eu realizasse o mestrado, e principalmente por todo conhecimento transmitido.

Minha namorada, Ana Carolina Siles Tardivo, meu amor, pela incrível paciência comigo e por me fazer ter paciência, serenidade, insistência, motivação, afeto, e compreensão neste período de nossas vidas.

Tatiana Zuccolotto, Cibelle Dallagassa, Angélica Vieira, Bárbara, Rafael Lopes, Juliana, Maurício, Marcela, por todas as dicas, ensinamentos, auxílios, brincadeiras e companheirismo no laboratório.

Professores Marcus Vinícius de Liz e Gustavo Couto por todo auxílio nesta etapa final.

Professores Jonas Golart da Silva, Marlene Soares e Francisco de Assis Marques por integrarem a(s) banca(s) e auxiliarem na melhoria deste trabalho com seus conhecimentos.

Adélia e Carlos por me auxiliarem e me incentivarem a cursar o mestrado.

Leonardo Kozak Michelin, Letícia Dohns, Débora Colla, Bruno Pires, Yuri Gaudeda pela amizade e bons momentos nestes anos.

E não menos importante, a todos os amigos que de alguma forma fizeram parte deste período.

*“O que é meu inimigo? Eu mesmo. Minha ignorância, meu apego, meus ódios.
Aí está meu inimigo...”*

Dalai Lama

RESUMO

WIELEWSKI, Leonardo Pellizzari. **Derivatização e aproveitamento de um resíduo celulósico da indústria têxtil na purificação de fosfolipídios brutos de soja comparativamente à precipitação com organossolventes.** 94f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

A lecitina bruta de soja é um subproduto de valor agregado do processamento dos grãos de soja que visa, em primeira instância, o óleo comestível e o farelo de soja. Pode-se aumentar o valor de mercado da lecitina bruta de soja com o enriquecimento/purificação das espécies denominadas fosfolipídios. Estas espécies são amplamente utilizadas principalmente nas indústrias médica, farmacêutica, alimentícia e química. O conhecimento tecnológico na purificação destes compostos remonta à décadas, e a dominância nos parques fabris de oleaginosas repousa, por conta de economicidade e praticidade, na utilização de grandes volumes de solventes orgânicos. Entretanto, outras variantes clássicas também podem ser aplicadas através de outros agentes precipitantes tais como ácido fosfórico ou cítrico. Como alternativa inovadora, economicamente viável e ambientalmente correta, foi explorado o uso de um resíduo celulósico têxtil, o Pó de Algodão de Varredura Têxtil derivatizado nas formas de dietilaminoetil-celulose (PAVT-DEAE⁺), carboximetil-celulose (PAVT-CM⁻) e aminoetil-celulose (PAVT-AE⁺) para fins de adsorção e dessorção dos fosfolipídios, com descarte inicial dos componentes não desejados (triacilgliceróis neutros e ácidos graxos livres). Com a combinação de duas técnicas aprimoradas, foi possível constatar que a utilização deste resíduo foi eficaz no enriquecimento dos fosfolipídios. As análises dos resultados foram realizadas através de cromatografia em camada delgada, técnica ágil por proporcionar a análise de várias amostras em até uma hora, barata por não depender de equipamentos e reagentes de alto custo e versátil pela possibilidade da fácil alteração da fase móvel para aprimorar a separação dos compostos de interesse. Utilizando a cromatografia em camada delgada foi possível visualizar o perfil qualitativo de várias amostras ao mesmo tempo, e nas amostras que encerraram o trabalho foi utilizado a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência, através da qual quantificou-se o teor da fosfatidilcolina (fosfolipídio com maior teor na lecitina bruta de soja), aumentado de 0,2452 mg.mL⁻¹ na lecitina bruta de soja para 0,3541 mg.mL⁻¹ na primeira amostra purificada e 0,2823 mg.mL⁻¹ na segunda amostra purificada obtida.

Palavras-chave: DEAE-Celulose; CM-Celulose; Fosfatidilcolina; Fosfatidiletanolamina; Propanona; Butanona.

ABSTRACT

WIELEWSKI, Leonardo Pellizzari. **Derivatization and utilization of a cellulosic residue of the textile industry in the purification of crude phospholipids of soybean compared to the precipitation with organosolvents.** 94 f. Thesis. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2018.

Raw soy lecithin is a value-added byproduct of soybean processing that is primarily intended for edible oil and soybean meal. The market value of soya bean lecithin can be increased by enriching/purifying the so-called phospholipid species. These species are widely used mainly in the medical, pharmaceutical, food and chemical industries. The technological know-how in the purification of these compounds goes back decades, and the dominance in the oleaginous production parks rests, due to economicity and practicality, in the use of large volumes of organic solvents. However, other classical variants may also be applied through other precipitating agents such as phosphoric or citric acid. As an innovative, economically viable and environmentally correct alternative, the use of a textile cellulosic residue, the Textile Sweep Cotton Powder derivatized in the forms of diethylaminoethyl cellulose (PAVT-DEAE⁺), carboxymethyl cellulose (PAVT-CM⁻) and aminoethyl cellulose (PAVT-AE⁺) for adsorption and desorption of phospholipids, with initial disposal of the undesired components (neutral triacylglycerols and free fatty acids). With the combination of two improved techniques, it was possible to verify that the use of this residue was effective in enriching the phospholipids. The analysis of the results was done through thin layer chromatography, agile technique for providing the analysis of several samples in up to one hour, inexpensive for not relying on equipment and reagents of high cost and versatile for the possibility of the easy change of the mobile phase to hone the separation of the compounds of interest. Using thin-layer chromatography, it was possible to visualize the qualitative profile of several samples at the same time, and in the samples that concluded the work the quantification by high performance liquid chromatography was quantified by means of which the content of phosphatidylcholine (phospholipid with higher crude lecithin content), increased from 0.2452 mg.mL⁻¹ in crude soya lecithin to 0.3541 mg.mL⁻¹ in the first purified sample and 0.2823 mg.mL⁻¹ in the second purified sample obtained.

KEYWORDS: DEAE-Cellulose; CM-Cellulose; Phosphatidylcholine; Phosphatidylethanolamine; Propanone; Butanone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de processo de obtenção de óleo de soja bruto e farelo de soja desengordurado.	17
Figura 2: Degomagem do óleo de soja bruto.	19
Figura 3: Amostra de lecitina bruta de soja, não branqueada.	20
Figura 4: Estrutura geral dos fosfolipídios.	21
Figura 5: Representação da bicamada lipídica da membrana celular eucarionte animal e a localização dos PLs.	22
Figura 6: Fórmula estrutural da Fosfatidilcolina (PC).	22
Figura 7: Fórmula estrutural da Fosfatidiletanolamina (PE).	24
Figura 8: Fórmula estrutural do Fosfatidilinositol (PI).	26
Figura 9: Representação da estrutura química da PS.	27
Figura 10: Síntese de DEAE+-celulose.	31
Figura 11: Reação de carbometilação.	33
Figura 12: Representação da estrutura do PAVT-AE ⁺	34
Figura 13: Fluxograma da metodologia aplicada.	35
Figura 14: Lecitina de soja bruta após a adição dos solventes e agitação.	36
Figura 15: Sobrenadante separado do precipitado após centrifugação.	37
Figura 16: Exemplos de cromatoplasmas reveladas com (A) vapor de Iodo, e (B) “charring” de Vaugh.	38
Figura 17: Exemplo de colunas contendo PAVT-DEAE ⁺	45
Figura 18: Avaliação de uma CCD.	47
Figura 19: Cromatografia em camada delgada com os perfis obtidos após tratamento com solventes.	49
Figura 20: Cromatografia em camada delgada com as frações dos seis solventes comparando as matrizes aniônicas Sephadex C-25 e PAVT-CM ⁻	50
Figura 21: Cromatografia em camada delgada com as frações dos seis solventes comparando as matrizes catiônicas Sephadex A-25 e PAVT-DEAE ⁺	51
Figura 22: Cromatografia em camada delgada das amostras obtidas com a aplicação de lecitina bruta de soja já solubilizada em hexano.	52
Figura 23: CCD das amostras obtidas em coluna de PAVT-AE ⁺ comparadas com padrões e suspensão inicial de lecitina bruta de soja.	54

Figura 24: Cromatografia em camada delgada das amostras obtidas em coluna de PAVT-CM ⁻ comparadas com padrões e suspensão inicial de lecitina bruta de soja.....	55
Figura 25: Cromatografia em camada delgada das amostras obtidas em coluna de PAVT-DEAE ⁺ comparadas com padrões e suspensão inicial de lecitina bruta de soja.....	57
Figura 26: Cromatografia em camada delgada comparando tratamento com acetona pura e acetona 95% em PAVT-AE ⁺	59
Figura 27: Cromatografias em camada delgada apresentando os resultados utilizando as matrizes derivatizadas A) PAVT-DEAE ⁺ , B) PAVT-CM ⁻ e C) PAVT-AE ⁺	61
Figura 28: Cromatografias em camada delgada com os resultados do pré-tratamento com acetona e com etanol.	64
Figura 29: CCD com os resultados obtidos comparando a variação de massa de lecitina bruta de soja.....	66
Figura 30: Cromatografia em camada delgada com os melhores resultados após pré-tratamento e aplicação da amostra em coluna de PAVT-DEAE ⁺	68
Figura 31: Cromatograma da lecitina bruta de soja.....	69
Figura 32: Cromatograma da amostra A (Primeira eluição com acetona).....	70
Figura 33: Cromatograma da amostra B (Segunda eluição com acetona).....	71
Figura 34: Cromatograma da amostra C (Primeira eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v)).	73
Figura 35: Cromatograma da amostra D (Segunda eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v)).	74
Figura 36: Representação gráfica dos valores de enriquecimento obtidos.....	76
Figura 37: Massa (mg) de PE, PC e PI em: (A) 82,5 mg obtidas com a junção das amostras C e D; (B) 50 mg de lecitina bruta de soja.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção dos fosfolipídios na lecitina bruta de soja.....	21
Tabela 2: Índice de polaridade de alguns compostos utilizados como solventes orgânicos.....	36
Tabela 3: Exemplificação do procedimento de aplicação e lavagem das colunas. ...	40
Tabela 4: Sequência de lavagem das colunas para comparação com e sem água. .	42
Tabela 5: Mapeamento da massa das frações obtidas em cada lavagem.....	53
Tabela 6: Balanço de massa com a massa total obtida e porcentagem de massa referente a cada lavagem.....	67
Tabela 7: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de lecitina bruta de soja.....	69
Tabela 8: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "A".....	70
Tabela 9: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "B".....	72
Tabela 10: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "C".	73
Tabela 11: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "D".	75
Tabela 12: Comparação entre os teores (%) de PE, PC, PI e a mistura destes PLs obtidos em cada amostra.	75
Tabela 13: Massa e teor de cada fosfolipídio nas amostras C+D e lecitina bruta de soja, calculadas a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC≡N: Acetonitrila

AL: Ácido Linoleico

CF: Clorofórmio

CM⁻: Carboximetil

DAGs: Diacilgliceróis

DEAE⁺: Dietilaminoetil

DO: Dioleína

EtOH: Etanol

F.M.: Fase Móvel

FFA ou AGL's: Free Fat Acids (Ácidos Graxos Livres)

iPrOH: Isopropanol

LQBB: Laboratório de Química/Biotecnologia de Biomassa

MAGs: Monoacilgliceróis

MeOH: Metanol

MO: Monoleína

PAVT: Pó de algodão de Varredura Têxtil

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PI: Fosfatidilinositol

PLs: Fosfolipídios

PS: Fosfatidilserina

SG 60: Sílica Gel 60

TAGs: Triacilgliceróis

CCD (TLC): Cromatografia em camada delgada (Thin-layer chromatography)

TO: Trioleína

USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

W: Water (Água)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Soja	16
3.2	Beneficiamento da soja	16
3.3	Lecitina bruta de soja	18
3.4	FOSFOLIPÍDIOS (PL'S)	20
3.4.1	Fosfatidilcolina (PC).....	22
3.4.2	Fosfatidiletanolamina (PE).....	24
3.4.3	Fosfatidilinositol (PI).....	26
3.4.4	Fosfatidilserina (PS).....	27
3.5	PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS	28
3.5.1	Formas convencionais de purificação dos fosfolipídios	28
3.5.1.1	Extração por solventes	28
3.5.1.2	Extração supercrítica por dióxido de carbono	28
3.5.1.3	Purificação por ultrafiltração	29
3.5.2	Técnicas alternativas para purificação de PLs	29
3.6	Pó de Varredura de Algodão Têxtil (PVAT)	30
3.6.1	Dietilaminoetilação (DEAE ⁺)	31
3.6.2	Carboximetilação (CM ⁻)	32
3.6.3	Etilaminoetilação (AE ⁺)	33
4	METODOLOGIA	35
4.1	Estudo 1: Tratamento da lecitina bruta de soja com solventes orgânicos e posterior agitação e centrifugação.	36
4.2	Estudo 2: Utilização de matrizes trocadoras iônicas na purificação dos PLs.	38
4.2.1	Comparação entre matrizes comerciais e PAVTs derivatizados.....	38
4.2.2	Forma de adição da lecitina bruta de soja aos PAVTs.....	39
4.2.2.1	Adição da lecitina bruta de soja solubilizada em hexano	40
4.2.2.2	Adição de lecitina bruta de soja diretamente nas matrizes e comparação entre cada tipo de derivatização.	40
4.2.2.3	Colunas hidratadas ou secas.....	41
4.2.2.4	Variação do pH dos eluentes e aplicação nas matrizes de PAVT derivatizados.	42
4.2.3	Aumento do volume de acetona nas eluições iniciais	43
4.3	Estudo 3: Pré-tratamento da lecitina bruta de soja com posterior aplicação em coluna de PAVT derivatizado.	43

4.3.1	Pré-tratamento isolado da lecitina bruta de soja utilizando acetona ou etanol.	44
4.3.2	Pré tratamento com variação da massa de lecitina bruta de soja e utilização de duas colunas.....	44
4.4	Estudo 4: Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Estudo 1: Tratamento da lecitina bruta de soja com solventes orgânicos e posterior agitação e centrifugação.....	48
5.2	Estudo 2: Utilização de matrizes trocadoras iônicas na purificação dos PLs.....	50
5.2.1	Comparação entre matrizes comerciais e PAVTs derivatizados.....	50
5.2.2	Forma de adição da lecitina bruta de soja aos PAVTs.....	52
5.2.2.1	Adição da lecitina bruta de soja solubilizada em hexano.....	52
5.2.2.2	Adição de lecitina bruta de soja diretamente nas matrizes e comparação entre cada tipo de derivatização.....	53
5.2.2.2.1	PAVT-AE ⁺	54
5.2.2.2.2	PAVT-CM ⁻	55
5.2.2.2.3	PAVT-DEAE ⁺	56
5.2.2.3	Colunas hidratadas ou secas.....	58
5.2.2.4	Variação do pH dos eluentes e aplicação nas matrizes de PAVT derivatizados.....	60
5.2.3	Aumento do volume de solvente nas eluições iniciais	62
5.3	Estudo 3: Pré-tratamento da lecitina bruta de soja com posterior aplicação em coluna de PAVT derivatizado.	63
5.3.1	Pré-tratamento isolado da lecitina bruta de soja utilizando acetona ou etanol.	63
5.3.2	Pré tratamento com variação da massa de lecitina bruta de soja e utilização de duas colunas.....	65
5.4	Estudo 4: Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	68
6	CONCLUSÃO	80
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
	BIBLIOGRAFIA.....	82

1 INTRODUÇÃO

O termo lecitina bruta de soja é utilizado para descrever a mistura de fosfolipídios (PLs), triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs), monoacilgliceróis (MAGs) e ácidos graxos livres (AGLs) remanescentes da degomagem do óleo bruto de soja.

Os fosfolipídios (também chamados de glicerofosfolipídios) diferem dos triacilgliceróis por conterem, em uma das posições hidroxil do glicerol um grupamento fosfato, além de suas duas cadeias lipídicas (Nelson, 2013). Estes compostos são encontrados frequentemente em ovos, soja, sementes de girassol, canola e outras oleaginosas além de gorduras animais (Pichot, 2013; Ozturk *et al.*, 2015). Os PLs são componentes fundamentais da membrana plasmática de todas células vegetais, animais e microrganismos.

Como tal ou após a purificação da lecitina bruta, os fosfolipídios podem ser utilizados na indústria médico/farmacêutica auxiliando no tratamento do mal de Alzheimer e câncer, no caso da fosfatidiletanolamina (PE) e da fosfatidilserina (PS) (Folch, 1942). Na indústria cosmética são utilizados na composição de hidratantes, filtros solares, xampus, cremes de barbear e outros diversos produtos. Quando empregados na alimentação animal podem ser utilizados como substitutos do leite para filhotes e composição de rações utilizadas na aquicultura e animais domésticos. Na agricultura podem ser aplicados sobre culturas de morango, cacau, pimenta, entre outros, para inibir o crescimento de fungos (Daicheng e Fucui, 2011).

Na alimentação humana foram incorporados às margarinas, alimentos processados, enlatados e alimentos instantâneos, conferindo à estes uma camada protetora, devido às suas propriedades antiaderentes. Podem ser utilizados com função emulsificante e modificadores de viscosidade, incorporados na composição de alimentos para o aumento do tempo de prateleira, além de serem utilizados na forma de suplementos nutricionais (Alc, 2009; Daicheng e Fucui, 2011).

Tanto os PLs quanto a lecitina bruta de soja são componentes de tintas, polidores de calçados, cola de fitas adesivas, aditivos de materiais fotográficos, entre diversas outras aplicações (Daicheng e Fucui, 2011).

Devido às diferentes aplicações e graus de pureza de cada um dos PLs, existem diferentes técnicas para a purificação destes compostos, entre elas as

extrações por solventes (Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b; Liu, 2007), extração supercrítica por CO₂ (Shi, 2005), e a extração por ultrafiltração (Koris e Vatai, 2002; Shi, 2005). Contudo, visando formas ambientalmente corretas e industrialmente aplicáveis financeiramente, novas formas de purificação destes compostos a partir da lecitina comercial estão sendo desenvolvidas, entre elas a separação em colunas utilizando celulose derivatizada na forma de Carboximetil Celulose (CM⁻ Celulose) (Comfurius e Zwaal, 1977) e dietilaminoetil Celulose (DEAE⁺ Celulose) (Do e Lo, 1986).

Os métodos de purificação de PLs empregando colunas que exploram a capacidade adsortiva destas matrizes celulósicas fornecem vantagem econômica e ambiental já que utilizam o resíduo industrial, denominado Pó de Algodão de Varredura Têxtil (PAVT), proveniente do processo de tecelagem, formado por fibras de algodão (celulose) que se acumulam no maquinário industrial. A geração deste resíduo pode chegar a uma tonelada por dia e muitas vezes este resíduo é subutilizado e encaminhado para combustão, afim de gerar energia.

Com a derivatização do Pó de Algodão de Varredura Têxtil (PAVT) à formas ionizadas aptas a sustentar trocas iônicas, ou seja, as dietilaminoetiladas ou carboximetiladas (DEAE⁺ e CM⁻) é possível a retenção de compostos aniônicos ou catiônicos como metais pesados, compostos fenólicos e corantes têxteis (Racz e Borsa, 1997; Nada e Hassan, 2006; Kamel *et al.*, 2012; Baldo *et al.*, 2014; Fontana *et al.*, 2016; Tahir *et al.*, 2016), além dos fosfolípidios presentes na lecitina bruta de soja, os quais são o foco desta dissertação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Enriquecer a mescla de fosfolipídios brutos de óleo de soja, por meio de tecnologias adsorptivas clássicas utilizando resíduos celulósicos ionizados provenientes da indústria têxtil (PAVT-CM⁻ e PAVT -DEAE⁺).

2.2 Objetivos específicos

1º Estudo: Definição dos solventes orgânicos para extração com solventes;

2º Estudo: Identificar a melhor forma de ionização (Carboximetilada ou Dietilaminoetilada) do pó de algodão de varredura têxtil para a retenção dos fosfolipídios e conseqüentemente a purificação da família dos fosfolipídios em Pó de Algodão de Varredura Têxtil derivatizado: Definição da melhor condição;

3º Estudo: Realizar o pré-tratamento da lecitina bruta de soja com posterior aplicação na coluna de Pó de Algodão de Varredura Têxtil ionizada otimizada: Melhoria do processo;

4º Estudo: Mensurar através de técnicas cromatográficas (planar e líquida de alta eficiência) a eficácia da purificação das duas famílias de interesse: Acilgliceróis + Ácidos graxos livres nos eluatos iniciais e mescla fosfolipídica enriquecida ou purificada nos eluatos subseqüentes, trabalhando com gradiente de polaridade no eluente.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Soja (*Glycine max* L.)

A soja é uma leguminosa do gênero *Glycine* L. e subgênero *Soja*. Esta planta possui grande diversidade genética, já que é constantemente submetida a programas de melhoramento genético (tanto naturais quanto transgênicos) em diversos países, visando a melhor adaptação da planta e o aumento de sua produtividade. A soja é uma planta herbácea, anual, semelhante ao feijão, porém possui vagens e hastes diferentes. A altura do caule pode variar de 0,5 m a 1,5 m com pelos variando de brancos a tostados, e dependendo da variedade pode ter grande número de ramificações. As flores podem ter colorações variáveis entre amarelas, brancas e violetas. As vagens são achatadas e recobertas de pelos, de coloração em tons de amarelo, cinza ou preto, podendo conter de um a quatro grãos (Fornazieri Jr, 1999).

A produção de soja vem crescendo no Brasil desde a safra de 2006/2007, com área semeada de 35,2 milhões de hectares na safra 2017/2018. Segundo dados do 11º levantamento/Agosto 2018, a safra 2017/2018 alcançou a marca recorde de 119 milhões de toneladas produzidas do grão (Conab, 2018).

3.2 Beneficiamento da soja

O Brasil é o quarto maior beneficiador de soja (43,2 milhões de toneladas), ficando atrás de China (102,0 milhões de toneladas), Estados Unidos (54,3 milhões de toneladas), e Argentina (44,0 milhões de toneladas) (Amazonas, 2018).

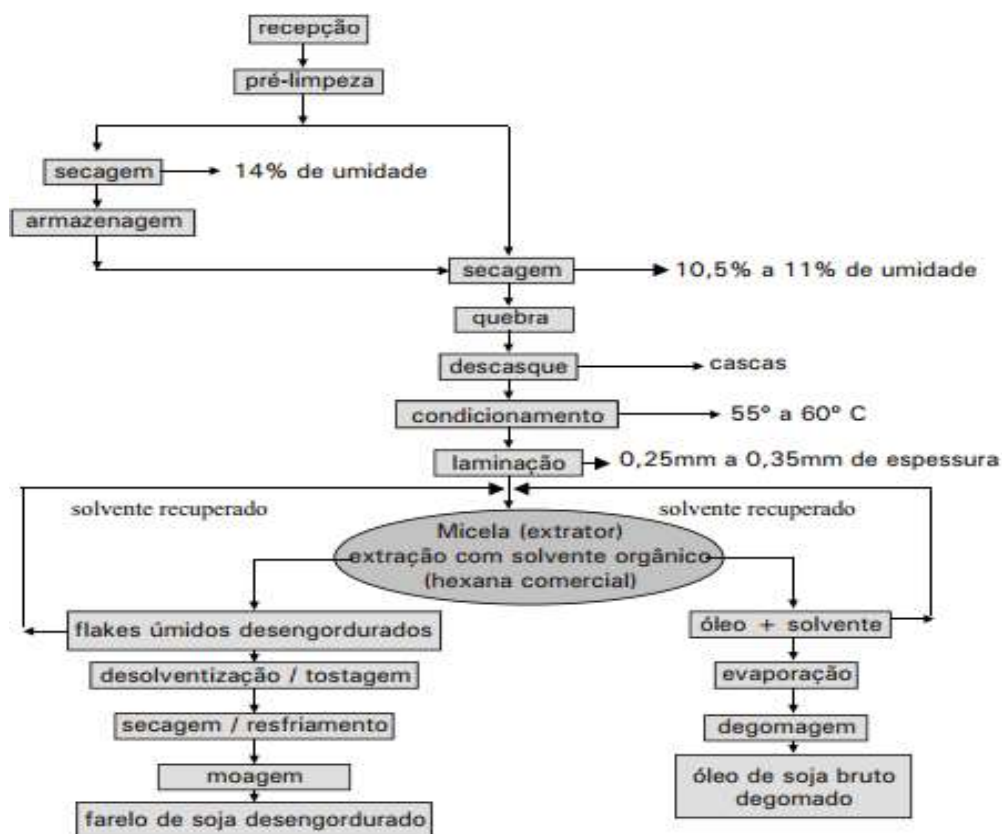
O processo de beneficiamento da soja é dividido em duas linhas principais (Embrapa, 2015):

- ✓ Linha 1: Originará o farelo de soja desengordurado;

- ✓ Linha 2: Originará o óleo de soja degomado, em que é gerado a lecitina bruta de soja.

Para a obtenção dos dois produtos do refino do óleo de soja (óleo degomado e lecitina bruta de soja), os grãos passam pelo processo de beneficiamento da soja ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma de processo de obtenção de óleo de soja bruto e farelo de soja desengordurado.



Fonte: (Embrapa, 2015)

No início do beneficiamento os grãos de soja são submetidos a uma pré-limpeza, na qual são retirados os materiais grosseiros (pedras, caule, folhas, etc). Em seguida os grãos passam por descascamento e trituração, sendo então encaminhados ao cozimento com o intuito de romper as paredes celulares, facilitando a saída do óleo em etapas posteriores (Embrapa, 2015).

A próxima etapa é a laminação, feita para aumentar a área superficial facilitando a ação dos solventes durante a extração do óleo. A extração do óleo bruto de soja é realizada utilizando-se solventes orgânicos (normalmente hexano) e filtração para retirada de impurezas. O óleo, ainda bruto, passa pelo refinamento através de uma sequência de processos físicos para remoção substâncias coloidais, proteínas,

ácidos graxos livres, sais, pigmentos (como a clorofila, xantofila e carotenoides), substâncias voláteis, silicatos, fosfatos e umidade (Embrapa, 2015).

O óleo bruto de soja (extrato hexano à quente, sem as subseqüentes degomagem e refino) contém em média 6% de uma mescla fosfolipídica, cujos componentes principais são: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI) correspondendo a 43%, 32%, 20%, respectivamente, além de teores menores de fosfatidilserina (PS) e ácido fosfatídico (PA) (Szuhaaj, 1989).

Dentre os processos utilizados para o refinamento do óleo bruto, os mais usuais são a degomagem ou hidratação, neutralização ou desacidificação, branqueamento ou clarificação e a desodorização. Os processos de refinamento são uma seqüência de etapas que visam transformar os óleos brutos em óleos comestíveis, com a remoção de fosfatídios, proteínas e as substâncias coloidais, além de funcionar como uma pré-neutralização, diminuindo em etapas subseqüentes, a quantidade de álcali utilizado (Embrapa, 2015).

O processo de degomagem gera uma “goma” constituída de fosfatídios e substâncias coloidais que são facilmente hidratáveis e se tornam insolúveis no óleo. Este produto é nomeado como “lecitina comercial”, o qual tem composição aproximada de 60% de mistura de fosfatídios, entre eles a fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina (Embrapa, 2015).

3.3 Lecitina bruta de soja

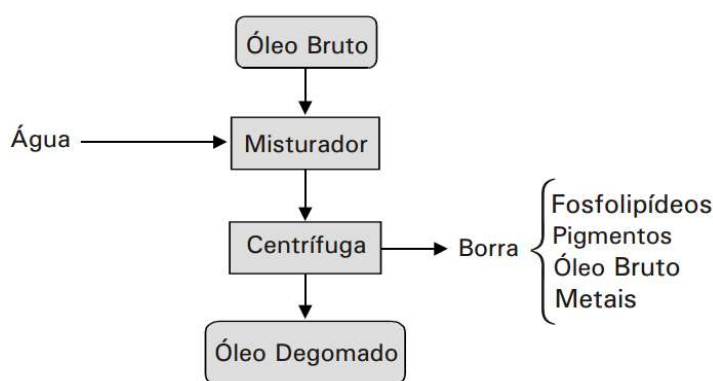
A composição das lecitinas brutas de soja pode variar quanto a quantidade de fosfolipídios, as características desejadas para utilizações específicas, o nível de impurezas aceitável, a coloração, entre outros aspectos (Casey, 1999). Segundo Russett (1997), o processo de obtenção da lecitina é realizado através da degomagem do óleo de soja bruto, obtido por prensagem ou extração por solventes (normalmente hexano) dos grãos de soja.

O óleo de soja bruto é composto por dois tipos de compostos dominantes, os acilgliceróis (trioleína, no caso da soja) e os fosfolipídios, estes últimos, também

conhecidos como fosfatídios ou glicerofosfolipídios, que ocorrem em pequenas concentrações, tendo variação de 1,1 até 3,2% (Oliveira, 2001).

Com a degomagem do óleo de soja bruto é possível separar a maior fração dos fosfatídios, após a adição de água e centrifugação. Juntamente com esta fração saem metais, pigmentos e ainda uma pequena fração de óleo bruto (Figura 2). Usualmente é utilizado um volume de 0,5 a 3,0% de água em relação ao volume inicial de óleo bruto para retirada da borra, ou goma (Moretto e Fett, 1998).

Figura 2: Degomagem do óleo de soja bruto.

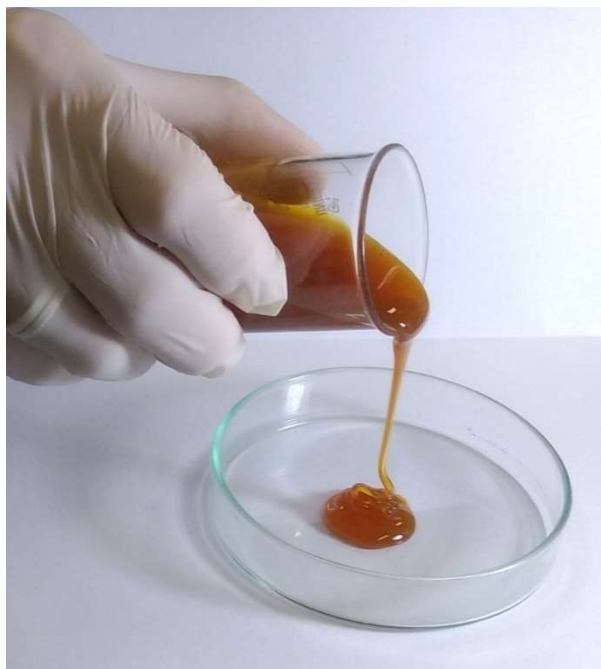


Fonte: (Embrapa, 2015)

A adição de água na degomagem tem grande importância devido ao produto final ter uma maior estabilidade, facilitando o refino. Justamente a afinidade com água, característica dos fosfolipídios, é a base para a obtenção das lecitinas (Mendes, 2000).

A mistura de fosfatídios ou fosfolipídios originados neste processo tem o nome de lecitina comercial, lecitina bruta ou também conhecida por lecitina de soja não branqueada (Figura 3), sendo a mais utilizada na indústria alimentícia, além de utilizada nas indústrias cosméticas e farmacêuticas em menor escala do que a lecitina branqueada (Castejon, 2010).

Figura 3: Amostra de lecitina bruta de soja, não branqueada.



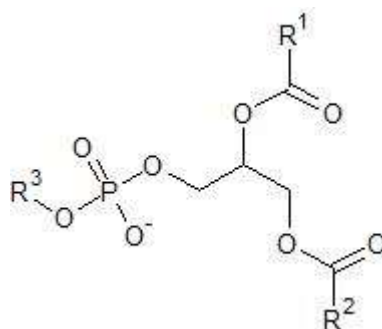
Fonte: O autor.

Dado o interesse industrial, os fosfolipídios são os componentes com maior valor agregado na mistura, porém, a lecitina comercial vem acompanhada de outros componentes que acarretam a depreciação no seu valor de mercado, devido à redução relativa do teor de fosfolipídios causada pela presença de triacilgliceróis (TAGs), ácidos graxos livres (AGLs), compostos intermediários de decomposição e principalmente carotenoides nativos e/ou degradados (Scholfield e Dutton, 1954; Scholfield, 1981; Pires *et al.*, 2017; More e Gogate, 2018; Ristić-Medić *et al.*, 2018).

3.4 FOSFOLIPÍDIOS (PLs)

Daicheng e Fucui (2011) observaram que a estrutura geral dos fosfolipídios é apresentada na Figura 4. A principal diferença entre cada fosfolipídio é o radical que está ligado ao grupo fosfato (R^3); porém podem haver diferenças nos ácidos graxos esterificados ao glicerol (R^1 e R^2) (Miranda, 2005).

Figura 4: Estrutura geral dos fosfolipídios.



Fonte: O autor.

Legenda: R¹ e R²: Ácidos graxos esterificados; R³: Grupamento que diferencia cada um dos fosfolipídios, podendo ser uma colina, etanolamina, inositol, serina, entre outros.

Os PLs podem ser encontrados em óleos vegetais e derivados, gema de ovo, soro de queijo, peixes, e *krill* encontrado na região da Antártida (Palacios e Wang, 2005; Zhu e Damodaran, 2011; Ali-Nehari e Chun, 2012; Burri *et al.*, 2012; Nguyen Tuyet *et al.*, 2014; M. Cabezas *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018; Zhou e Rakariyatham, 2018). Esta variedade de fontes fornece também uma variedade de PLs com os mesmos grupamentos “R³”, porém, com ácidos graxos esterificados “R¹ e R²” diferentes. Estas variações estruturais podem ser percebidas tanto no número de carbonos presentes na cauda alifática do ácido graxo, ou mesmo, na quantidade e posição das insaturações.

A Tabela 1 ilustra a composição (%) dos PLs provenientes das diferentes lecitinas de soja.

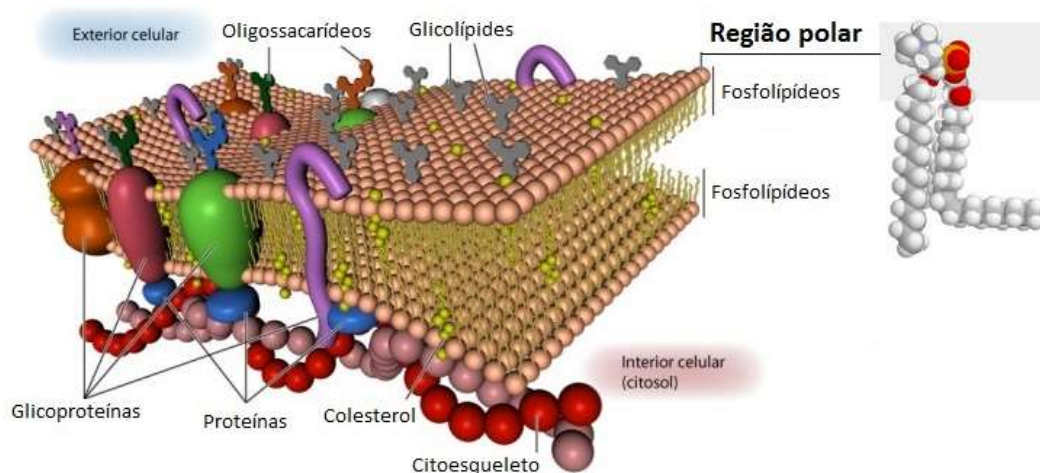
Tabela 1: Proporção dos fosfolipídios na lecitina bruta de soja.

Componente	Abreviação	Quantidade (%)		
		Baixo	Intermediário	Alto
Fosfatidilcolina	PC	12,0 – 21,0	29,0 – 39,0	41,0 – 46,0
Fosfatidiletanolamina	PE	8,0 – 9,5	20,0 – 26,3	31,0 – 34,0
Fosfatidilinositol	PI	1,7 – 7,0	13,0 – 17,5	19,0 – 21,0
Ácido Fosfatídico	PA	0,2 – 1,5	5,0 – 9,0	14,0
Fosfatidilserina	OS	0,2	5,9 – 6,3	-
Lisofosfatidilcolina	LPC	1,5	8,5	-
Lisofosfatidilinositol	LPI	0,4 – 1,8	-	-
Lisofosfatidilserina	LPS	1,0	-	-
Ácido Lisofosfatídico	LPA	1,0	-	-
Fitoglicolipídios	-	-	14,3 – 15,4	29,6

Fonte: (Szuhaj, 1989)

Os fosfolipídios constituem a maior parte do mosaico fluído da bicamada lipídica da membrana plasmática (Figura 5) dos animais, vegetais e microrganismos (Zwaal e Schroit, 1997; Christie, 2014a).

Figura 5: Representação da bicamada lipídica da membrana celular eucariote animal e a localização dos PLs.

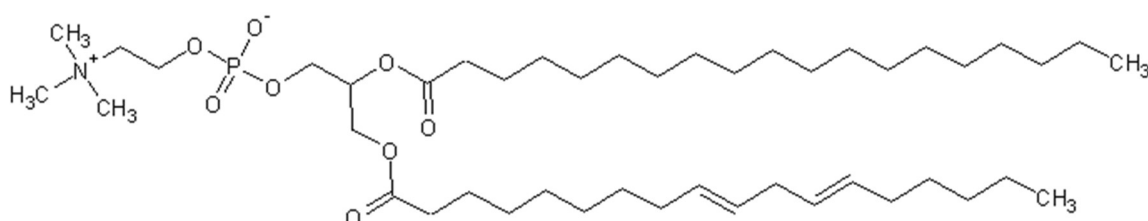


Fonte: (Miguel Jr, 2012).

3.4.1 Fosfatidilcolina (PC)

Na estrutura da PC são observados dois ácidos graxos esterificados ligados a um glicerol-3-fosfato, e uma colina na outra posição -OH do grupamento fosfato (Miranda, 2005), como apresentado na Figura 6.

Figura 6: Fórmula estrutural da Fosfatidilcolina (PC).



Fonte: O autor.

A Fosfatidilcolina (PC) é o principal componente da lecitina de soja comercial, constituindo aproximadamente 23% da mistura. Este fosfolípido é uma importante fonte de colina, a qual está envolvida no metabolismo dos grupamentos metil, nos transportes lipídicos, além de constituir importantes compostos biológicos como os PLs da membrana celular, fator de ativação plaquetária e neurotransmissor acetilcolina (Canty e Zeisel, 1994).

Mesmo a PC não sendo considerada um nutriente essencial para espécies animais, já que ela é produzida no organismo (Knuiman *et al.*, 1989), este fosfolípido é fundamental para manutenção da função hepática, prevenindo a distrofia e desenvolvimento de necroses nos hepatócitos, além de ativar os macrófagos e estimular a regeneração hepática por induzir a síntese e secreção do fator de necrose tumoral (Podobed *et al.*, 1995). Também foi observado que a PC juntamente com a Vitamina K2 atua contra a hepatocarcinogênese, ajudando a preservar as funções hepáticas de pacientes com câncer no fígado (Sakakima *et al.*, 2007).

A PC diminui a absorção do colesterol pelo intestino aumentando a sua secreção, assim como de sais biliares, pois quanto maior a quantidade de colesterol utilizado na produção destes sais, menor é a quantidade disponível para ser absorvida pelo organismo. Com o decréscimo da disponibilidade de colesterol para absorção, os níveis de HDL são elevados, favorecendo a saúde cardiovascular com a diminuição da quantidade de placas ateroscleróticas, reduzindo, assim, a chance do surgimento de problemas cardiovasculares (Miller, 2002).

Este fosfolípido é uma grande fonte de colina e vitaminas do complexo B. A colina é essencial para o bom funcionamento cerebral, já que 30% do peso seco do cérebro humano é referente a este composto e apresenta importante papel no desenvolvimento do hipocampo, além de áreas usadas para recuperação e formação da memória (Gormley, 1997; Buchman *et al.*, 2001).

Foram constatados em humanos e animais, infiltrações gordurosas no fígado quando verificados baixos níveis de colina, disponíveis para síntese de lipoproteínas e transporte de triacilgliceróis para fora do fígado, danos hepáticos e aumento da indução de carcinogênicos. Além disso, foram relatadas outras disfunções como a renal, infertilidade, hipertensão, danos a memória, retardo de crescimento e diminuição nos processos de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos constituintes do sangue (leucócitos, plaquetas e eritrócitos) (Canty e Zeisel, 1994; Miller, 2002).

As células do sistema imunológico sofrem efeitos da PC como observado por Calder *et al.* (2002), os quais concluíram que a ingestão de quantidades elevadas de fosfolípidios e ácidos graxos afeta na redução na proliferação de linfócitos e também na produção citocinas. Segundo estudos, realizados *in vitro*, foi possível concluir que ácidos graxos insaturados, como os fosfolípidios, harmonizam as funções do sistema

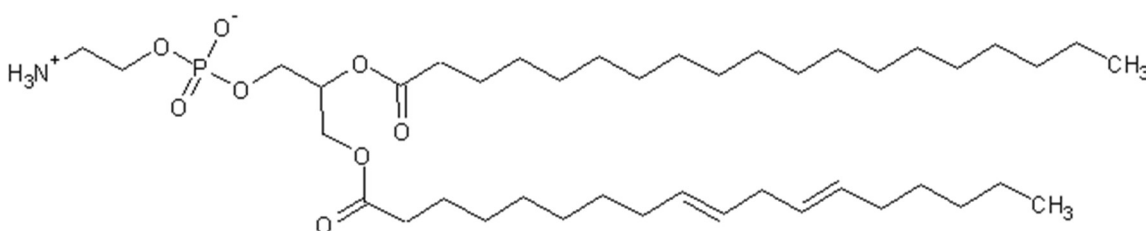
imunológico em respostas às ameaças ao organismo, enquanto os ácidos graxos saturados possuem efeito limitado. Outra constatação foi de que uma das principais moléculas sinalizadoras entre as células, o ácido araquidônico (gerado a partir da PC), quando em baixas concentrações devido a decomposição de lipídios provenientes da dieta, pode diminuir a formação das moléculas que sinalizam as respostas imunológicas (Calder, 2001).

3.4.2 Fosfatidiletanolamina (PE)

A Fosfatidiletanolamina (PE), anteriormente conhecida por cefalina, é geralmente encontrada na parte interna da membrana plasmática (Zwaal e Schroit, 1997). Este composto é o segundo fosfolipídio mais abundante nos animais e plantas, além de fazer parte da composição das membranas celulares dos microrganismos (Christie, 2014a).

Este fosfolipídio, cuja estrutura é ilustrada na Figura 7, foi isolado pela primeira vez por Outhouse (1936) em tumores malignos detectados em bovinos. Posteriormente, também foi encontrado nos tecidos cerebrais bovinos e intestino de ratos (Awapara *et al.*, 1950; Osterberg, 1960).

Figura 7: Fórmula estrutural da Fosfatidiletanolamina (PE).



Fonte: O autor.

Viel *et al.* (2012) demonstraram que um derivado da PE, o fosfatidiletanol, pode ser reconhecido como um biomarcador sanguíneo para ingestão e intoxicação crônica por bebidas alcoólicas.

Wellner *et al.* (2013) acilando a PE, obtiveram compostos precursores que estabilizam a isquemia cerebral em mamíferos, além de modular a ingestão de alimentos em roedores.

A pesquisa de Alves *et al.* (2017) demonstrou que as alterações no perfil lipídico e suas propriedades na membrana plasmática das células cancerígenas, principalmente na fluidez, destina-se ao desenvolvimento de modelos diferentes para avaliar a real ação da PE e da fosfatidilserina (PS) na exposição da camada externa. Também explica a influência causada pelo colesterol no sistema “membrana-interações” para entender o quão específico é cada mudança de composição lipídica na membrana da célula cancerígena, e o quanto isto pode refletir no comportamento das drogas utilizadas para o tratamento do câncer.

Korematsu *et al.* (2017) publicaram um estudo constatando que crianças que sofreram infarto cerebral (quadro raro nesta faixa etária) sem ligações com doenças como a de moyamoya (doença cerebrovascular oclusiva crônica), questões hereditárias, vasculites, doenças cardíacas entre outras, ou seja, sem uma causa aparente, possuíam altos níveis de anticorpos anti-PE e anticorpos anti-PC. Os autores não afirmam que os altos níveis destes anticorpos são responsáveis pelos infartos, porém, relacionam que nesta condição a PE e a PC são componentes importantes das membranas celulares, grandes constituintes cerebrais. Tendo como base relatórios anteriores, os autores concluíram que os altos níveis de anti-PE e anti-PC podem aumentar o risco de trombose e aterosclerose mesmo em pacientes totalmente saudáveis.

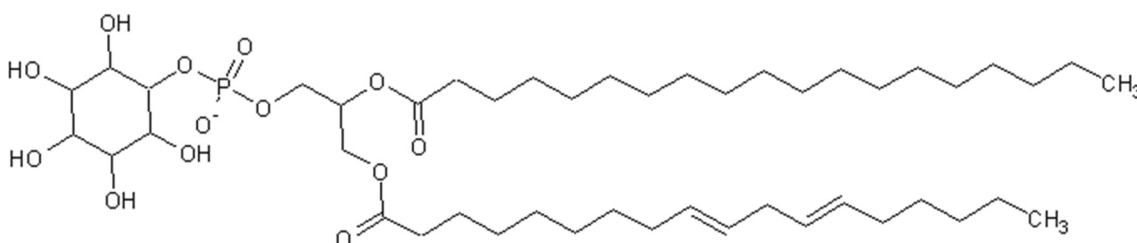
Uma das finalidades estudadas recentemente para a PE, e a fosfoetanolamina, é a utilização para tratamento de câncer (Meneguelo, 2007),

Ferreira *et al.* (2013), concluíram que a PE sintética é citotóxica e induz as linhas celulares que causam a leucemia à apoptose pela rota mitocondrial *in vitro*. Nos estudos *in vivo* a PE produz um efeito anti-proliferativo nas células cancerígenas, atuando até mesmo em células cancerígenas ainda imaturas.

3.4.3 Fosfatidilinositol (PI)

É um PL aniônico (ácido) constituído por um ácido fosfatídico como suporte ao grupo inositol (hexahidroxíciclohexano), como representado na Figura 8 (Christie, 2014b). O fosfatidilinositol (PI) age tanto como constituinte chave da membrana plasmática celular quanto faz parte de processos metabólicos essenciais em plantas e animais.

Figura 8: Fórmula estrutural do Fosfatidilinositol (PI).



Fonte: O Autor.

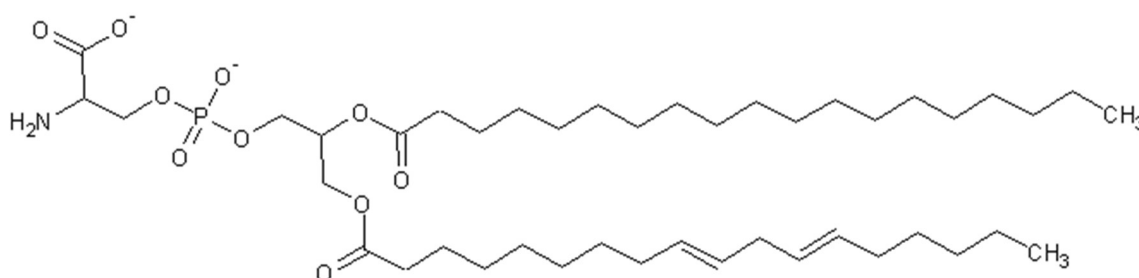
O PI é um componente crítico para a sinalização e ancoragem na parte interna da célula para proteínas, e na parte externa da membrana celular para carboidratos, mesmo sendo o fosfolipídio encontrado em menor quantidade nesta (Angala *et al.*, 2014). Este PL é encontrado especialmente em tecidos cerebrais, podendo constituir 10% da quantidade de fosfolipídios do corpo humano, além de ser encontrado em todas as células do organismo (Christie, 2014b).

O metabolismo do Fosfatidilinositol tanto via da fosforilação (adicionando grupos fosfato aos oxigênios ligados ao anel carbônico do inositol), quanto por desfosforilações sequenciais, seguido da retirada do inositol fosfato, mostra os tipos de diversos isômeros do inositol fosfato (Shears, 1998), as quinases Inositol fosfatases (InsP) (Verbsky *et al.*, 2005), além das fosfatases (Majerus *et al.*, 1999). A principal função do PI é servir de precursor para outras moléculas importantes no correto funcionamento celular (Pendaries *et al.*, 2003), tais moléculas são agrupadas no grupo dos Fosfatidilinositídeos.

3.4.4 Fosfatidilserina (PS)

Este PL possui um grupamento serina ligado ao grupamento fosfato, além de possuir variações estruturais contendo uma ou duas cadeias saturadas ou insaturadas ligadas ao glicerol, conforme Figura 9 (Glassman *et al.*, 2018).

Figura 9: Representação da estrutura química da PS.



Fonte: O autor.

É a maior classe de PL aniônico encontrada, principalmente, no interior da bicamada lipídica de tecidos neurais. A PS é sintetizada pela catálise realizada pela fosfatidilserina sintase 1 a partir da PC, e fosfatidilserina sintase 2 da PE, pela remoção dos grupamentos pós fosfato e adicionando grupamento serina (Kim *et al.*, 2014).

Sua exposição e assimetria estão ligados à apoptose e mais diretamente aos sistemas de entrega de drogas (*drug delivery system*), já que sua exposição serve como um alerta que induz sinais ao sistema imunológico para que a região seja “limpa”, antes que maiores danos possam ocorrer (Fadok *et al.*, 1998; Chaurio *et al.*, 2009; Leventis e Grinstein, 2010; Li *et al.*, 2015; Birge *et al.*, 2016). Estes sinais conhecidos como “ache-me, coma-me e ignore-me/tolere-me” são importantes para o sistema imunológico para que o organismo não desenvolva respostas contra suas próprias proteínas (Glassman *et al.*, 2018).

A PS melhora a memória e aprendizagem em ratos d’água *Muris* (ministrada via oral) (Lee *et al.*, 2010), tem potencial nutracêutico contra o processo neurodegenerativo em cães de idade avançada (Osella *et al.*, 2008), além de ser um importante componente bioativo do HDL (*“High Density Lipoprotein”*), que abordado de forma terapêutica atenua a aterosclerose vascular (Darabi *et al.*, 2016).

3.5 PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS

3.5.1 Formas convencionais de purificação dos fosfolipídios

Algumas das formas utilizadas frequentemente nos processos industriais para obtenção dos PLs purificados são: extração por solventes, extração supercrítica por dióxido de carbono e purificação por ultrafiltração (Daicheng e Fucui, 2011). Estas formas de purificação são descritas, de forma simplificada, a seguir.

3.5.1.1 *Extração por solventes*

Na extração por solventes são adicionados 30%(v) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e os PLs, em um reator com agitação de sistema fechado. Em seguida há o bombeamento de acetona para o interior do reator com a finalidade de impregnar o concentrado de PLs. Estes PLs após impregnados concentram-se no fundo do compartimento e são submetidos, novamente, a agitação. A mistura é deixada estática para sedimentação, o sobrenadante é recolhido e o processo de agitação com acetona pode ser repetido mais vezes. Os PLs decantados são centrifugados, secos e destinados a utilização (Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b; Liu, 2007).

3.5.1.2 *Extração supercrítica por dióxido de carbono*

Na extração supercrítica (estado onde desaparece a distinção entre os estados líquido e gasoso) são consideradas três variáveis: temperatura, pressão e tempo. O rendimento da extração varia com o aumento de uma dessas variáveis em uma certa escala enquanto as outras duas permanecem inalteradas. Os maiores limitantes desta técnica são os fatores de risco, o aumento de custos e a quantidade de energia consumida. O parâmetro de temperatura para o CO₂ extrator não constitui

barreira, já que a temperatura crítica (T_c) para este gás é 31,1 °C. Já a pressão crítica (P_c) 72,9 atm, exigindo compressor especial (Moldoveanu e David, 2015).

Esta técnica segue a tendência atual da química “verde”, já que não gera solventes residuais, é segura e confiável, gerando produtos de alto grau de pureza, fatores significantes para a indústria (Shi, 2005).

3.5.1.3 Purificação por ultrafiltração

Neste processo, os PLs brutos são submetidos ao processo “*deracination*” (um processo de retirada de óleos e gorduras) e então dissolvidos em solventes e encaminhados para ultrafiltração em filmes de porosidade desejada. As partículas que passam pela membrana são coletadas e isoladas. A *Archer Daniels Midland Co.*, possui a propriedade intelectual deste método.

Esta técnica pode ser precisamente quantificada e usada convenientemente em situações em que os requisitos para remoção de sabores desagradáveis são necessários (Shi, 2005). O fracionamento/purificação de lipídios e fosfolipídios, através de membranas (ultra-, micro-, nano-variantes), é um processo de exclusão por tamanho molecular e formato aplicando-se pressão. Dependendo da natureza da membrana também pode ser explorada a natureza e intensidade da(s) carga(s) dos componentes (Koris e Vatai, 2002).

Com aproximação TAGs e PLs estão na faixa diferencial de 900 e 800 kDaltons. Esta faixa pode ser explorada denotando o grande potencial destas membranas. O problema é o elevado custo do material filtrante, em parte aliviado pela regeneração (lavagem) e reutilização.

3.5.2 Técnicas alternativas para purificação de PLs

Buscando alternativas viáveis tanto econômica, quanto ambientalmente, e levando em conta o desenvolvimento de novas tecnologias, faz-se necessário a

pesquisa de novos materiais adsorventes para o tratamento de diversos produtos e a reutilização de resíduos anteriormente descartados, minimizando os custos para as partes envolvidas. Conseqüentemente está em pauta um destino ambientalmente correto, além da utilização de materiais com pouco impacto ambiental, seja na sua extração, sintetização ou disposição final.

Entre estas alternativas, é sugerido neste trabalho a aplicação de um resíduo celulósico da indústria têxtil, denominado Pó de Algodão da Varredura Têxtil (PAVT), derivatizado para formas iônicas ácidas ou básicas (PAVT-CM ou PAVT-DEAE) para sua utilização como material adsorvente pelo mecanismo de troca iônica, já que os PLs ou são aniônicos (PI – fosfatidilinositol) ou anfóteros (PC – fosfatidilcolina, PE-fosfatidiletanolamina e PS-fosfatidilserina).

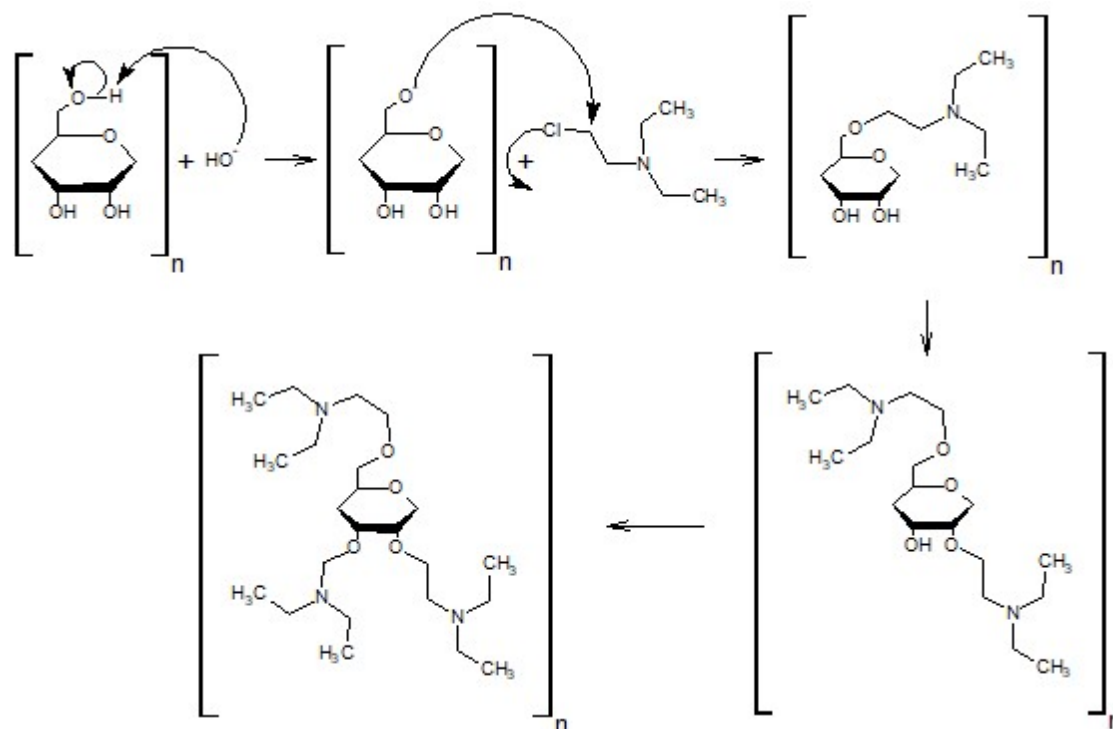
3.6 Pó de Varredura de Algodão Têxtil (PVAT)

Pó de Varredura de Algodão Têxtil (PAVT) é um descarte na tecelagem de fios de algodão. Acumula-se em torno dos teares dadas suas fibras mais curtas e mais leves. Numa indústria têxtil de grande porte – tal qual a DOHLER S/A, Joinville-SC, fornecedora deste material. Quando em regime de processamento exclusivo de fios de algodão se acumula, diariamente, um volume médio de 1,5 tonelada. Seu destino exclusivo, pós varredura, é a queima para gerar vapor. Logo, o aproveitamento deste subproduto, com prévia derivatização para atuar como matriz trocadora iônica na purificação de fosfolipídios é um empreendimento tecnológico de grande valia, pois os preços internacionais para estas resinas preparadas a partir de AVICEL – celulose de pinho ou eucalipto, como exemplos, são bastante elevados. Tomando por base o preço médio, ora pedido pelos maiores fabricantes, este se situa em US\$ 640.kg⁻¹ (Molbase, 2018; Sigma-Aldrich, 2018).

3.6.1 Dietilaminoetilação (DEAE⁺)

A dietilaminoetilação (DEAE⁺) na celulose é utilizada com o objetivo de gerar cargas positivas nas fibras, ocorrendo a inserção de grupos amina quaternária, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato inicial, como observado nos trabalhos de Rousseau *et al.* (1984) e Garegg e Roberts (1996). A produção de matrizes DEAE⁺ ocorre em duas etapas, sendo a primeira caracterizada pela mercerização da celulose, onde foram pesados 10 g de PAVT em Erlenmeyer de 1000 mL, e adicionado 500 mL de solução de Hidróxido de Sódio 20% até que as fibras estivessem encharcadas, e deixadas sob agitação a 35 °C, por 1 hora. A segunda etapa consistiu na adição de 17,25 g de 2-Cloro-N,N-dietilaminoetil·HCl, e agitação a 70 °C por 90 minutos. Após o termino da agitação, o material foi filtrado e lavado com água de osmose reversa até neutralização do pH (Fontana *et al.*, 2016) formando uma matriz catiônica, como representado na Figura 10 (Rousseau *et al.*, 1984).

Figura 10: Síntese de DEAE⁺-celulose.



Fonte: (Fontana *et al.*, 2016).

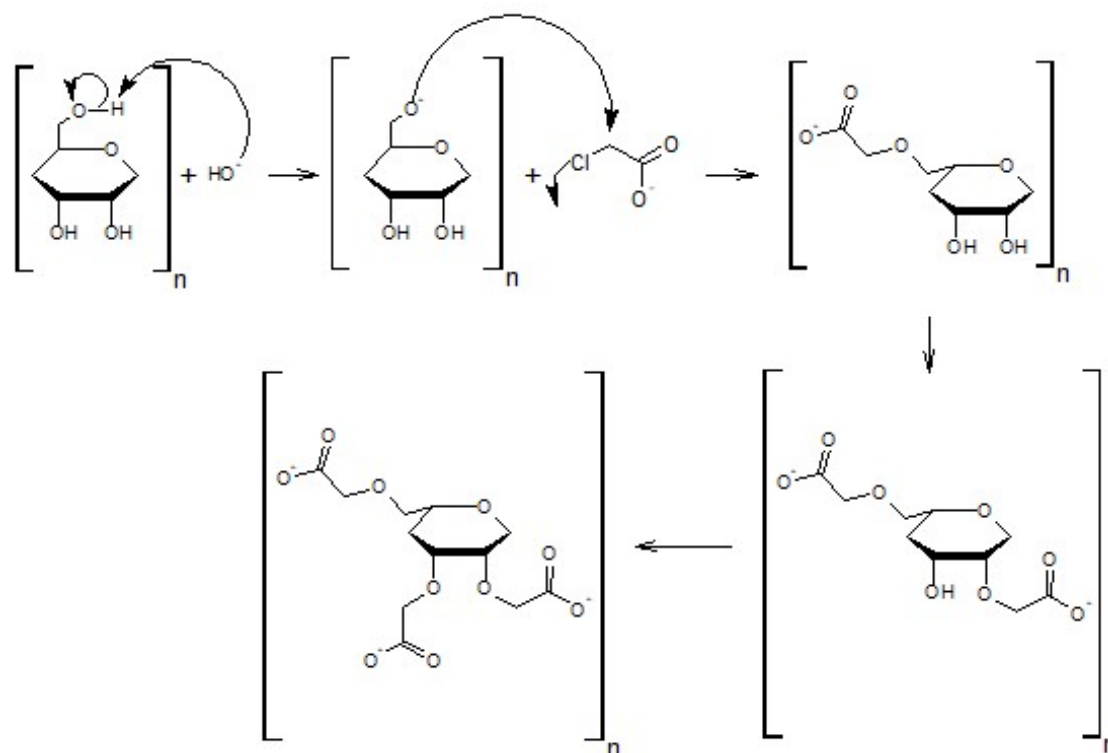
3.6.2 Carboximetilação (CM⁻)

O processo de carboximetilação (CM⁻ celulose) é empregado com o intuito de criar íons negativos na matriz submetida a este processo, sendo realizado com ácido monocloroacético ou com monocloroacetato de sódio.

Tal qual a matriz celulósica neutra – o PAVT – é também pré-mercerizada com álcali forte. Muitos pesquisadores utilizam esta técnica para substituir as hidroxilas da celulose por grupos carboxílicos, derivatizando o material ao ponto de torná-lo hidrossolúvel, ou seja, três substituintes CM⁻ em cada resíduo de anidroglicopiranosose e daí uma matriz que gelatiniza em água, interessante para algumas aplicações, inconveniente para outras (caso desta pesquisa) (Kutsenko *et al.*, 2005; Pushpamalar *et al.*, 2006; Yaşar *et al.*, 2007; Cheng e Biswas, 2011; Baldo, 2014; Baldo *et al.*, 2014).

O processo pode também ser utilizado para alcançar substituições parciais, permitindo que os compostos celulósicos continuem insolúveis em água, porém, que tenham adquirido a capacidade de retenção de compostos catiônicos (Chen e Wang, 2006; Gong *et al.*, 2006; Wang e Wang, 2008; Carvalho *et al.*, 2011; Baldo *et al.*, 2014). Neste processo, 10 g de PAVT foram impregnados com 500 mL de NaOH 20% e levado a agitação por 1 hora a 35 °C, inchando as fibras afim de promover a disponibilização dos grupamentos OH localizados internamente. Além disso, o NaOH funciona como agente catalisador da reação formando estruturas alcóxido, permitindo que após a adição de 15 g de ácido monocloroacético, e levado a agitação por 90 minutos a 70 °C seja formada uma matriz aniônica (Adinugraha *et al.*, 2005; Wang e Wang, 2008; Baldo *et al.*, 2014) como representado na Figura 11.

Figura 11: Reação de carboximetilação.

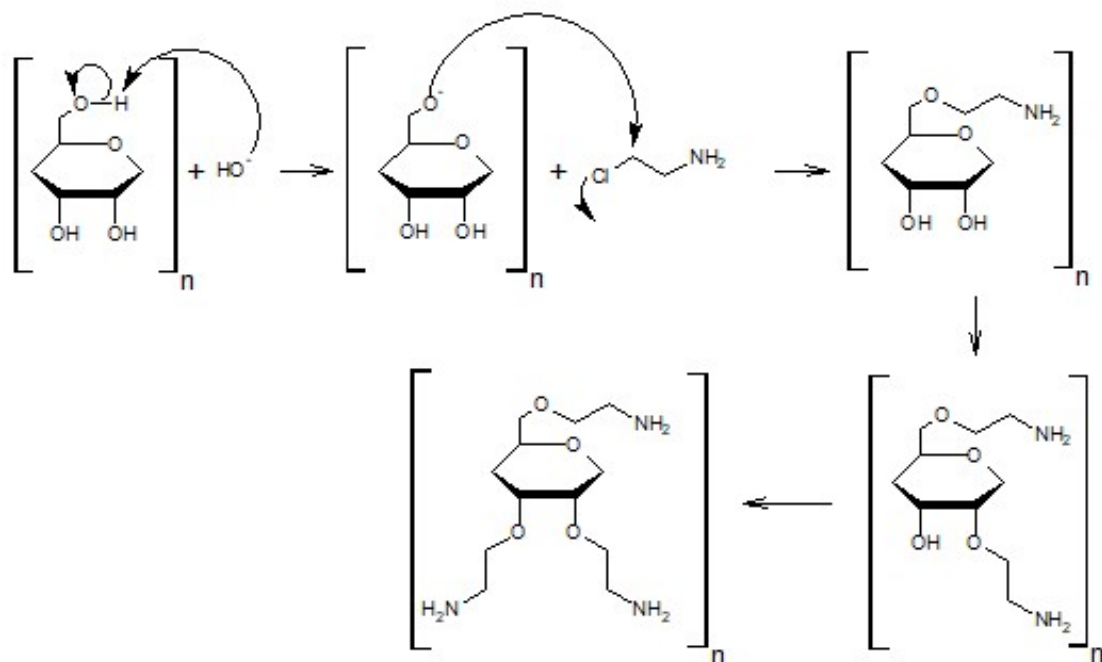


Fonte: (Baldo *et al.*, 2014).

3.6.3 Etilaminoetilação (AE⁺)

Assim como dietilaminoetilação (DEAE⁺), a Etilaminoetilação (AE⁺) da celulose é utilizada com o objetivo de gerar cargas positivas nas fibras, porém nesta derivatização são inseridos grupos etilamino, ou seja, amina primária. A produção de matrizes AE⁺ também ocorre em duas etapas: A primeira etapa foi a mercerização da celulose, onde foram pesados 10 g de PAVT em Erlenmeyer de 1000 mL, e adicionado 500 mL de solução de Hidróxido de Sódio 20% até que as fibras estivessem encharcadas, e deixadas sob agitação a 35 °C, por 1 hora. A segunda etapa consistiu na adição de 23,6g de 2-Cloro-aminoetil·HCl, e agitação a 70 °C por 90 minutos. Após o termino da agitação, o material foi filtrado e lavado com água de osmose reversa até neutralização do pH

O éter catiônico PAVT-AE⁺ (Figura 12) é sintetizado de forma análoga ao PAVT-DEAE⁺, anteriormente descrito.

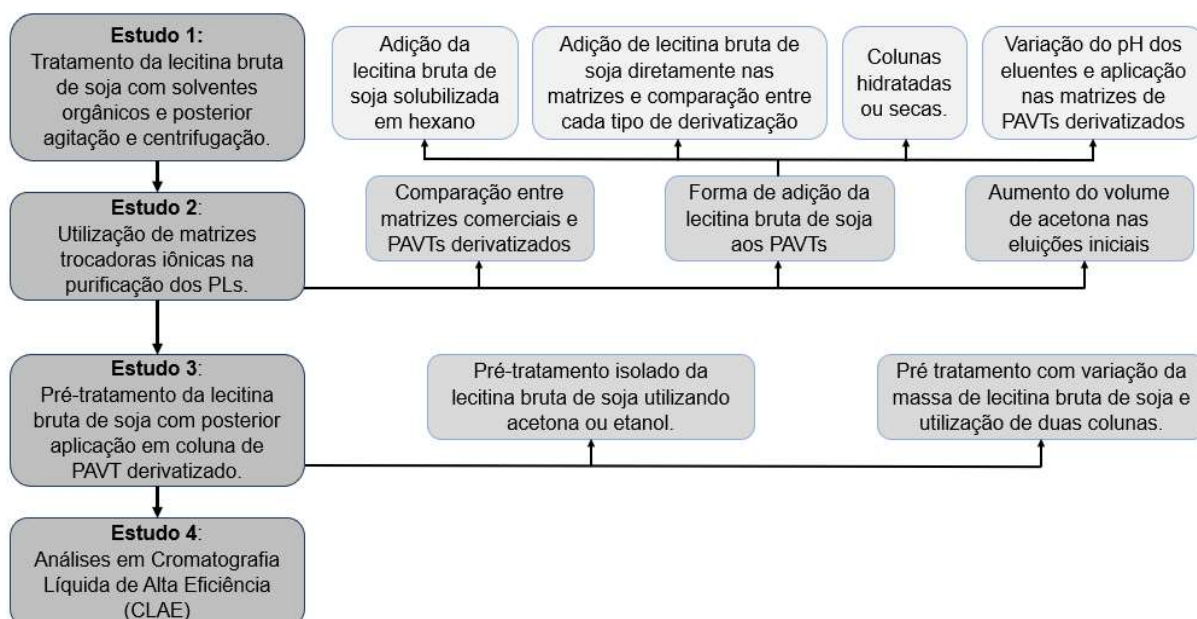
Figura 12: Representação da estrutura do PAVT-AE⁺.

(Fonte: O autor).

4 METODOLOGIA

A metodologia aplicada nesta pesquisa foi subdividida em “Estudos” com focos específicos que culminaram nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme demonstrado no fluxograma a seguir (Figura 13).

Figura 13: Fluxograma da metodologia aplicada.



Fonte: O autor.

O trabalho foi integralmente realizado no Laboratório de Químico-Biotecnologia de Biomassa (LQBB), utilizando toda a estrutura de materiais e reagentes disponível. O Pó de Algodão da Varredura Têxtil (PAVT) foi fornecido pela Döhler S/A (Joinville/SC), já a lecitina bruta de soja foi fornecida pela IMCOPA S/A (Araucária-PR).

A técnica de análise empregada nos resultados com as amostras foi a cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com vapor de iodo seguida por nebulização do Reagente de Vaugh (Charring). O método é extremamente ágil, qualitativo e permite o mapeamento de até 15 amostras (de forma que a resolução não seja afetada) por cromatoplaça de 10 x 10 cm. Foram utilizadas cromatoplaças de sílica gel em suporte de alumínio das marcas Whatman e Merck sem fluorescência.

4.1 Estudo 1: Tratamento da lecitina bruta de soja com solventes orgânicos e posterior agitação e centrifugação.

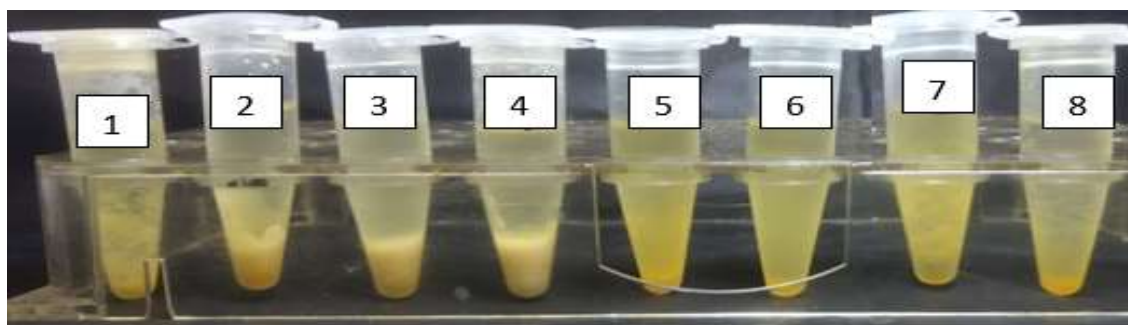
Para fins de enriquecimento/purificação da lecitina bruta de soja foram utilizados os seguintes solventes no experimento (Tabela 2):

Tabela 2: Índice de polaridade de alguns compostos utilizados como solventes orgânicos.

Condição	Solvente	Índice de polaridade
0	<i>n</i> -Hexano	0,0
1	Metanol	5,1 – 6,6
2	Etanol	5,2
3	<i>iso</i> -propanol	3,9
4	Acetona	5,1 – 5,4
5	Metiletilcetona (Butanona)	4,5 – 4,7
6	<i>n</i> -Butanol	4,0
7	Álcool isoamílico	---
8	Acetonitrila	5,8 – 6,0
	Água	9,0

Em tubos cônicos plásticos *Eppendorf* de 1,5 mL foram pesados 50 mg de lecitina bruta de soja e adicionado 1 mL de cada solvente em teste (Figura 14), agitados em Vortex para a completa homogeneização, seguindo-se de centrifugação em uma minicentrífuga Spin a 6436xg durante 15 minutos.

Figura 14: Lecitina de soja bruta após a adição dos solventes e agitação.

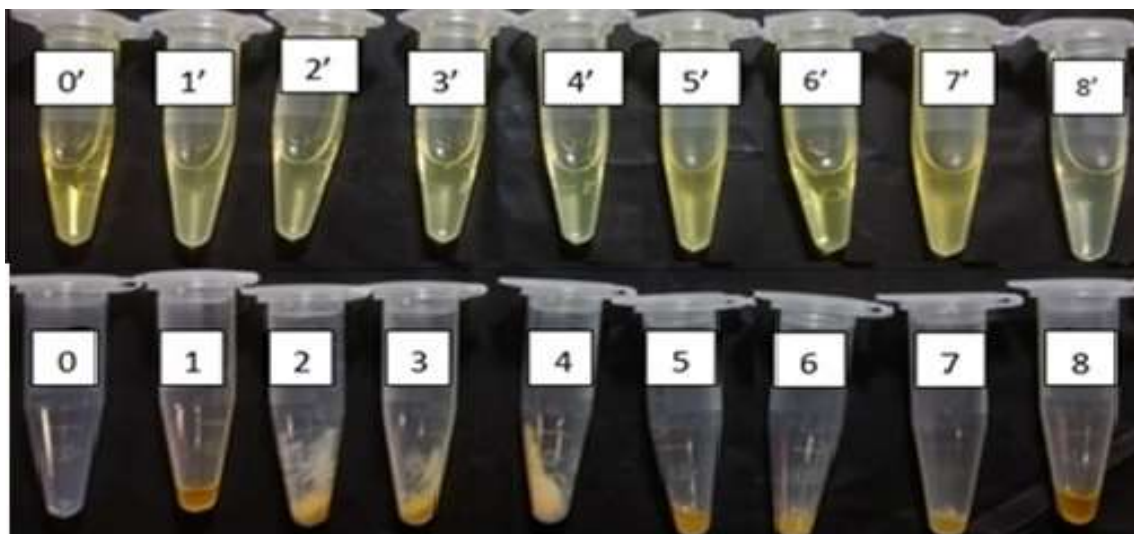


Fonte: O autor.

Legenda: O número em cada frasco identifica qual solvente foi adicionado: 1-Metanol; 2-Etanol; 3-*iso*-propanol; 4-Acetona; 5-Metiletilcetona; 6-*n*-Butanol; 7-Álcool Isoamílico; 8-Acetonitrila.

O sobrenadante gerado foi recolhido em outro recipiente (Figura 15), e o precipitado resultante ressolubilizado em 1 mL de clorofórmio : metanol (2 : 1 v/v).

Figura 15: Sobrenadante separado do precipitado após centrifugação.



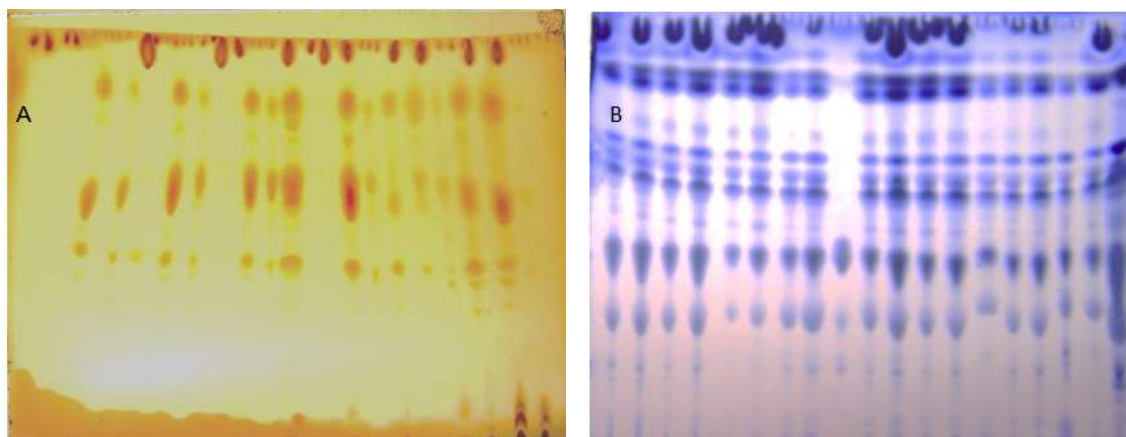
Fonte: O autor.

Legenda: O número em cada frasco identifica a fração obtida de cada solvente foi adicionado: Sobrenadante: 1'-Metanol; 2'-Etanol; 3'-*Iso*-propanol; 4'-Acetona; 5'-Metiletilcetona; 6'-*n*-Butanol; 7'-Álcool Isoamílico; 8'-Acetonitrila; Precipitado: 1-Metanol; 2-Etanol; 3-*Iso*-propanol; 4-Acetona; 5-Metiletilcetona; 6-*n*-Butanol; 7-Álcool Isoamílico; 8-Acetonitrila.

Por fim, as amostras foram encaminhadas para cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplasmas de sílica gel (SG 60; Merck) utilizando como fase móvel a mescla clorofórmio : metanol : acetona : água (60 : 27 : 21 : 6 v/v). A avaliação dos resultados ocorreu após o tingimento da placa com vapores de iodo seguido do reagente de “charring” de Vaugh, composta por sulfato de cério : molibdato de amônio : sulfato de cobre : ácido sulfúrico : água, este a quente (105-110 °C por 1 a 2 minutos em placa aquecedora).

A fase móvel mostrou elevada capacidade de resolução para as espécies lipídicas de interesse: a família de fosfolípidios (ácido fosfatídico (PA), PC, PE, PI e PS) com menores migrações (R_f) e os triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs), monoacilgliceróis (MAGs) e ácidos graxos livres (AGLs), com migração mais elevada e na fronteira da placa. O segundo revelado (“charring” de Vaugh) permite a distinção até de uma dúzia de diferentes componentes, enquanto o primeiro (vapores de iodo) é mais limitado pois revela apenas lipídios que possuam pelo menos um ponto de insaturação. Para melhor compreensão desta técnica, são apresentados na Figura 16 as duas formas utilizadas em sequência de revelação dos resultados:

Figura 16: Exemplos de cromatoplasacas reveladas com (A) vapor de iodo, e (B) “charring” de Vaugh.



Fonte: O autor.

Legenda: Análise de amostras de purificação dos PLs em cromatoplasacas reveladas sequencialmente com (A) Vapor de iodo e (B) Charring de Vaugh.

4.2 Estudo 2: Utilização de matrizes trocadoras iônicas na purificação dos PLs.

Foram testadas variações de matrizes (diferentes formas derivatizadas e matrizes comerciais), formas de adição da lecitina bruta de soja às matrizes, adição de água ao sistema, variação do pH e volume do solvente usado nas eluições.

4.2.1 Comparação entre matrizes comerciais e PAVTs derivatizados.

Para este teste foram preparadas quatro colunas nas quais foram adicionados 50 mg de lã de vidro (afim de evitar que o recheio da coluna fosse carregado), e cada uma das colunas foi montada com 300 mg de Sephadex C-25 (matriz comercial carboximetilada), PAVT-CM⁻, Sephadex A-25 (matriz comercial dietilaminoetilada) e PAVT-DEAE⁺. Em cada uma das colunas foram aplicados 90 mg de lecitina bruta de soja ressuspendidos em 1 mL de hexano. Em seguida, foram aplicados à coluna 9 mL (3 vezes o volume ocupado pelas matrizes) dos solventes a seguir, formando um gradiente de polaridade: 1: hexano; 2: clorofórmio; 3: clorofórmio : metanol (8 : 2 v/v); 4: clorofórmio : metanol : água (5 : 5 : 1 v/v); 5: clorofórmio : metanol : solução saturada

de acetado de amônio (5 : 5 : 1 v/v); 6: clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (5 : 5 : 1 v/v).

As frações obtidas a partir de cada eluição foram recolhidas separadamente, identificadas e aplicadas em cromatoplasca (SG 60 Whatman). A cromatografia utilizou duas fases móvel diferentes, sendo a primeira composta por clorofórmio : metanol : ácido acético : água (20 : 9 : 3 : 1,5 v/v) visando unicamente a migração dos PLs da base até a altura equivalente a 1/3 da placa, momento em que a cromatoplasca foi retirada da cuba e o solvente evaporado com fluxo de ar quente. A segunda fase móvel constituída por hexano : éter etílico : ácido acético (82 : 18 : 1 v/v) teve a corrida da base da placa até aproximadamente 5 mm do fronte. O método de revelação da placa foi o mesmo citado anteriormente.

4.2.2 Forma de adição da lecitina bruta de soja aos PAVTs

De posse dos dois melhores solventes para a purificação dos PLs (acetona e metiletilcetona, marca Vetec - Brasil), os quais favorecem a precipitação dos PLs e solubilizam preferencialmente os TAGs, DAGs, MAGs e AGLs (contaminantes), foram testadas diferentes formas de aplicação nas colunas recheadas com as matrizes de troca iônica (PAVT-AE⁺, PAVT-DEAE⁺, PAVT-CM): (a) amostras de lecitina bruta de soja previamente solubilizadas no menor volume possível de solvente; (b) diretamente, mediante homogeneização da lecitina bruta de soja numa parcela da matriz com auxílio de graal e pistilo; (c) utilização de solventes hidratados (5% de água), na crença de que isto poderia facilitar a ionização dos PLs e incrementar a capacidade de adsorção nas matrizes; (d) variação do pH dos eluentes.

Também foi explorada a relação gravimétrica “mg matriz: mg de lecitina bruta de soja” (no decorrer de alguns experimentos) com a proporção mais frequente de 300 : 90. Finalmente, com base na estimativa qualitativa proporcionada por CCD, ou seja, uma relação de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs (contaminantes): PC, PE, PI (compostos visados; juntamente com teores menores de PA e PS) na faixa de 60 : 40 – 40 : 60, as colunas de troca iônica, alternativamente, também receberam aplicação,

comparativamente, dos sobrenadantes e precipitados prévios com acetona e portanto já enriquecidos no teor de PLs totais.

4.2.2.1 *Adição da lecitina bruta de soja solubilizada em hexano*

Foram preparadas colunas contendo 300 mg de 1) PAVT-DEAE⁺, 2) PAVT-CM⁻ e 3) PAVT-AE⁺, nas quais foi adicionado 1 mL da suspensão de lecitina bruta de soja em hexano (90 mg.mL⁻¹). Em seguida cada coluna foi lavada duas vezes com 4 mL de acetona ou 4 mL de metiletilcetona, gerando duas amostras para cada solvente (Tabela 3).

Tabela 3: Exemplificação do procedimento de aplicação e lavagem das colunas.

Condição	Solvente	Amostra	
1 - PV-DEAE ⁺	Acetona	A1	A2
	Metiletilcetona	E1	E2
2 - PV-CM ⁻	Acetona	A1	A2
	Metiletilcetona	E1	E2
3 - PV-AE ⁺	Acetona	A1	A2
	Metiletilcetona	E1	E2

Fonte: O autor

Legenda: A1: Primeira eluição com acetona; A2: Segunda eluição com acetona; E1: Primeira eluição com metiletilcetona; E2: Segunda eluição com acetona.

As amostras coletadas tiveram seus volumes normalizados e encaminhadas para CCD utilizando a fase móvel antes descrita.

4.2.2.2 *Adição de lecitina bruta de soja diretamente nas matrizes e comparação entre cada tipo de derivatização.*

Todos os tubos utilizados para a coleta das amostras foram previamente identificados e tarados, afim de realizar o balanço de massa e mapear quanto de cada composto (ou mistura de compostos) foi removido em cada lavagem.

Foram preparadas colunas individuais de 1) PAVT-AE⁺, 2) PAVT-CM⁻ e 3) PAVT-DEAE⁺, contendo 200 mg de cada matriz. Outras alíquotas de mais 100 mg

foram pesadas e cada qual homogênea impregnada com 90 mg de lecitina bruta de soja, e depositada no topo de cada coluna.

Em seguida foi realizada uma sequência de 5 lavagens em cada coluna, sendo que cada lavagem envolveu 18 mL de cada solvente. As lavagens foram: A) e B) acetona; C) e D) acetato de etila, na tentativa da remoção dos TAGs e AGLs pouca perda da carga de PLs; e por fim, E) clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v) afim de remover quantitativamente toda massa ainda retida na coluna, ou seja, os PLs enriquecidos ou purificados de interesse e ao mesmo tempo regenerar as colunas.

O solvente contido nas amostras foi evaporado em fluxo constante de ar e banho maria com temperatura máxima de 50 °C. Após a evaporação do solvente, as amostras foram ainda liofilizadas *overnight* para completa remoção de qualquer umidade.

Em seguida, os tubos foram novamente pesados e então lavados de forma sequencial com 1 mL de éter etílico e 2 mL de clorofórmio : metanol (2 : 1 v/v). Cada amostra obtida foi transferida para um vial de 4 mL, e os volumes foram normalizados para facilitar a análise por CCD e propiciar uma avaliação mais precisa do perfil qualitativo de cada eluato das colunas.

4.2.2.3 *Colunas hidratadas ou secas*

Simultaneamente, ao procedimento “Adição de lecitina bruta de soja diretamente nas matrizes”, foi realizado o teste com as mesmas colunas (PAVT-DEAE⁺, PAVT-CM⁻ e PAVT-AE⁺) com e sem adição de água para avaliar se esta iria favorecer a ionização e melhor adsorção da família dos PLs e/ou uma eluição seletiva das mesmas.

Novamente mantiveram-se as condições da proporção gravimétrica matriz de troca iônica : amostra de lecitina bruta de soja e esquema de eluição. As combinações dos diferentes parâmetros são indicadas na Tabela 4.

Tabela 4: Sequência de lavagem das colunas para comparação com e sem água.

Matriz	Lavagem A	Lavagem B	Lavagem C
PAVT-AE⁺	Acetona Acetona 95%		
PAVT-CM⁻	Acetona Acetona 95%	Acetato de etila	CF:MeOH:NH ₄ OH (30 : 16 : 3 v/v)
PAVT-DEAE⁺	Acetona Acetona 95%		

Fonte: O autor

Legenda: CF: Clorofórmio; MeOH: Metanol; NH₄OH: Hidróxido de amônio.

4.2.2.4 *Variação do pH dos eluentes e aplicação nas matrizes de PAVT derivatizados.*

Foram preparadas colunas contendo 300 mg de cada matriz (PAVT-DEAE⁺, PAVT-CM⁻ e PAVT-AE⁺) e 90 mg de lecitina bruta de soja. Para eluição das colunas foi testado acetona, metiletilcetona e etanol anidro em pH 5 (acidificado com solução de ácido acético 1 mol.L⁻¹ e 0,1 mol.L⁻¹), pH 6,5 (pH nativo da suspensão de lecitina bruta de soja) e pH 8 (alcalinizado com solução de hidróxido de amônio 1 mol.L⁻¹ e 0,1 mol.L⁻¹). Foram utilizados estes valores de pH para que a PC e PE (os dois PLs com maior presença na lecitina bruta de soja) ficassem em forma anfótera, porém compreendida no estado de transição entre moléculas com carga positiva para carga negativa (Gupta, 1986; Dijkstra, 2014).

A primeira eluição foi realizada com solvente nos pHs anteriormente citados, seguida por solvente com acetato de amônio a 0,1 M, e por fim, a terceira eluição realizada com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio 0,2 M (2 : 1 : 0,1 v/v).

As amostras obtidas, contendo solvente, foram encaminhadas para secagem em fluxo constante de ar e liofilizadas. Sequencialmente, foram ressolubilizadas em clorofórmio : metanol (2 : 1 v/v) de modo que tivessem concentração de 50 mg.mL⁻¹, e encaminhadas para cromatografia em camada delgada.

4.2.3 Aumento do volume de acetona nas eluições iniciais

Para melhorar a eficiência de remoção dos TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, já nas eluições iniciais (lavagens com acetona), foi aumentado o volume de acetona em cada aplicação. Anteriormente foram utilizados 18 mL (equivalente a seis vezes o volume preenchido na coluna pela matriz) em cada eluição para 60 mL (equivalente a 20 vezes o volume preenchido na coluna pela matriz) em cada lavagem, justamente para disponibilizar solvente em excesso na eluição dos compostos citados anteriormente. As demais condições operacionais foram mantidas.

As massas de matriz (300 mg) e lecitina bruta de soja (90 mg), e as eluições subsequentes foram mantidas.

4.3 Estudo 3: Pré-tratamento da lecitina bruta de soja com posterior aplicação em coluna de PAVT derivatizado.

Considerando que a amostra original de lecitina bruta de soja contém em torno de 50% de contaminantes (TAGs, DAGs, MAGs e AGLs), foi avaliado que o procedimento de enriquecimento ou idealmente purificação da fração de interesse – fosfolípidios propriamente ditos – podia ser resgatada com maior facilidade e eficiência das colunas de troca iônica.

Para tal, a lecitina bruta de soja foi: (1) pré-tratada com solvente orgânico puro apropriado (neste caso, acetona) e (2) nesta forma mais enriquecida então aplicada na coluna que havia facultado resultado anterior mais eficiente (no caso, a de PAVT-DEAE⁺), mantidas as demais condições operacionais já descritas.

Esta forma de pré-tratamento foi desenvolvida com base na interpretação do trabalho realizado por Jangle *et al.* (2013), que realizaram tratamentos sequenciais com solventes, e misturas de solventes orgânicos, para remoção dos compostos com exceção da PC, já que a purificação deste PL foi o objetivo do trabalho.

4.3.1 Pré-tratamento isolado da lecitina bruta de soja utilizando acetona ou etanol.

Com base nos resultados obtidos anteriormente, a acetona apresentou a melhor performance no enriquecimento dos PLs. Já o etanol foi escolhido para comparação devido ao seu custo mais baixo e por ser descrito em outros trabalhos como solvente para purificação de uma das espécies de PLs, porém frequentemente são utilizadas várias frações de etanol no processo (Patil *et al.*, 2010; Jangle *et al.*, 2013; Price *et al.*, 2018)

Foram pesados, em dois tubos com rosca, 180 mg de lecitina bruta de soja e em seguida foi adicionado 1,8 mL de acetona no primeiro tubo e 1,8 mL de etanol absoluto no segundo tubo. Em cada um deles foi incluído uma barra magnética e ambos foram deixados *overnight*, sob agitação em temperatura ambiente.

Na sequência, os tubos foram deixados fora da agitação por 1 hora para que as amostras decantassem, ocorrendo a formação de um precipitado. Os sobrenadantes foram vertidos em novos tubos e separados para posterior análise em CCD.

Os precipitados foram ressuspensos em 4 mL do mesmo solvente utilizado no pré-tratamento, ou seja, acetona ou etanol (eluição A), e aplicados, cada um em colunas de PAVT-DEAE⁺. Sequencialmente foram realizadas mais duas lavagens (eluições B e C) de 4 mL com o mesmo solvente, e então três lavagens (eluições D, E e F) com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v).

Cada eluição deu origem a uma amostra, gravimetrada em tubos tarados após remoção do solvente e ressolubilizadas de forma normalizada em clorofórmio : metanol (2 : 1 v/v) para o fim de rotina, as amostras foram analisadas via CCD.

4.3.2 Pré-tratamento com variação da massa de lecitina bruta de soja e utilização de duas colunas.

Buscando melhorias na purificação da família de PLs presentes na lecitina bruta de soja, e com base nos experimentos anteriores algumas alterações foram realizadas. A primeira se baseou na utilização de uma segunda coluna de PAVT-

DEAE⁺ para aplicação do sobrenadante obtido com o pré-tratamento, visando a recuperação mais próxima do quantitativo dada a pequena perda dos PLs de interesse no sobrenadante. A segunda, foi o aumento do volume de cada solvente utilizado para a lavagem das colunas, utilizando 8 mL de acetona nas eluições A e B, e 8 mL de clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v) nas eluições C e D.

As colunas foram montadas com 300 mg de PAVT-DEAE⁺ (Figura 17). Já as amostras foram preparadas com duas massas de lecitina bruta de soja, sendo uma amostra com 180 mg e outra com 90 mg, pesadas em tubos de ensaio com rosca. Em ambos foram adicionados 1,8 mL de acetona e uma barra magnética.

Figura 17: Exemplo de colunas contendo PAVT-DEAE⁺.



Fonte: O autor.

O procedimento descrito a seguir foi realizado de forma idêntica para as amostras de massas diferentes. As amostras foram deixadas em agitação *overnight*, e no dia seguinte, os tubos foram retirados da agitação e deixados estáticos por uma hora, para a formação do precipitado. Já o sobrenadante foi recolhido em outro tubo.

➤ Precipitado:

O precipitado foi ressuspenso em 8 mL de acetona, submetido a agitação em vortex, para melhor homogeneização, e aplicado na coluna. Seu eluato foi designado amostra A. O tubo foi lavado novamente com mais 8 mL do mesmo solvente, aplicado na coluna e seu eluato então designado de amostra B. Esta divisão de eluatos teve como objetivo confirmar se o primeiro eluato já fora suficiente para a remoção total dos lipídios neutros (TAGs, DAGs, MAGs e AGLs). Na eluição

subsequente foi utilizada a mescla clorofórmio : metanol alcalinizada com amônia, igualmente subdivida em 2 amostras (C e D).

➤ Sobrenadante:

Todos os tubos em que as amostras foram recolhidas foram previamente pesados para a realização do balanço de massa.

O sobrenadante do pré-tratamento previamente separado foi aplicado em uma segunda coluna e foi realizado o processo de lavagem.

O solvente contido em todos os tubos foi evaporado por fluxo de ar constante e banho maria com temperatura máxima de 50 °C, e em seguida, todas as amostras foram liofilizadas *overnight*.

Novamente, os tubos foram pesados para quantificação da massa obtida em cada etapa, e as amostras foram solubilizadas de forma sequencial com 1 mL de éter etílico, e 3 mL de clorofórmio : metanol (2 : 1 v/v) de forma normalizada para facilitar a realização e interpretação dos resultados analíticos através de CCD.

4.4 Estudo 4: Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas ao término de todos os experimentos, nas amostras que obtiveram melhores perfis de purificação previamente indicados pelas CCDs, para quantificar as porcentagens de PC e PE e comprovar a eficiência dos processos utilizados para purificar/enriquecer as amostras de lecitina bruta de soja.

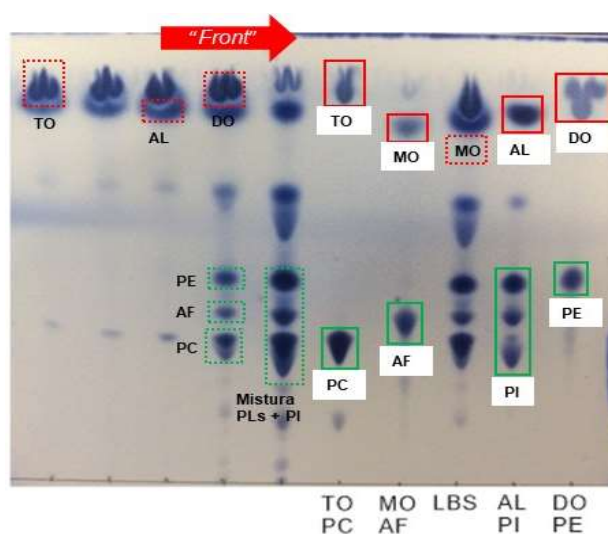
Foi utilizado o método descrito na ISO 11701 "*Animal and vegetable fats and oils – Determination of Phospholipids content in Lecithins by HPLC using a light scattering detector.*" em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Agilent, modelo 1200 series, com detector ELSD 1260 *infinity* e coluna Merck Lichrospher 100 Diol 250 x 4.0 mm, 5.0 µm de partícula, com volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno da coluna em 55 °C e fluxo da fase móvel de 1 mL.min⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando identificar o melhor processo e considerando os melhores enriquecimentos/purificações dos fosfolipídios de interesse (PC, PE, PI e PS), ou seja mediante separação dos lipídios neutros (TAGs, DAGs, MAGs) e AGLs, seja por simples fracionamento com solventes orgânicos isolados ou em mescla, e mais eficientemente mediante percolação em colunas com matrizes celulósicas ionizadas (PAVT-CM⁻, PAVT-AE⁺ e PAVT-DEAE⁺) as CCDs foram avaliadas para identificação do perfil obtido, com posterior encaminhamento dos melhores resultados para quantificação em CLAE.

A interpretação de uma CCD deve seguir o indicado na Figura 18, onde são determinados os pontos de aplicação, os quais são identificados na própria placa e então são aplicados as amostras e os padrões. No exemplo, os padrões estão identificados e destacados com linhas sólidas (vermelho para TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, e verde para PLs), e as espécies em análise contidas nas amostras em linhas pontilhadas. Para análise da presença de um composto basta observar se o sinal referente a ele coincide com o sinal referente ao seu padrão, isto é, se o “*Ratio to front*” (Rf), ou distância percorrida até o “*front*” (final da placa) coincidem.

Figura 18: Avaliação de uma CCD.



Fonte: O autor.

Legenda: PC: Fosfatidilcolina; PE: Fosfatidiletanolamina; PI: Fosfatidilinositol; AF: Ácido fosfatídico; TO: Trioleína; DO: Dioleína; MO: Monoleína; AL: Ácido linoleico; LBS: Lecitina bruta de soja; PLs: Fosfolipídios

O valor de R_f é calculado pela razão entre a distância percorrida (cm) pela substância e a distância percorrida (cm) pelo solvente. Os valores de R_f podem variar, pois a interação com a fase estacionária e a força de arraste podem sofrer influências quando ocorre alteração no solvente (mesmo que mínima) e até mesmo da temperatura.

Em alguns casos, certos compostos podem possuir R_f s coincidentes, ou muito próximos, como os isômeros do PI com a PC e PE, e a dioleína (DO) que possui um R_f muito próximo ao da trioleína (TO) e monoleína (MO), fato que reforça o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação dos compostos alvo (PLs) deste estudo.

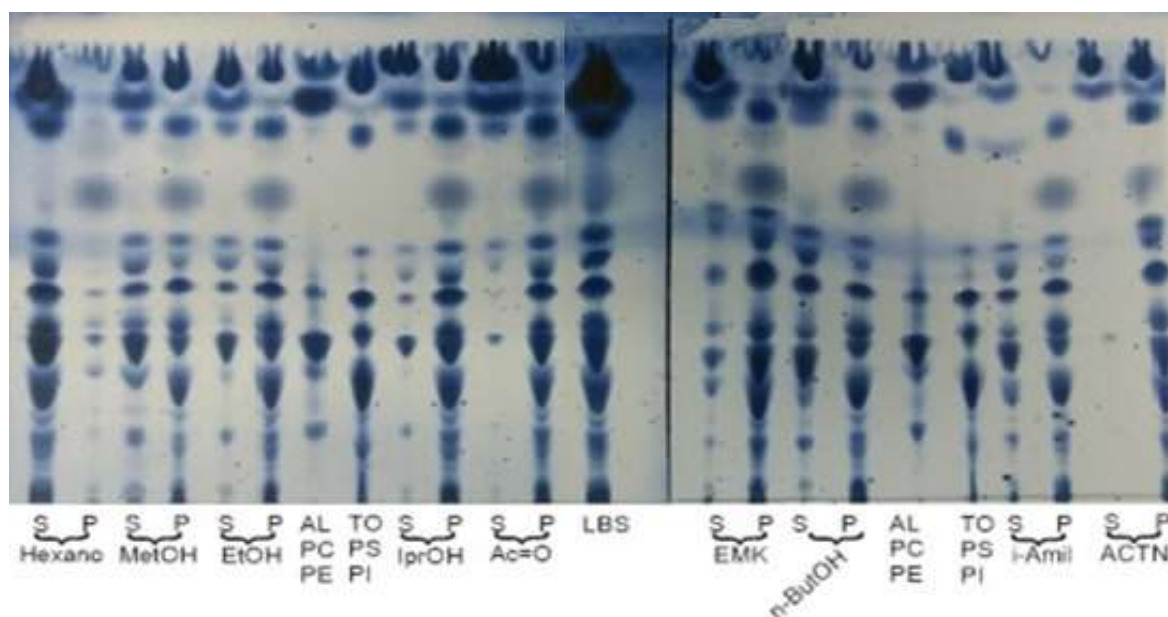
Em média, cada CCD foi realizada em um período de 40 a 60 minutos (da aplicação até o revelado, pois a fase móvel desenvolvida favorecia uma rápida migração dos compostos), nos proporcionando agilidade na avaliação dos resultados, além de uma avaliação qualitativa.

5.1 Estudo 1: Tratamento da lecitina bruta de soja com solventes orgânicos e posterior agitação e centrifugação.

Pode-se confirmar que o hexano, solvente utilizado industrialmente na produção do óleo bruto de soja (Embrapa, 2015), foi o melhor solvente para solubilizar todos os compostos da lecitina bruta de soja, gerando um precipitado com massa desprezível.

Com o objetivo de separar em fases distintas os compostos alvo (PC, PE e PI), os resultados obtidos com a acetona e metiletilcetona foram os melhores. Como mostrado nas CCDs apresentadas na Figura 19, cada tratamento gerou um sobrenadante e um precipitado, aplicados e analisados em par. A figura mostra um padrão uniforme de comportamento e análise: TAGs, DAGs, MAGs e AGLs migram sempre com R_f (s) (0,88 / 0,79 – 0,76) próximo ao *front* de solvente enquanto a família de fosfolipídios migra na faixa de R_f (s) entre 0,56 (PE), 0,46 (PS), 0,42 (PC) e 0,33 (PI).

Figura 19: Cromatografia em camada delgada com os perfis obtidos após tratamento com solventes.



Fonte: O autor

Legenda: S: Sobrenadante; P: Precipitado; MeOH: Metanol; EtOH: Etanol; AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína. PS: Padrão de PS; PI: Padrão de PI; *i*-PrOH: *Iso*-propanol; Acetona; LBS: Lecitina bruta de soja; EMK: Metiletilcetona; *n*-ButOH: *n*-Butanol; *i*-Amil: Álcool isoamílico; AC≡N: Acetonitrila

Para reforçar a validade e amplitude deste método cromatográfico, há que se notar que mesmo numa miniplaca (as placas originais da Merck possuem dimensões de 20 x 20 cm) se obtém resolução para nada menos do que 14 componentes.

Pode-se observar na CCD que a fração sobrenadante da acetona está carregada com a maior parte dos TAGs e AGLs, apresentando traços das frações de PLs. Já, o precipitado apresenta toda a fração dos PLs, porém ainda contaminados com TAGs e AGLs.

Utilizando-se a metiletilcetona observou-se um perfil semelhante ao obtido com acetona, porém, a carga de PLs no sobrenadante é maior, considerando-a como perda de massa. Por outro lado, a fração do precipitado encontra-se aparentemente livre dos TAGs e com quantidade semelhante de AGLs.

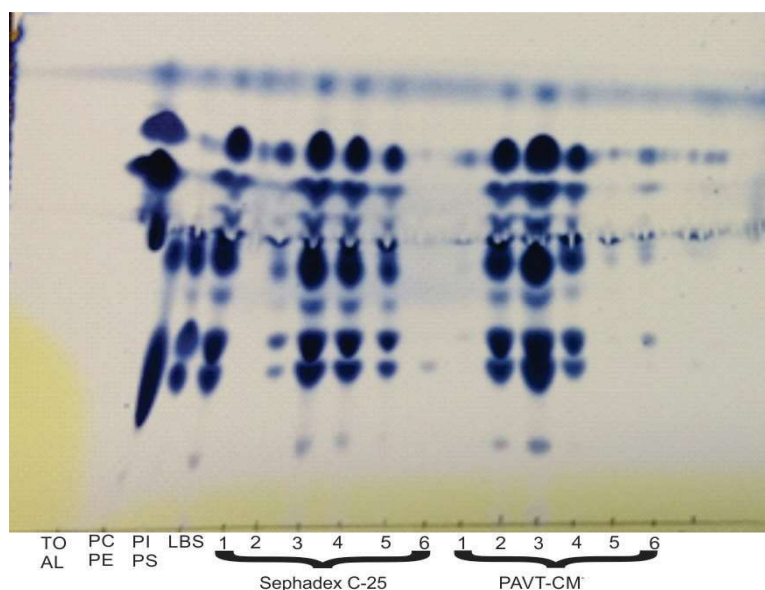
Com base nos resultados desta etapa, decidiu-se utilizar como solventes para etapas futuras a acetona e a metiletilcetona.

5.2 Estudo 2: Utilização de matrizes trocadoras iônicas na purificação dos PLs.

5.2.1 Comparação entre matrizes comerciais e PAVTs derivatizados.

Com os resultados obtidos nas análises via CCD (Figura 20), pode-se observar que não ocorreu enriquecimento dos PLs em nenhuma das eluições, porém como quesito de comparação pôde-se observar que a coluna contendo PAVT-CM não permitiu a saída de nenhum composto com a passagem do primeiro solvente, diferente da matriz comercial (Sephadex C-25).

Figura 20: Cromatografia em camada delgada com as frações dos seis solventes comparando as matrizes aniônicas Sephadex C-25 e PAVT-CM.

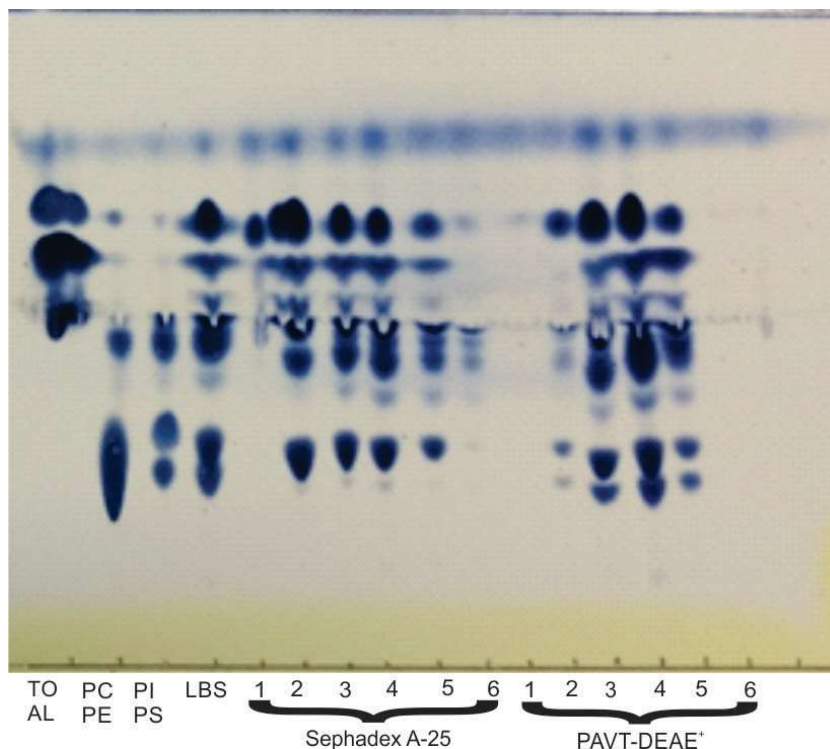


Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína. PS: Padrão de PS; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja; Amostras: 1: Eluição com hexano; 2: Eluição com clorofórmio; 3: Eluição com clorofórmio : metanol (8 : 2 v/v); 4: Eluição com clorofórmio : metanol : água (5 : 5 : 1 v/v); 5: Eluição com clorofórmio : metanol : solução saturada de acetado de amônio (5 : 5 : 1 v/v); 6: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (5 : 5 : 1 v/v).

Devido a capacidade de retenção mais elevada da coluna com PAVT-CM em relação à coluna contendo Sephadex C-25, além do baixo custo de produção, foi escolhido o pó de varredura derivatizado para a continuidade dos experimentos. E, assim como no caso das matrizes aniônicas, foi preparada uma CCD para as matrizes catiônicas (Figura 21).

Figura 21: Cromatografia em camada delgada com as frações dos seis solventes comparando as matrizes catiônicas Sephadex A-25 e PAVT-DEAE⁺.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína. PS: Padrão de PS; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja; Amostras: 1: Eluição com hexano; 2: Eluição com clorofórmio; 3: Eluição com clorofórmio : metanol (8 : 2 v/v); 4: Eluição com clorofórmio : metanol : água (5 : 5 : 1 v/v); 5: Eluição com clorofórmio : metanol : solução saturada de acetado de amônio (5 : 5 : 1 v/v); 6: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (5 : 5 : 1 v/v).

Neste caso, já na primeira lavagem foi observado que a coluna contendo a matriz comercial (Sephadex A-25) teve perda de material desde a primeira lavagem, diferente da coluna contendo PAVT-DEAE⁺. Além disso, neste caso já é possível observar que esta coluna apresenta remoção seletiva (discreta) dos componentes que não são de interesse já na segunda eluição, e apenas traços dos PLs.

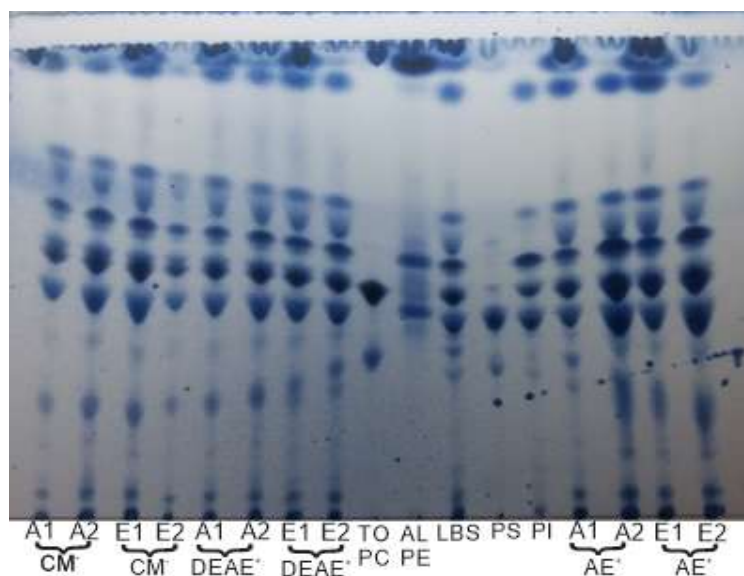
Com base nestas informações, fácil produção e baixo custo, todo o trabalho foi realizado com as matrizes produzidas a partir do pó de algodão de varredura têxtil derivatizadas às formas carboximetilada (PAVT-CM⁻) e dietilaminoetilada (PAVT-DEAE⁺) confeccionadas em laboratório.

5.2.2 Forma de adição da lecitina bruta de soja aos PAVTs

5.2.2.1 Adição da lecitina bruta de soja solubilizada em hexano

O objetivo das duas eluições sequencias da coluna, utilizando o mesmo solvente, foi identificar qual destas forneceria a separação da família de PLs em uma amostra, e os contaminantes (TAGs, DAGs, MAGs e AGLs) com a menor quantidade possível de PLs em outra amostra, critério de purificação que foi adotado para a avaliação dos resultados. A CCD desta etapa é apresentada na Figura 22.

Figura 22: Cromatografia em camada delgada das amostras obtidas com a aplicação de lecitina bruta de soja já solubilizada em hexano.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína. PS: Padrão de PS; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja; A1: Primeira eluição com acetona; A2: Segunda eluição com acetona; E1: Primeira eluição com metiletilcetona; E2: Segunda eluição com acetona; CM: PAVT-CM; DEAE+: PAVT-DEAE+; AE+: PAVT-AE+.

Em todas as condições foi possível observar que houve grande perda da fração dos PLs nas primeiras lavagens. Nas lavagens seguintes, já foi possível verificar a diminuição do sinal dos TAGs, DAGs e MAGs apresentando a fração dos PLs com maior grau de pureza, porém ocorreu a divisão da carga dos PLs entre as duas frações.

Mesmo com este panorama de perda de massa na primeira lavagem foi possível observar que utilizando o PAVT-AE⁺ nas lavagens com acetona a perda de PLs na primeira amostra (quando observado o perfil vertical, isto é, o tamanho dos sinais quando comparados entre si indicando a proporcionalidade de cada composto presente na amostra), foi menor quando comparada ao PAVT-DEAE⁺ e PAVT-CM⁻.

O resultado com o PAVT-AE⁺ e acetona, e a similaridade dos perfis obtidos tanto com PAVT-DEAE⁺ e PAVT-CM⁻, conduziram à investigação na forma de aplicação da lecitina bruta de soja, se esta poderia interferir na adsorção dos fosfolipídios nos sítios reativos dos PAVTs derivatizados. Como demonstrado no teste de precipitação com solventes (anteriormente descrito) é conhecido que o hexano é o melhor solvente utilizado para solubilizar a lecitina bruta de soja.

Justamente a eficiência do hexano poderia atrapalhar todo o processo de adsorção carregando a fração dos PLs, que deveriam permanecer adsorvidos à matriz quando a acetona ou a metiletilcetona foram aplicadas.

Para investigar o efeito da aplicação dos PLs (solubilizados ou diretamente no PAVT derivatizado) foi realizado um experimento, descrito a seguir, em condições semelhantes afim de reter a fração dos PLs e remover os TAGs, DAGs, MAGs e AGLs.

5.2.2.2 *Adição de lecitina bruta de soja diretamente nas matrizes e comparação entre cada tipo de derivatização.*

As massas de compostos obtidas em cada lavagem são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Mapeamento da massa das frações obtidas em cada lavagem

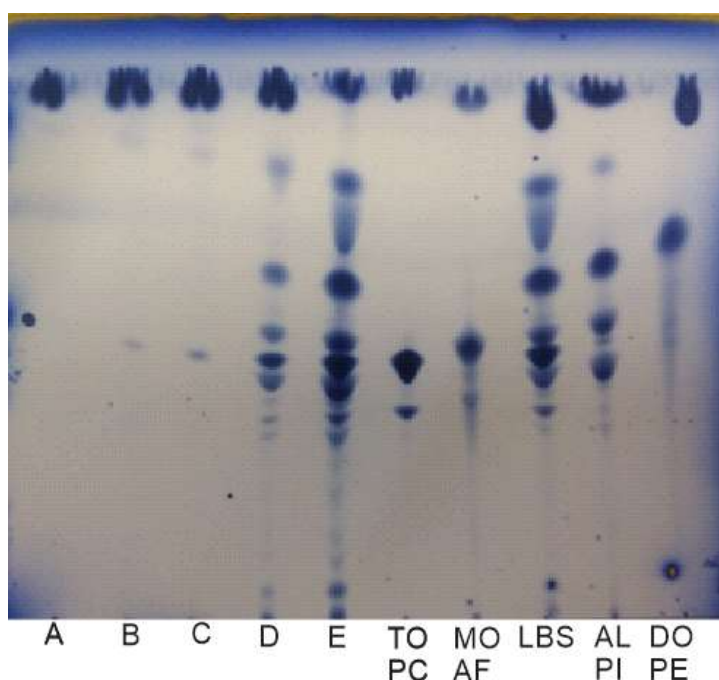
Condição	Massa total (mg)	% massa fração A	% massa fração B	% massa fração C	% massa fração D	% massa fração E
PAVT-AE ⁺	97,9	8,89	5,72	10,11	22,67	52,60
PAVT-CM ⁻	96,2	12,27	8,42	12,47	8,11	58,73
PAVT-DEAE ⁺	96,8	8,06	5,06	11,05	22,83	52,99

Para melhor observação nesta etapa, as amostras de cada condição foram aplicadas em cromatoplas separadas e os resultados discutidos na sequência.

5.2.2.2.1 PAVT-AE⁺

De acordo com a CCD, apresentada na Figura 23, nas três lavagens iniciais com acetona (A, B e C) pode-se visualizar a remoção dos TAGs, ácido oleico, DAGs e traços de PC com o percentual de massa (em relação ao total de massa obtida, e não em relação à massa aplicada) de 24,72%.

Figura 23: CCD das amostras obtidas em coluna de PAVT-AE⁺ comparadas com padrões e suspensão inicial de lecitina bruta de soja.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína; DO: Padrão de Dioleína; MO: Padrão de Monoleína; AF: Padrão de Ácido fosfatídico; PS: Padrão de PS; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja; Amostras: A, B e C: Eluição com acetona; D: Eluição com acetato de etila; E: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v).

Na eluição com acetato de etila (D) observou-se a perda de massa da fração dos PLs, provavelmente PI e PC, mas por outro lado, ainda foi observado grande carga de TAGs, e a presença da mancha referente ao ácido linoleico e a monoleína foi intensificada. Nesta etapa a porcentagem de massa foi de 22,67%.

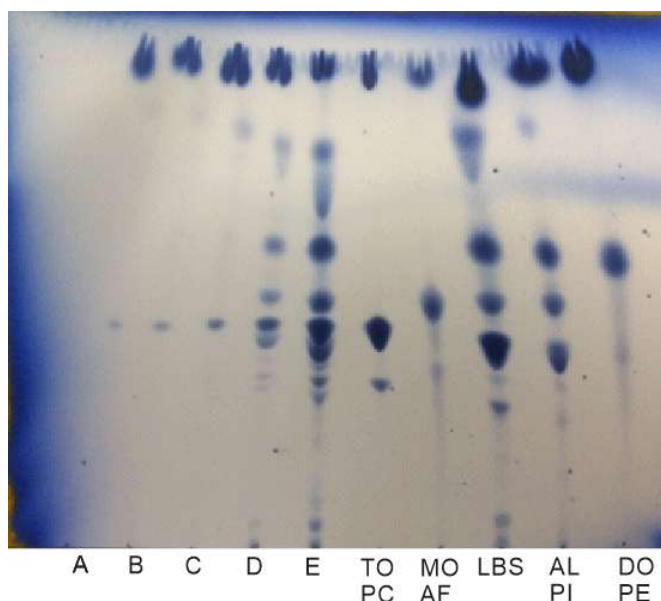
Com intuito de dessorver todos os compostos retidos na coluna, a lavagem final com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v) apresentou o perfil dos PLs de forma majoritária em relação ao ácido oleico e TAGs. Mesmo contendo alguns compostos indesejados, esta fração com porcentagem de massa de

52,6% já possui um grau de pureza dos PLs maior quando comparado com a lecitina bruta de soja.

5.2.2.2.2 PAVT-CM⁻

De forma semelhante ao que ocorreu na coluna de PAVT-AE⁺, a coluna contendo PAVT-CM⁻, apresentada na Figura 24, forneceu nas três lavagens iniciais com acetona (A, B e C) a remoção de TAGs, ácido oleico, DAGs e traços de PC, porém a massa percentual nesta condição foi de 33,16%, menor quando comparada às colunas de PAVT-AE⁺ e PAVT-DEAE⁺, o que indica que a celulose carboximetilada retém os compostos que não são de interesse e com isso dificulta a retenção da PC.

Figura 24: Cromatografia em camada delgada das amostras obtidas em coluna de PAVT-CM⁻ comparadas com padrões e suspensão inicial de lecitina bruta de soja.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína; DO: Padrão de Dioleína; MO: Padrão de Monoleína; AF: Padrão de Ácido fosfatídico; PS: Padrão de PS; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja; Amostras: A, B e C: Eluição com acetona; D: Eluição com acetato de etila; E: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v).

Na lavagem com acetato de etila (D), novamente foi observado a perda de massa da fração dos PLs, (com base na comparação com os padrões, majoritariamente PI e PC). Ainda foi observado a carga de TAGs, porém o sinal

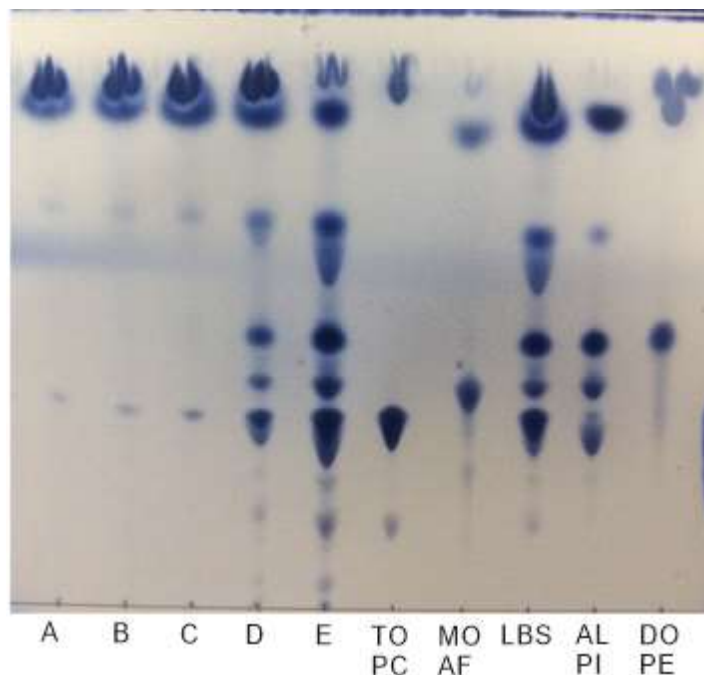
referente ao ácido linoleico e a monoléina foi reduzida. Nesta etapa a porcentagem de massa foi de 8,11%, a menor entre as três colunas, indicando que o uso de acetato de etila não foi eficiente na remoção dos componentes alvos da remoção, e ainda, arrastou parte da fração de interesse.

Já a lavagem final com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v), apresentou o perfil de todos os PLs, porém o sinal referente ao ácido oleico e TAGs ainda apresentou-se muito elevado. Tendo em vista que o rendimento obtido nesta etapa foi de 58,73% da massa aplicada, e com o perfil final obtido ainda semelhante ao da lecitina bruta de soja, esta matriz mostrou-se ineficiente, quando comparada às matrizes com carga positiva, para a remoção dos TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs nas eluições iniciais e fornecimento de uma amostra enriquecida de PLs na última eluição.

5.2.2.2.3 PAVT-DEAE⁺

De acordo com a CCD apresentada na Figura 25, nas três lavagens iniciais com acetona (A, B e C) foi detectada a remoção dos TAGs, ácido oleico, DAGs com o percentual de massa de 24,17%, sendo este percentual o menor entre as três matrizes derivatizadas testadas.

Figura 25: Cromatografia em camada delgada das amostras obtidas em coluna de PAVT-DEAE⁺ comparadas com padrões e suspensão inicial de lecitina bruta de soja.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína; DO: Padrão de Dioléina; MO: Padrão de Monoléina; AF: Padrão de Ácido fosfatídico; PS: Padrão de PS; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja; Amostras: A, B e C: Eluição com acetona; D: Eluição com acetato de etila; E: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v).

Na lavagem com acetato de etila (D) foi observada a perda de massa da fração dos PLs (comparativamente aos padrões aplicados, referente a PI e a PC). Por outro lado, ainda pode ser observado grande carga de TAGs. Contrastando com as lavagens anteriores, a mancha referente ao ácido linoleico e a monoleína foi intensificada. Nesta etapa, a porcentagem de massa foi de 22,83%, a maior entre as matrizes testadas, mostrando que mesmo com o acetato de etila causando arraste de compostos da família dos PLs nesta matriz, pode-se remover uma carga maior dos compostos que não são de interesse.

Já, a lavagem final com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v) apresentou o perfil de todos os PLs de forma majoritária em relação ao ácido oleico e TAGs. Mesmo contendo alguns compostos indesejados, pode-se observar que esta fração, com porcentagem de massa de 52,99%, já possui um grau de pureza maior em relação às amostras obtidas na mesma eluição das outras matrizes, principalmente por possuir menor quantidade de TAGs (e outros contaminantes) e no decorrer do processo ter apresentado menor perda de PC.

Foi concluído com base nesta sequência que a adição de lecitina bruta de soja, diretamente, no topo da coluna (e não previamente solubilizada) fornece eluatos com maior diferenciação das espécies presentes, ou seja, os compostos que não são de interesse nesta pesquisa são eluídos pela acetona; já, nas lavagens iniciais ao mesmo tempo que os PLs são precipitados, diferente do que ocorreu quando a amostra foi aplicada já solubilizada em hexano. Além disso, foi possível constatar que a coluna contendo PAVT-DEAE⁺ foi a que apresentou melhores resultados, seguida de perto pela coluna contendo PAVT-AE⁺.

Com base nos resultados obtidos, e por esta matriz já ter sido utilizada em trabalhos de iniciação científica, conclusão de curso, e dissertações de mestrado realizados pelo grupo de pesquisa do LQBB, além de resultados publicados por Baldo *et al.* (2014) e Fontana *et al.* (2016), optamos por sua utilização nas etapas subsequentes.

Outro fato observado foi que uma mistura de acetona, a qual favorece a remoção dos TAGs, e acetato de etila que remove TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, porém carrega parte dos PLs, não gera benefício na purificação dos PLs, como observado na eluição D, em que ocorre a adição de acetato de etila na coluna previamente eluída com acetona. Por outro lado, foi levantada a hipótese do aumento do volume de acetona nas lavagens iniciais, já que este solvente precipita os PLs e elui os TAGs, DAGs, MAGs e parte dos AGLs, como observado até aqui.

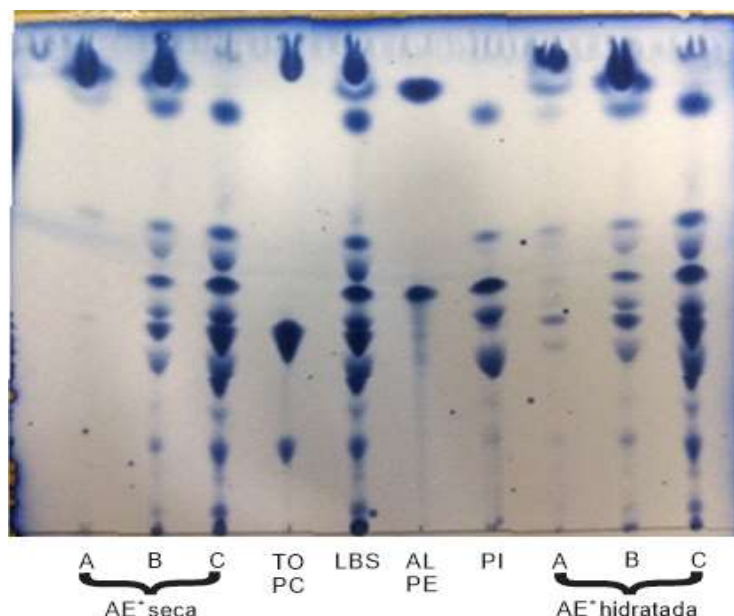
5.2.2.3 Colunas hidratadas ou secas

Os resultados obtidos foram semelhantes em todas as colunas, se tratando da comparação entre acetona pura e acetona 95%. Em todos os casos, a adição de água prejudicou a separação e arrastou desde a primeira lavagem PLs, além de diminuir a remoção de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs.

Este resultado é inferior (avaliando a separação dos PLs e contaminantes em eluições distintas) ao obtido quando foi utilizado acetona pura na lavagem das colunas, como previamente discutido no item “5.3.2.2 Adição de lecitina bruta de soja diretamente na matriz e comparação entre cada tipo de derivatização”.

Na Figura 26 é apresentada a CCD da coluna que apresentou melhor condição (PAVT-AE⁺).

Figura 26: Cromatografia em camada delgada comparando tratamento com acetona pura e acetona 95% em PAVT-AE⁺.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja; Amostras: A: Eluição com acetona (pura ou hidratada como indicado na imagem); B: Eluição com acetato de etila; E: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v); AE⁺: PAVT-AE⁺;

A adição de água ao eluente visava facilitar a retenção dos PLs pelos grupamentos fosfato (aniônicos), (Christie, 2014b; Glassman *et al.*, 2018) pelas matrizes catiônicas (PAVT-DEAE⁺ e PAVT-AE⁺), ou no caso da matriz aniônica (PAVT-CM⁻) o objetivo foi a retenção da PC (anfótera, com carga positiva no grupamento colina)(Miranda, 2005) e da PE (anfótera, carregada positivamente no nitrogênio do grupamento etanolamina) (Christie, 2014a).

Foi observado que o resultado da adição de 5% de água ao eluato prejudicou a remoção dos contaminantes e ainda arrastou os PLs já na lavagem inicial. A obtenção de amostras de PLs contaminadas por TAGs, DAGs, MAGs e AGLs pode ter ocorrido devido a emulsificação dos contaminantes pela PE e PI (McClements, 2004; Singh *et al.*, 2017), e em presença de água possuem a tendência de formarem estruturas hexagonais (Cullis *et al.*, 1986; Xie, 2018), deixando as caudas hidrofóbicas (neste caso a cadeia de 18 carbonos do ácido linoléico esterificado) expostas. Estas caudas podem interagir com ácidos graxos livres e com os gliceróis neutros retendo-

os nas eluições iniciais ou carregá-los nas eluições finais (Kim *et al.*, 2017; Lehtinen *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

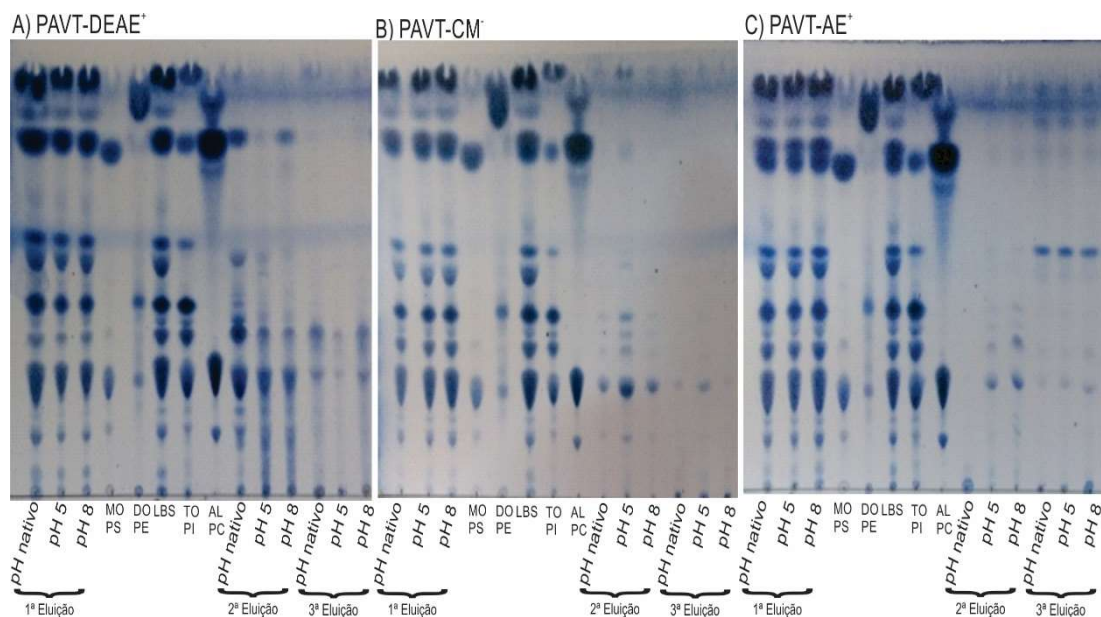
Concluiu-se, portanto, que ocorreu o mesmo efeito da adição de água na degomagem do óleo bruto, quando o óleo ainda com hexano é misturado com água, e então centrifugado, gerando a lecitina bruta de soja composta por PLs, pigmentos, óleo bruto e metais (Embrapa, 2015).

5.2.2.4 *Variação do pH dos eluentes e aplicação nas matrizes de PAVT derivatizados.*

Com base no procedimento “4.1.1 Tratamento da lecitina bruta de soja com solventes orgânicos e posterior agitação e centrifugação” utilizou-se, inicialmente, os solventes acetona e metiletilcetona, porém, devido a reação aldólica, na qual ocorre o ataque da base ou do ácido às moléculas que possuem grupamento cetona (Corrêa Jr. e Pilli, 2003) formando íons enolatos (em meio básico) e um novo composto não previsto (em meio ácido), não foi possível a aplicação desta variante na eluição da lecitina bruta de soja utilizando a acetona (propanona) e a etilmetilcetona (butanona), já que o pH das soluções foi imediatamente neutralizado.

Com a impossibilidade da utilização dos dois melhores solventes encontrados, optamos pela utilização do solvente de menor custo, o etanol. As CCDs com os resultados obtidos para cada matriz são apresentadas na Figura 27.

Figura 27: Cromatografias em camada delgada apresentando os resultados utilizando as matrizes derivatizadas A) PAVT-DEAE⁺, B) PAVT-CM⁻ e C) PAVT-AE⁺.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; TO: Padrão de trioleína; DO: Padrão de dioleína; MO: Padrão de monooleína; PI: Padrão de PI; LBS: Lecitina bruta de soja;

Pode-se observar que nos três casos não houve separação dos PLs, na primeira lavagem da fração que não é de interesse, saindo a maior parte da massa de lecitina bruta de soja já na primeira eluição, apresentando o perfil de compostos semelhante ao da lecitina bruta de soja sem tratamento.

O único resultado que poderia ser considerado, nesta série, é o obtido na segunda lavagem em pH nativo utilizando o PAVT-DEAE⁺, o qual apresentou a família de PLs livre dos TAGs, DAGs e MAGs e com pequena quantidade de AGLs acusados pela cromatografia. Porém, levando em consideração o perfil obtido com a primeira lavagem e consequentemente o rendimento gravimétrico desta fração foi entendido que a substituição do eluente seria necessária, além da necessidade de minimizar outros tipos de interações entre os PLs.

O efeito da eluição de todos os compostos, já na primeira aplicação de etanol, pode ter ocorrido devido ao fato do álcool ser um bom solvente para a família dos compostos apolares (TAGs, DAGs e MAGs), para os ácidos graxos livres (AGLs), assim como para os PLs (família de compostos alvo da purificação). Esta solubilização teve efeito superior às forças de interação entre os PLs e as matrizes de troca iônica utilizados.

Tendo em vista que não foi possível observar o efeito esperado da alteração de pH descrito por Gupta (1986) e Dijkstra (2014) utilizando etanol como eluente, e a impossibilidade da utilização das cetonas (acetona e metiletilcetona), os testes com variação de pH foram descontinuados.

5.2.3 Aumento do volume de solvente nas eluições iniciais

Já na pesagem dos tubos pode-se perceber que não houve o aumento de massa esperado nas lavagens iniciais, e ao invés de calcular o balanço de massa das amostras e solubilizá-las para concentrações conhecidas, os volumes foram apenas normalizados e foi preparada a CCD para avaliação dos perfis obtidos.

Tendo em vista que o volume de acetona foi aumentado de 18 mL (seis volumes da coluna) nos ensaios anteriores para 60 mL (20 volumes da coluna) neste ensaio, e não houve alteração no perfil obtido, além de variação da massa recolhida com acréscimo de apenas 5% nas duas lavagens iniciais, percebeu-se que o acréscimo de acetona não surtiu efeito na purificação dos PLs.

A ação precipitante da acetona sobre os PLs é conhecida e utilizada como tratamento preliminar em ensaios físico químicos para determinação indireta do teor destes compostos (A.O.C.S., 2017). Contudo, a acetona em temperatura ambiente sozinha não é capaz de solubilizar toda a carga de TAGs presente na lecitina bruta de soja, os quais aparentemente são emulsificados pelos PLs (Cullis *et al.*, 1986; Lehtinen *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017; Xie, 2018) dificultando sua completa solubilização.

Com base nas constatações obtidas nos experimentos anteriores foi decidido partir para outra abordagem, não tão simples como a aplicação direta da lecitina bruta de soja nas colunas, mas com uma etapa anterior a aplicação.

5.3 Estudo 3: Pré-tratamento da lecitina bruta de soja com posterior aplicação em coluna de PAVT derivatizado.

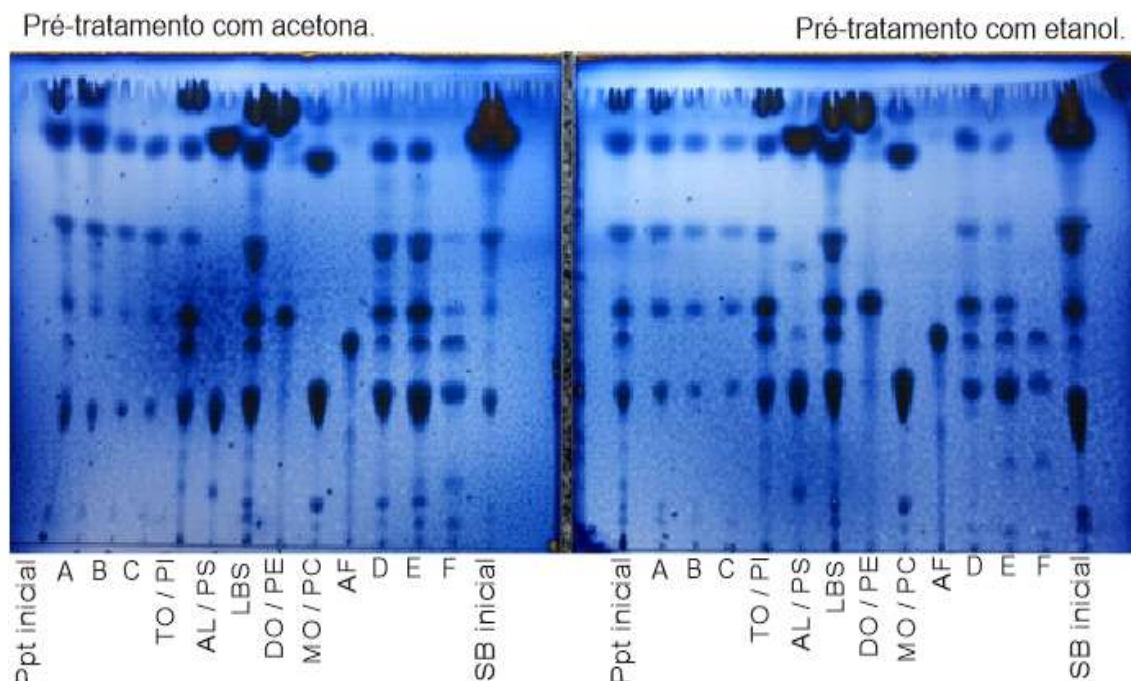
Nesta etapa, decidiu-se utilizar apenas colunas contendo PAVT-DEAE⁺, já que foi observado que esta matriz apresenta ganho no processo de purificação em relação às outras matrizes, e o custo do reagente empregado na derivatização é o menor de todos, além de ser um PAVT derivatizado conhecido da equipe do laboratório (Baldo *et al.*, 2014; Fontana *et al.*, 2016). Em relação ao solvente inicial foi decidido, com base nos resultados e discussões anteriores, que o eluente utilizado seria apenas a acetona, que favorece a solubilização dos lipídios neutros (TAGs, DAGs, MAGs), de parte dos AGLs e favorece a precipitação da maioria dos fosfolipídios.

A utilização deste conjunto matriz (PAVT-DEAE⁺) e solvente (acetona) se torna viável economicamente, já que o solvente pode ser recuperado da amostra por evaporação e reintroduzido no processo, e a matriz de troca iônica possui baixo custo. Além de fornecer uma alternativa ambientalmente correta, já que o PAVT-DEAE⁺ é proveniente de um resíduo, o qual pode ser valorizado com a derivatização química.

5.3.1 Pré-tratamento isolado da lecitina bruta de soja utilizando acetona ou etanol.

É possível obter um panorama geral do efeito do pré-tratamento com os dois solventes diferentes e a aplicação do precipitado na coluna de PAVT-DEAE⁺, observando as CCDs na Figura 28.

Figura 28: Cromatografias em camada delgada com os resultados do pré-tratamento com acetona e com etanol.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; PI: Padrão de PI; AF: Padrão de ácido fosfatídico; TO: Padrão de trioleína; DO: Padrão de dioleína; MO: Padrão de monooleína; LBS: Lecitina bruta de soja; Ppt Inicial: Precipitado inicial; SB inicial: Sobrenadante inicial; Amostras A, B e C: Eluição com acetona; Amostras D, E e F: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v).

1) Pré-tratamento com acetona:

A fração A corresponde à suspensão do precipitado em acetona aplicada à coluna, apresentando alta carga de TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs, e traços de PLs (PC e PI). As frações B e C correspondem (cada uma) a lavagem da coluna com 4 mL de acetona, nas quais pode-se observar que a quantidade de PLs saindo da coluna segue em decréscimo, já os TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs já não estão presentes nestas frações.

As frações D, E e F correspondem as lavagens da coluna (e do tubo em que o precipitado estava contido) com 4 mL de clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v). Nestas frações observa-se que a família dos PLs se apresenta com grau de pureza elevado e em grandes quantidades, em relação aos sinais obtidos para estes compostos observados no sobrenadante tratado e nas frações A, B e C.

É possível observar que foi removido a maior parte dos TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs, porém estão presentes traços de PLs (PC e PI).

No precipitado inicial é possível verificar a presença dos TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs porém, com uma concentração reduzida. Observa-se também que o sinal da família de PLs apresenta-se de forma discreta, provavelmente, devido à baixa solubilidade dos PLs em acetona (A.O.C.S., 2017); e por mais que a amostra tenha sido agitada vigorosamente, não foi possível obter de forma quantitativa as espécies presentes para a aplicação em CCD.

2) Pré-tratamento com Etanol anidro.

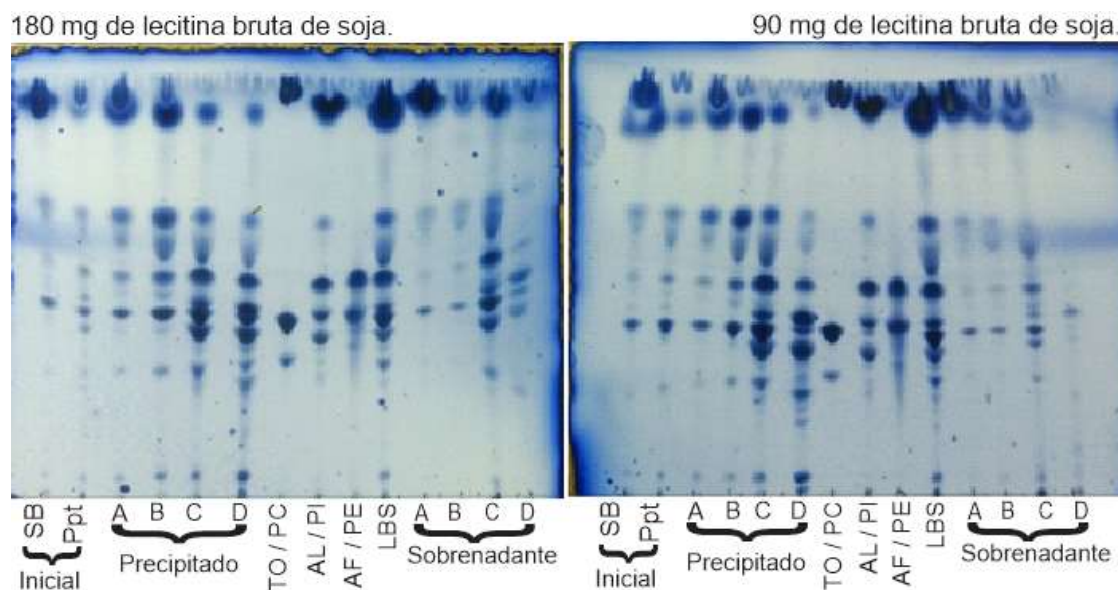
Já no sobrenadante inicial, percebe-se um perfil muito parecido com aquele apresentado pela amostra de lecitina bruta de soja, acarretando grande perda de todos os compostos de interesse e grande quantidade de TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs, caracterizando a boa solubilização da lecitina bruta de soja por este solvente.

Ao final deste experimento concluiu-se que a purificação em duas etapas, utilizando acetona no solvente do pré-tratamento e nas lavagens iniciais da coluna de PAVT-DEAE⁺, foi o mais eficaz entre todos os métodos estudados, porém cabem melhorias no processo, utilizando outra coluna de PAVT-DEAE⁺ e variando a massa inicial da lecitina bruta de soja afim de minimizar a perda dos PLs.

5.3.2 Pré tratamento com variação da massa de lecitina bruta de soja e utilização de duas colunas.

Avaliando os resultados obtidos nas CCDs (Figura 29) concluiu-se que não houve diferença na proporção dos perfis obtidos com a variação de massa (de 180 mg para 90 mg), isto é, a proporção dos compostos foi equivalente nos dois casos.

Figura 29: CCD com os resultados obtidos comparando a variação de massa de lecitina bruta de soja.



Fonte: O autor.

Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; PI: Padrão de PI; AF: Padrão de ácido fosfatídico; TO: Padrão de trioleína; LBS: Lecitina bruta de soja; Ppt: Precipitado; SB: Sobrenadante; Amostras A e B: Eluição com acetona; Amostras D, e E: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v).

Pode-se perceber que, assim como na etapa anterior, houve solubilização dos TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs no sobrenadante da etapa do pré-tratamento, e precipitação dos PLs.

A forma purificada (ausência de TAGs, DAGs e MAGs) foi observada nas frações C e D, com rendimentos de 59,0 mg (54,93%) e 23,5 mg (21,88%) respectivamente, após aplicação do precipitado inicial na coluna de PAVT-DEAE⁺.

Já na coluna referente ao sobrenadante inicial (recolhido do pré-tratamento), como esperado foi constatada a eluição de TAGs, DAGs, MAGs, e AGLs, na lavagem A com 60,1 mg (91,34%) e na lavagem B com 1,8 mg (2,73%). Já na fração C (com massa de 3,0 mg equivalentes a 4,56%) foi desorvido da coluna grande parte dos PLs, porém estes ainda apresentando contaminação. A fração D (1,1 mg e 1,37%) apresentou traços de compostos pertencentes a família dos PLs. Todos os valores de massa e porcentagens de massa obtidos foram calculados através do balanço de massa e estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Balanço de massa com a massa total obtida e porcentagem de massa referente a cada lavagem.

Etapa	Massa recolhida	Amostra A		Amostra B		Amostra C		Amostra D	
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Ppt	107,4	19,9	18,53	4,9	4,65	59,0	54,93	23,5	21,88
SB	65,8	60,1	91,34	1,8	2,73	3,0	4,56	1,1	1,37
MFR	173,2								

Fonte: O autor.

Legenda: Ppt = precipitado; SB = Sobrenadante; MFR = Massa final recolhida.

Conforme observado na Tabela 6, a porcentagem de massa dos PLs presentes nas frações C e D do sobrenadante é tão baixa, que o seu processamento acaba se tornando inviável para estes fins, já que seu rendimento é muito baixo e não fornece compostos puros. Contudo, no precipitado, as frações C e D juntas equivalem a 76,81 % de toda a massa obtida no precipitado, ou ainda 45,83% de toda a massa aplicada (180 mg de lecitina de soja bruta). O valor obtido, em porcentagem, de PLs se aproxima (mesmo levando em consideração que existe contaminação por AGLs, devido a formação de micelas (Lehtinen *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017), nesta fração) dos valores descritos na tabela 1 para o teor de PLs em lecitinas de soja comerciais, caracterizando-a como “intermediário” no quesito quantidade de fosfolípidios.

A purificação dos PLs foi possível neste método devido ao pré-tratamento que removeu a maior parte dos compostos que não eram de interesse, principalmente os compostos polares solúveis em acetona (TAGs, DAGs e MAGs), além de parcial remoção dos AGLs (Lehtinen *et al.*, 2017). Ao mesmo tempo, precipitou os PLs na matriz de troca iônica (PAVT-DEAE⁺), favorecendo a retenção química destes compostos. Com as eluições iniciais da coluna com acetona, foi possível a remoção dos compostos que não haviam sido solubilizados no pré-tratamento (e haviam sido carregados para o precipitado), separando-os dos PLs. Finalmente, nas eluições finais foi possível dessorver os PLs adsorvidos quimicamente à coluna, já sem a presença dos TAGs, DAGs, MAGs e contendo quantidades inferiores (quando comparado ao perfil da lecitina bruta de soja) de AGLs devido às micelas formadas pelos PLs (Lehtinen *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

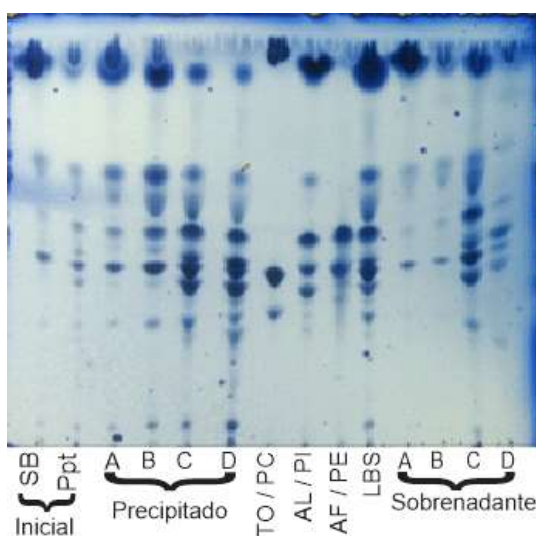
Tendo embasamento nas massas recolhidas e no perfil qualitativo de cada amostra do precipitado obtido, entendeu-se que estas amostras alcançaram o objetivo de purificação/enriquecimento da família dos PLs com a remoção dos TAGs, DAGs, MAGs e parte dos AGLs. Além disso, foi possível minimizar o uso de solventes orgânicos, utilizando-se a acetona, um solvente já conhecido e utilizado (A.O.C.S.,

2017), bem como, a utilização de uma matriz de troca iônica de baixo custo produzida a partir de um resíduo da indústria têxtil. Com o objetivo de determinar o quão eficiente foi o processo de purificação, realizou-se a quantificação dos PLs por CLAE.

5.4 Estudo 4: Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com base nos resultados qualitativos obtidos no item “4.3.2 Pré tratamento com variação da massa de lecitina bruta de soja e utilização de duas colunas” e demonstrados na Figura 30, foram realizadas análises em CLAE nas amostras lecitina bruta de soja e amostras A. B. C e D do precipitado.

Figura 30: Cromatografia em camada delgada com os melhores resultados após pré-tratamento e aplicação da amostra em coluna de PAVT-DEAE⁺.



Fonte: O autor.

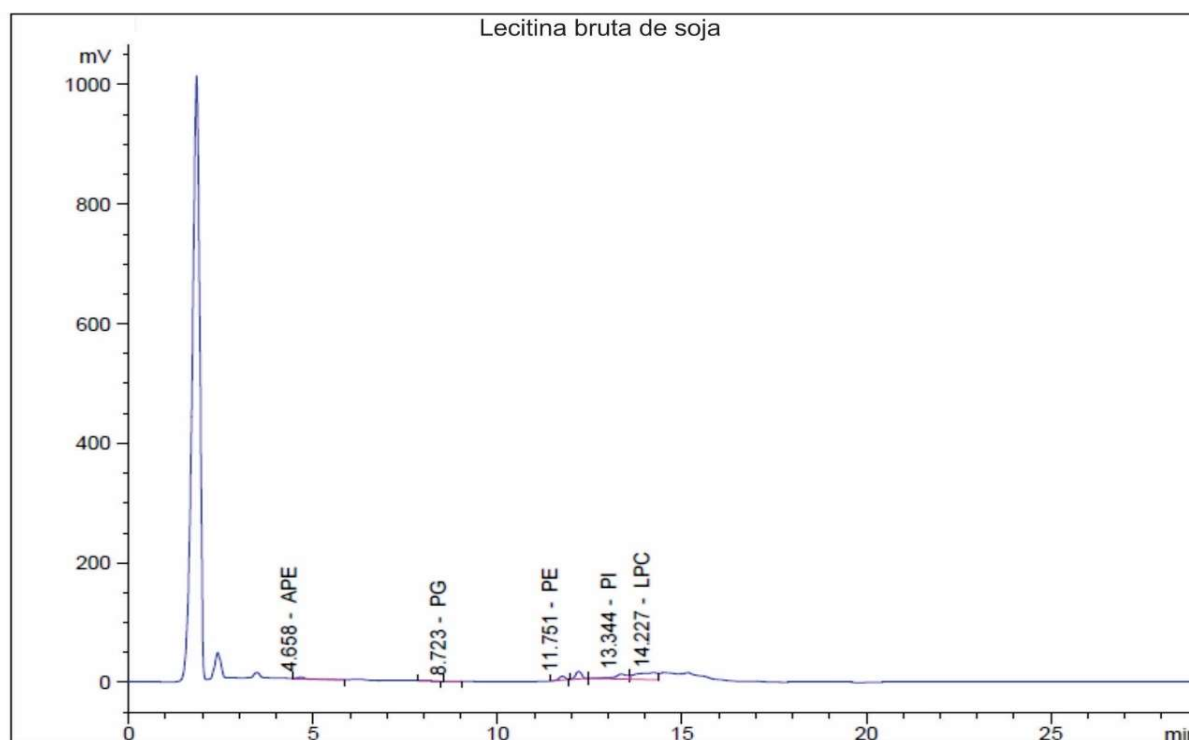
Legenda: AL: Padrão de ácido linoleico; PC: Padrão de PC; PE: Padrão de PE; PI: Padrão de PI; AF: Padrão de ácido fosfatídico; TO: Padrão de trioleína; LBS: Lecitina bruta de soja; Ppt: Precipitado; SB: Sobrenadante; Amostras A e B: Eluição com acetona; Amostras D, e E: Eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v).

Nas amostras A e B, obtidas após a eluição da coluna com acetona, foi verificada a perda de cada espécie de fosfolipídio, já nas amostras C e D, eluídas com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v), foi verificada a quantidade de cada um dos compostos caracterizados neste trabalho como família dos PLs (PC, PE e PI).

Todos os picos foram determinados automaticamente pelo software, e foi considerado enriquecimento (ou purificação) dos PLs o aumento do teor de cada um destes compostos em relação a lecitina bruta de soja (matriz).

O cromatograma da lecitina bruta de soja (matriz de trabalho) é apresentado na Figura 31, e os resultados apresentados na Tabela 7:

Figura 31: Cromatograma da lecitina bruta de soja.



Fonte: O autor.

Legenda: APE: Acilfosfatidiletanolamina; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; PI: Fosfatidilinositol; LPC: Lisofosfatidilcolina

Tabela 7: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de lecitina bruta de soja.

Sigla	Pico (nº)	RT (min)	Área	Área (%)	Concentração (mg.mL ⁻¹)
APE	1	4,66	65,088	6,60	0,0633
PA	2	8,03	4,680	0,47	0,2591
PG	3	8,72	5,601	0,57	0,0957
PE	4	11,75	69,395	7,03	0,2431
PC	5	12,20	145,569	14,75	0,2452
PI	6	13,34	234,640	23,78	0,0000
LPC	7	14,23	461,901	46,80	0,2793
Total:			986,873		1,1858

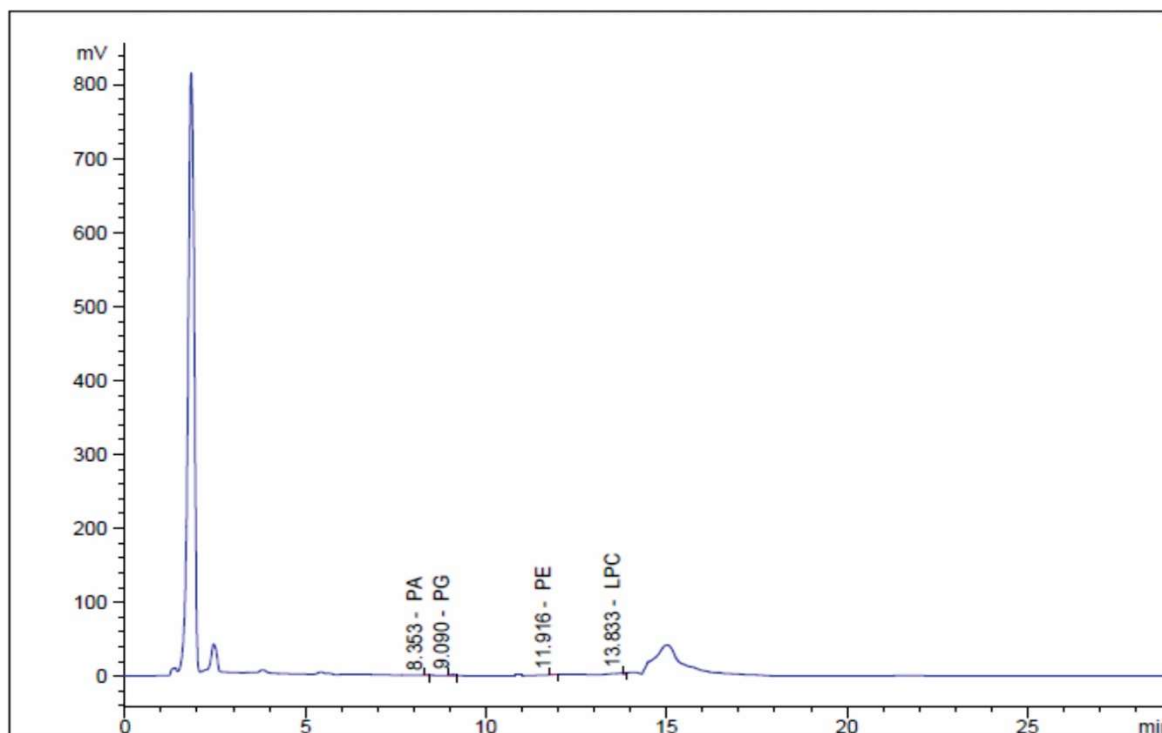
Fonte: O autor.

Legenda: RT: Tempo de retenção; APE: Acilfosfatidiletanolamina; PA: Ácido fosfático; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol; LPC: Lisofosfatidilcolina.

Foram detectadas as seguintes concentrações dos PLs nesta amostra: APE: 0,0633 mg.mL⁻¹; PE: 0,2431 mg.mL⁻¹; PC: 0,2452 mg.mL⁻¹; LPC: 0,2793 mg.mL⁻¹, já o PI não foi detectado pelo equipamento.

Com a aplicação da amostra (precipitado) suspensa em acetona, e aplicada na coluna de PAVT-DEAE⁺ foi obtido a “Amostra A” (primeira eluição com acetona). O cromatograma obtido é apresentado na Figura 32 e seus resultados na Tabela 8.

Figura 32: Cromatograma da amostra A (Primeira eluição com acetona).



Fonte: O autor.

Legenda: PA: Ácido Fosfatídico; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; LPC: Lisofosfatidilcolina.

Tabela 8: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "A".

Sigla	Pico (nº)	RT (min)	Área	Área (%)	Concentração (mg.mL ⁻¹)
APE	1	0,00	0,000	0,00	0,0000
PA	2	8,35	5,229	12,07	0,2593
PG	3	9,09	12,730	29,40	0,0991
PE	4	11,92	10,191	23,53	0,2273
PC	5	0,00	0,000	0,00	0,0000
PI	6	0,00	0,000	0,00	0,0000
LPC	7	13,83	15,157	35,00	0,0854
Total:			43,307		0,6710

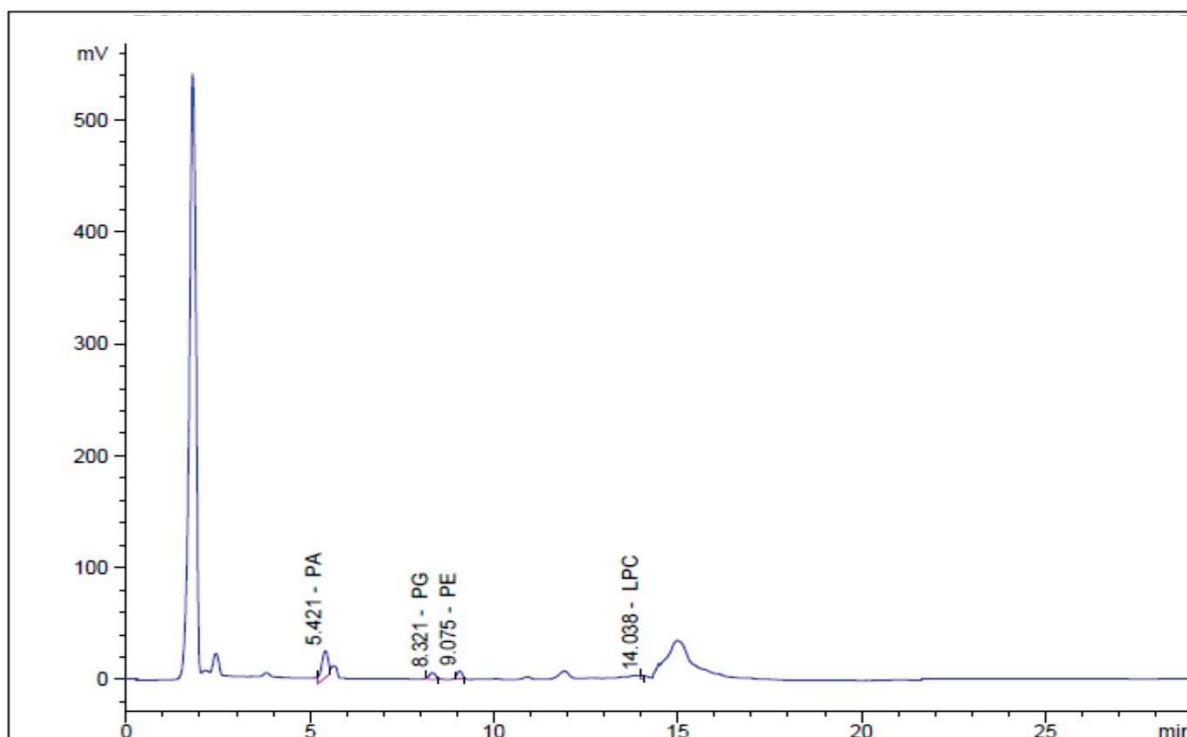
Fonte: O autor.

Legenda: RT: Tempo de retenção; APE: Acilfosfatidiletanolamina; PA: Ácido fosfatídico; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol; LPC: Lisofosfatidilcolina.

Esta eluição teve como objetivo a remoção dos TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, ainda presentes no precipitado, e o favorecimento da precipitação e retenção dos PLs na coluna. Nesta amostra, já havia sido detectado (via cromatografia em camada delgada) a presença de PE, fato comprovado pela massa detectada via CLAE e quantificada em $0,2273 \text{ mg.mL}^{-1}$. Também foi detectada a presença de ácido fosfatídico ($0,2593 \text{ mg.mL}^{-1}$). Um fato importante desta amostra é que não foi detectada a PC (fosfolípido com maior presença na lecitina bruta de soja), confirmando a avaliação anterior, realizada por CCD, de que não havia perda deste composto.

Com o mesmo intuito da eluição que gerou a “Amostra A”, foi realizada a segunda eluição com acetona gerando a “Amostra B”, coletada separadamente para verificar quaisquer alterações na eluição dos compostos a serem analisados (PLs) e para comprovar que os compostos que não eram de interesse (TAGs, DAGs, MAGs e AGLs) haviam sido completamente solubilizados, deixando adsorvidos os PLs na matriz de troca iônica. Esta eluição originou o cromatograma apresentado na Figura 33 e a Tabela 9.

Figura 33: Cromatograma da amostra B (Segunda eluição com acetona).



Fonte: O autor.

Legenda: PA: Ácido Fosfatídico; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; LPC: Lisofosfatidilcolina.

Tabela 9: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "B".

Sigla	Pico (nº)	RT (min)	Área	Área (%)	Concentração (mg.mL⁻¹)
APE	1	0,00	0,000	0,00	0,0000
PA	2	5,42	297,269	65,67	0,3561
PG	3	8,32	68,505	15,13	0,1253
PE	4	9,08	75,360	16,65	0,2447
PC	5	0,00	0,000	0,00	0,0000
PI	6	0,00	0,000	0,00	0,0000
LPC	7	14,04	11,531	2,55	0,0838
Total:			452,665		0,8099

Fonte: O autor.

Legenda: RT: Tempo de retenção; APE: Acilfosfatidiletanolamina; PA: Ácido fosfatítico; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol; LPC: Lisofosfatidilcolina.

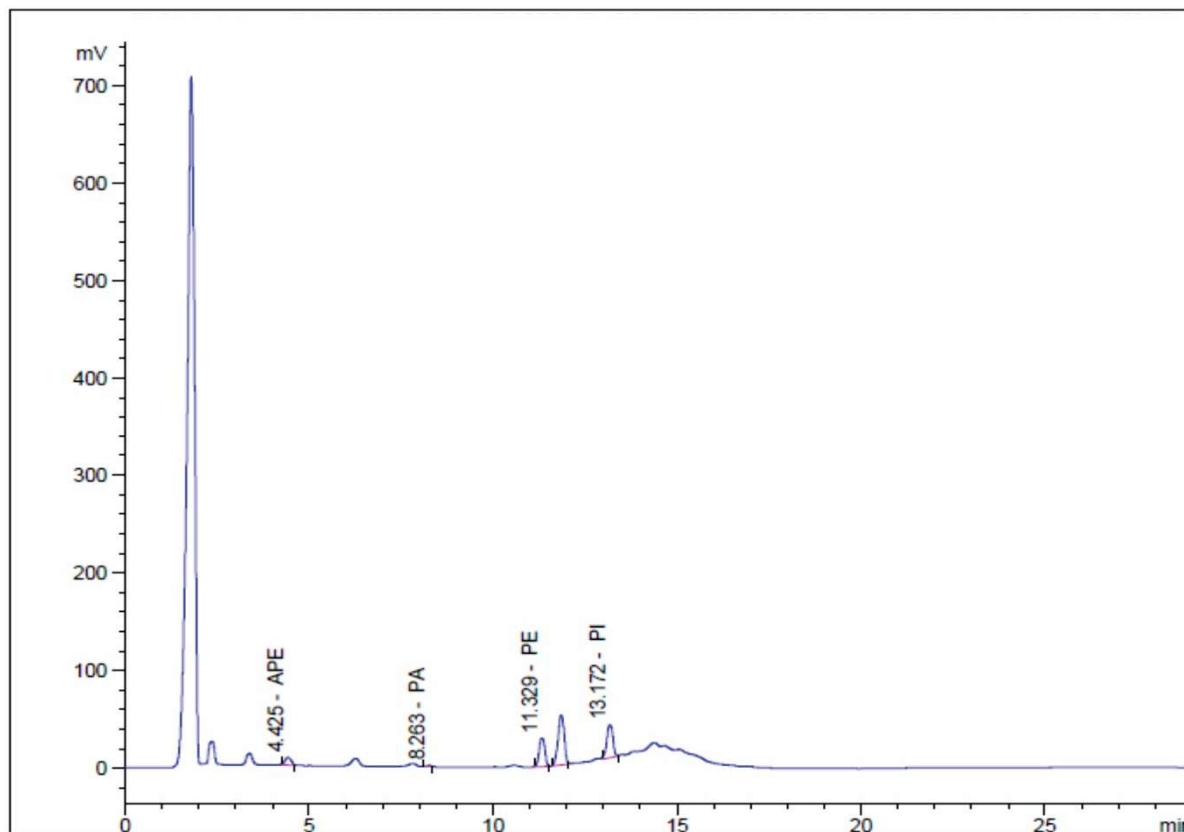
Novamente, nesta eluição foi possível perceber que a PC e o PI não foram eluídos pela acetona, porém, novamente ocorreu perda de parte da massa de PE (0,2447 mg.mL⁻¹).

A eluição de PE nos dois casos pode ter ocorrido justamente pelo efeito da formação de micelas constituídas (como já elucidado anteriormente neste trabalho) pelos outros PLs que foram eluídos.

Após as eluições, utilizando acetona, foram realizadas duas lavagens das colunas com a mistura clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 :3 v/v), afim de remover todos os compostos que ficaram retidos na matriz PAVT-DEAE⁺. Novamente foram coletadas duas amostras distintas para que fosse possível verificar a possível alteração dos perfis obtidos.

Para melhor avaliação dos resultados, e assim como apresentado anteriormente, os dados obtidos para cada amostra são apresentados separadamente. Na Figura 34 e na Tabela 10 são demonstrados os resultados obtidos com a análise da "Amostra C".

Figura 34: Cromatograma da amostra C (Primeira eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v)).



Fonte: O autor.

Legenda: APE: Acilfosfatidiletanolamina; PA: Ácido Fosfatídico; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina.

Tabela 10: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "C".

Sigla	Pico (nº)	RT (min)	Área	Área (%)	Concentração (mg.mL ⁻¹)
APE	1	4,43	90,451	6,38	0,0650
PA	2	8,26	16,976	1,20	0,2631
PG	3	0,00	0,000	0,00	0,0000
PE	4	11,33	319,778	22,56	0,3100
PC	5	11,85	598,541	42,22	0,3541
PI	6	13,17	391,903	27,64	0,0084
LPC	7	0,00	0,000	0,00	0,0000
Total:			1417,649		1,0007

Fonte: O autor.

Legenda: RT: Tempo de retenção; APE: Acilfosfatidiletanolamina; PA: Ácido fosfatídico; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol; LPC: Lisofosfatidilcolina.

Como esperado, e anteriormente visualizado através da CCD, a eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v) solubilizou todos os compostos adsorvidos à matriz de troca iônica e revelou a presença da PC e do PI (esta não havia sido detectada na análise da lecitina bruta de soja), compostos não

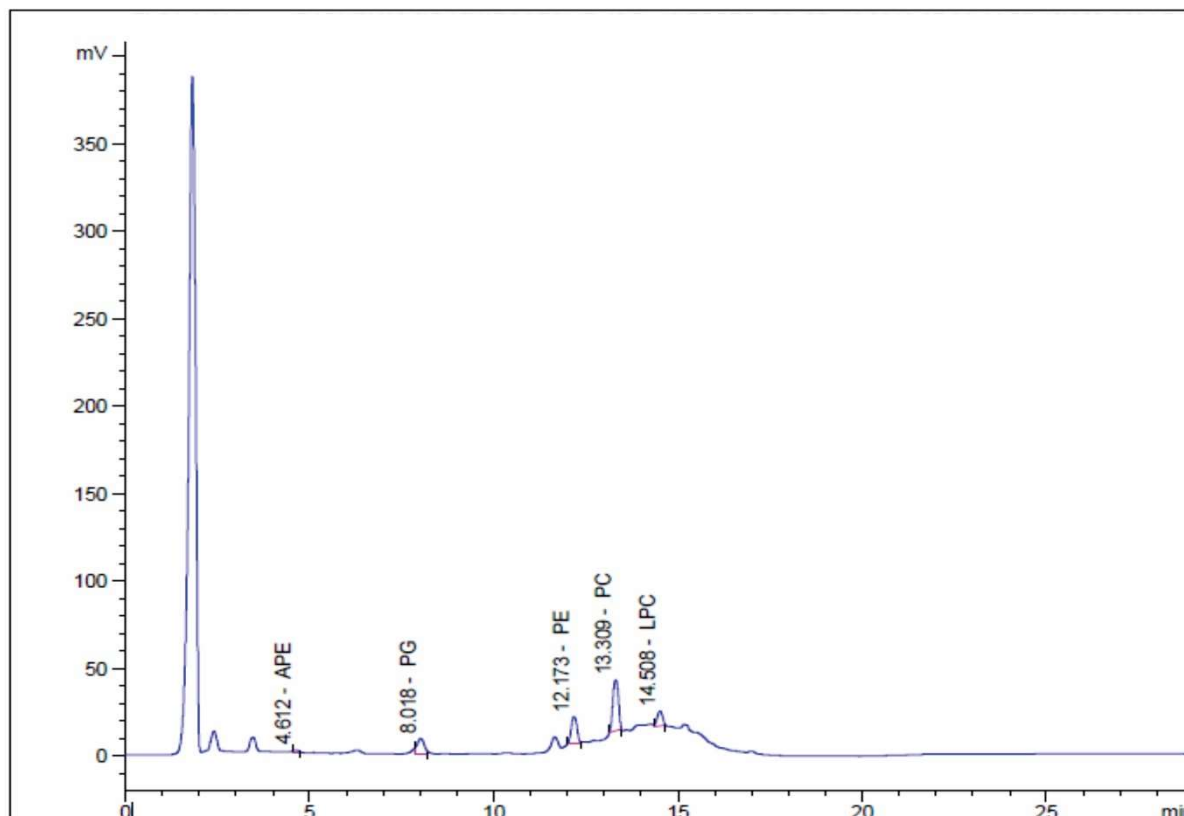
detectados nas análises anteriores. A massa de PC nesta análise foi calculada em $0,3541 \text{ mg.mL}^{-1}$, PI $0,0084 \text{ mg.mL}^{-1}$ e PE $0,3100 \text{ mg.mL}^{-1}$.

O fato da lisofosfatidilcolina (LPC) não ter sido detectada nesta fração pode ter ocorrido em decorrência desta espécie ser um produto da hidrólise da PC, onde um dos ácidos graxos foi substituído por uma hidroxila. Esta substituição favorece a solubilização desta espécie em acetona, constatado nas “Amostras A e B”, nas quais foram obtidas frações deste composto.

Diferentemente do que ocorreu com a LPC, a utilização de acetona como eluente favoreceu a precipitação e conseqüentemente a adsorção no PAVT-DEAE⁺ da PC e do PI.

A realização da segunda eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v) encerra o ciclo de análises deste processo de purificação. Esta eluição gerou a “Amostra D”, e seus resultados são apresentados na Figura 35, assim como na Tabela 11.

Figura 35: Cromatograma da amostra D (Segunda eluição com clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (30 : 16 : 3 v/v)).



Fonte: O autor.

Legenda: APE: Acilfosfatidiletanolamina; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; LPC: Lisofosfatidilcolina.

Tabela 11: Resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra "D".

Sigla	Pico (nº)	RT (min)	Área	Área (%)	Concentração (mg.mL ⁻¹)
APE	1	4,61	17,644	2,54	0,0601
PA	2	8,02	149,043	16,85	0,3069
PG	3	8,02	123,609	17,80	0,1512
PE	4	12,17	165,308	23,81	0,2687
PC	5	13,31	299,786	43,18	0,2823
PI	6	0,00	0,000	0,00	0,0000
LPC	7	14,51	87,936	12,67	0,1170
Total:			694,284		0,8793

Fonte: O autor.

Legenda: RT: Tempo de retenção; APE: Acilfosfatidiletanolamina; PA: Ácido fosfatítico; PG: Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol; LPC: Lisofosfatidilcolina.

Assim como obtido na "Amostra C", foi detectada a presença da PC (0,2823 mg.mL⁻¹) e PE (0,2687 mg.mL⁻¹), mostrando que mesmo com a utilização de acetona no pré-tratamento e nas eluições iniciais, esta espécie de fosfolípido teve interação com a matriz de PAVT-DEAE⁺, porém em menor intensidade quando comparada com a PC e PI.

Afim de fornecer um panorama geral do enriquecimento dos PLs (PC, PE e PI) obtidos, na Tabela 12 são comparados os teores de cada um destes compostos entre as amostras: lecitina bruta de soja, "Amostra C" e "Amostra D", e na Figura 36 estes dados são retratados graficamente.

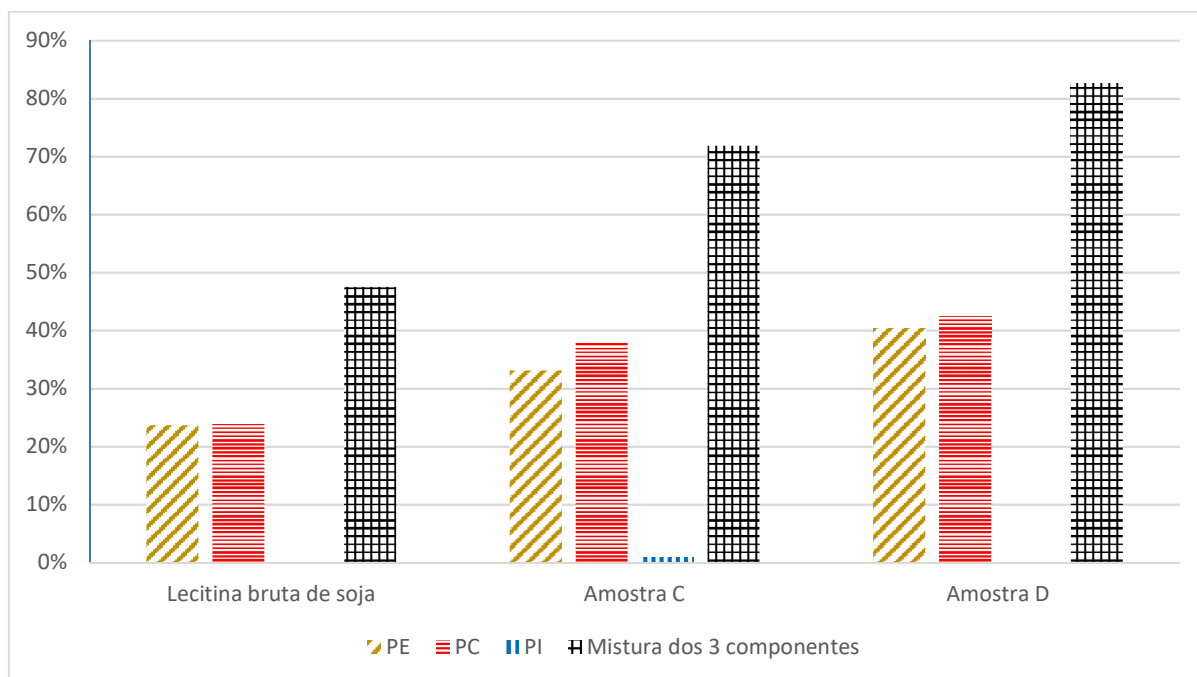
Tabela 12: Comparação entre os teores (%) de PE, PC, PI e a mistura destes PLs obtidos em cada amostra.

Espécie	Lecitina bruta de soja	Amostra C	Amostra D
PE	23,68	33,13	40,30
PC	23,88	37,78	42,34
PI	0	0,01	0,00
Mistura dos 3 componentes	47,56	71,89	82,63

Fonte: O autor;

Legenda: PE: Fosfatidiletanolamina. PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol.

Figura 36: Representação gráfica dos valores de enriquecimento obtidos.



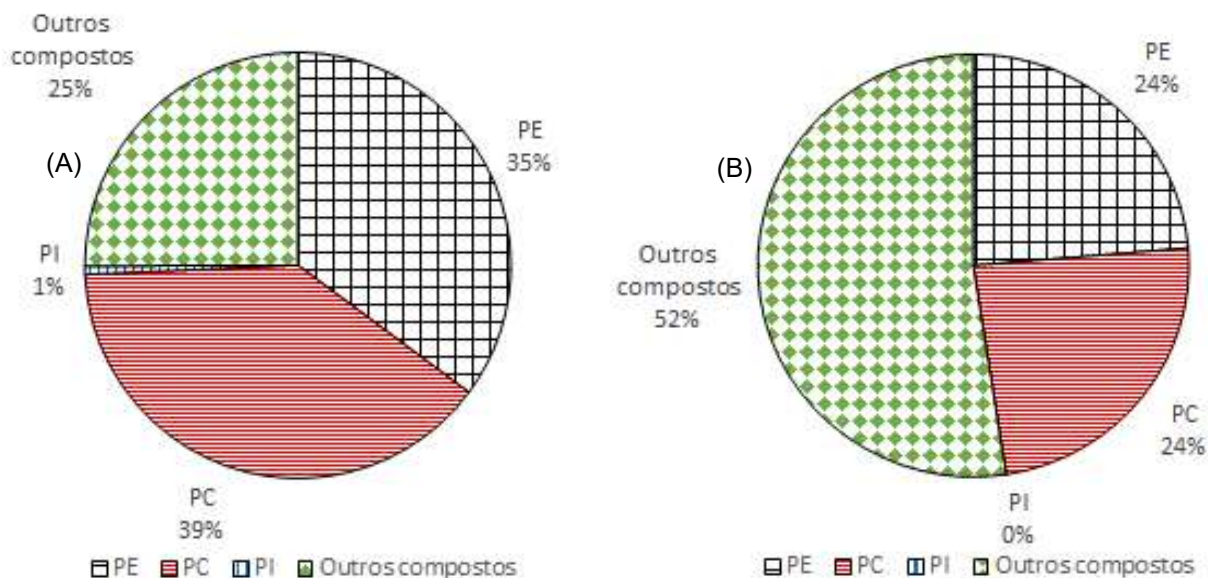
Fonte: O autor.

Legenda: PE: Fosfatidiletanolamina. PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol.

Outra representação pertinente, é a comparação proporcional da massa de cada espécie de fosfolípido em relação à massa total na lecitina bruta de soja e das amostras coletadas após suas eluições. Na Figura 37 são representados (segundo os dados obtidos por CLAE) os gráficos A e B, nos quais são apresentadas as massas de PE, PC e PI de uma fração de 50 mg de lecitina bruta de soja (gráfico A), e a soma das Amostras C e D (gráfico B) que equivalem a 82,5 mg, e na Tabela 13 os valores utilizados para a confecção destes gráficos são discriminados.

Como a eluição das Amostras C e D com a mesma mistura de solventes tinha por objetivo a remoção dos PLs livres dos compostos que não eram de interesse, e decorrente a isto estas amostras apresentaram perfis semelhantes, a interpretação dos valores destas amostras somados é justificável.

Figura 37: Massa (mg) de PE, PC e PI em: (A) 82,5 mg obtidas com a junção das amostras C e D; (B) 50 mg de lecitina bruta de soja.



Fonte: O autor.

Legenda: PE: Fosfatidiletanolamina. PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol.

Tabela 13: Massa e teor de cada fosfolípido nas amostras C+D e lecitina bruta de soja, calculadas a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Fosfolípido	Conjunto "Amostra C + D" (82,5 mg)		Amostra de lecitina de soja bruta (50 mg)	
	Massa (mg)	Teor (%)	Massa (mg)	Teor (%)
PE	29,02	35,17	11,84	23,68
PC	32,28	39,13	11,94	23,88
PI	0,53	0,64	0	0

Fonte: O autor.

Legenda: PE: Fosfatidiletanolamina. PC: Fosfatidilcolina; PI: Fosfatidilinositol.

De acordo com os dados apresentados verificou-se que o teor dos fosfolípidos nas amostras obtidas foi elevado quando comparado com os valores registrados na análise da lecitina bruta de soja.

No conjunto "Amostra C + D" foi obtido aumento de 15,25% no teor de PC. Já, para o PI foi detectado 0,64% deste fosfolípido que não havia sido detectado na análise por CLAE. A PE, espécie que apresentou perda de sua massa nas Amostras A e B, ainda teve aumento de 11,49% no teor em relação a lecitina bruta de soja.

Tendo em vista os resultados obtidos pode-se comprovar que a utilização do PAVT-DEAE⁺, juntamente com o pré-tratamento da lecitina bruta de soja utilizando acetona, é uma forma simples e rápida de enriquecimento e potencial purificação dos PLs, quando comparada a outros métodos, já que não necessita de elevados investimentos em maquinário ou utilização de elevados volumes de solventes ou mais

que dois procedimentos sequenciais, diferentemente da rotina adotada por outros pesquisadores.

Nzai e Proctor (1998) adicionaram 2% de água em 500 g de lecitina bruta de soja e aqueceram a 90 °C por 30 minutos sob agitação. Sequencialmente, o material foi centrifugado a 30xg por 10 minutos, para que então fossem realizadas três lavagens com 100 mL de acetona. O extrato obtido foi seco a vácuo para remoção da acetona residual, e então dissolvido em clorofórmio : metanol (90 : 10 v/v) para aplicação em coluna de sílica, eluindo-a com clorofórmio para remoção dos lipídios apolares e metanol para remoção dos fosfolipídios.

Com este processo foram obtidos teores de 27,1% de PC, 22,7% de PE e 17,2% de PI, em uma fração de aproximadamente 86% de fosfolipídios totais, tendo os resultados sido quantificados por densitometria de imagem realizada em cromatografia de camada delgada.

Verardo *et al.* (2013) compararam duas formas de extração do óleo de oliva virgem, sendo que, na extração líquido-líquido 100 g de óleo de oliva virgem foram dissolvidos em 400 mL de hexano, e sequencialmente lavado três vezes com 100 mL de etanol : água (87 : 13 v/v), para que então o extrato etanólico fosse lavado com 100 mL de *n*-hexano para que os fosfolipídios fossem obtidos após a evaporação do solvente contendo etanol, sob vácuo. Os teores de PLs obtidos por esta metodologia foram menores que os obtidos quando comparados com o método descrito na sequência.

A extração em fase sólida foi realizada com a solubilização de 40 g da mesma matriz em 40 mL de *n*-hexano, para posterior eluição em colunas de separação em fase sólida (SPE) comerciais. Após o condicionamento com *n*-hexano, a amostra passou por limpeza com aplicações sucessivas de 6 mL de *n*-hexano, 6 mL de *n*-hexano : éter dietílico (8 : 2 v/v), 6 mL de *n*-hexano : éter dietílico (1 : 1 v/v) para que então fossem recuperados com 4 mL de metanol e 6 mL de clorofórmio : metanol : água (3 : 5 : 2 v/v), com posterior secagem do solvente sob vácuo e finalmente ressolubilizadas para análise. Mesmo se tratando de uma matriz com teor de fosfolipídios menor que a lecitina bruta de soja, esta metodologia forneceu teor de ácido lisofosfatídico de 51,3% (sendo a espécie majoritária na fração), liso-PC 14,7%, PI 12,5%, PC 10,9% e PA 9,8%.

Patil *et al.* (2010) prepararam uma suspensão de 100 g de sílica em acetato de etila, a qual foi acondicionada em uma coluna de cromatográfica de vidro. Nesta coluna foi adicionado a suspensão de 3 g lecitina bruta de soja solubilizada em 3 mL de éter de petróleo. Sequencialmente foram realizadas eluições da coluna com 150 mL de acetona, 100 mL de acetato de etila, 100 mL de acetato de etila : metanol (50 : 50 v/v), 100 mL de acetato de etila : metanol (35 : 65 v/v), 100 mL de acetato de etila : metanol (30 : 70 v/v), 100 mL de acetato de etila : metanol (20 : 80 v/v), 100 mL de acetato de etila : metanol (10 : 90 v/v), e 100 mL de metanol. Após as análises em CLAE foi concluído que o teor de PC chegou a 84%.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que a utilização do PAVT-DEAE⁺ em conjunto com o pré-tratamento utilizando acetona (uma forma simples e utilizando baixos volumes de solvente, quando comparados a outros trabalhos) é passível de uso para o enriquecimento da Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE) e do Fosfatidilinositol (PI), já que os teores destes fosfolipídios obtidos no conjunto “Amostras C + D” são maiores que os originais presentes na matriz sem tratamento.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a purificação da lecitina bruta de soja, de fato uma mescla fosfolipídica bruta com multicomponentes, pode ser realizada com outros solventes orgânicos que não os contemplados na literatura, possibilitando alternativas de baixo custo, maior eficiência e seletividade dos compostos alvo, além de possibilitar a utilização de novos materiais trocadores iônicos.

O mesmo escopo, todavia, pode ser aprimorado quando se lançou mão de matrizes trocadoras iônicas de baixo custo. No caso, ionização de um PAVT – Pó de Algodão da Varredura Têxtil, derivatizado a 3 diferentes formas: carboximetilada (PAVT-CM⁻), aminoetilada (PAVT-AE⁺) e dietilaminoetilada (PAVT-DEAE⁺). Esta última demonstrou o melhor de todos resultados, visto que, favoreceu o enriquecimento da família de fosfolipídios (mais especificamente da fosfatidilcolina), além de permitir a eluição dos compostos neutros nas eluições iniciais.

Este processo de purificação foi realizado inicialmente pelo pré-tratamento com acetona e sequencialmente aplicado à matriz de troca iônica (PAVT-DEAE⁺), tendo a capacidade de eliminar da amostra tratada os triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs), monoacilgliceróis (MAGs) e parte dos ácidos graxos livres (AGLs) da mescla fosfolipídica obtida, sendo que a espécie com maior rendimento entre os fosfolipídios foi a Fosfatidilcolina (PC), seguida pela Fosfatidiletanolamina (PE), mesmo tendo ocorrido eluição desta espécie em frações anteriores, e aumentando o teor do Fosfatidilinositol (PI), composto que não havia sido detectado na amostra de lecitina bruta de soja (matriz de trabalho) na análise realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o que corrobora a eficácia de enriquecimento do processo.

Com o enriquecimento dos PLs como apresentado, formas de purificação seletiva, isto é, a obtenção de espécies de cada fosfolipídio é passível de ser realizada com a mesma técnica utilizada, porém com a utilização de outros solventes, ou mesmo fornecer amostras com grau de pureza superior (quando comparadas com a lecitina bruta de soja) para outras formas de purificação e obtenção de cada um dos fosfolipídios presentes nesta matriz.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a forma de adsorção dos fosfolípidios com base em modelos como Lagmuir, Freundlich;
- Otimizar a proporção entre matriz de troca iônica e lecitina bruta de soja;
- Otimizar o volume de solvente utilizado no pré-tratamento;
- Otimizar o volume de solvente utilizado nas eluições das colunas;
- Aprimorar a dessorção dos compostos de interesse para que ocorra de forma seletiva;
- Testar outros materiais passíveis de derivatização.

BIBLIOGRAFIA

A.O.C.S., A. O. C. S. **AOCS Official Method Ja 4-46 - Acetone-Insoluble Matter in Vegetable Lecithins**. USA: American Oil Chemists' Society 2017.

ADINUGRAHA, M. P.; MARSENO, D. W.; HARYADI, P. Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* Lambert). **Carbohydrate Polymers.**, v. 62, n. 2, p. 164 - 169, 2005.

ALC. **Lecithins and Phospholipids, A simple guide to use and selection**. Oxford: American Lecithins Company, 2009.

ALI-NEHARI, A.; CHUN, B.-S. Characterization of purified phospholipids from krill (*Euphausia superba*) residues deoiled by supercritical carbon dioxide. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 7, p. 918-924, 2012/07/01 2012. ISSN 1975-7220. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0273-4> >.

ALVES, A. C.; RIBEIRO, D.; HORTA, M.; LIMA, J. L. F. C.; NUNES, C.; REIS, S. The daunorubicin interplay with mimetic model membranes of cancer cells: A biophysical interpretation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 5, p. 941-948, 2017. ISSN 0005-2736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273617300421> >.

AMAZONAS, L. **Análise mensal - SOJA - Maio de 2018**. CONAB. CONAB. 2018

ANGALA, S. K.; BELARDINELLI, J. M.; HUC-CLAUSTRE, E.; WHEAT, W. H.; JACKSON, M. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 5, p. 361-399, 2014/09/01 2014. ISSN 1040-9238. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2014.925420> >.

AWAPARA, J.; LANDUA, A. J.; FUERST, R.; SEALE, B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. **J Biol Chem.**, v. 187, n. 1, 1950.

BALDO, G. R. **Derivatização aniônica e catiônica de resíduos do processamento dos fios de algodão para remoção de corantes têxteis**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba - PR, Brasil: 2014.

BALDO, G. R.; DÖHLER, L.; GRZYBOWSKI, A.; TIBONI, M.; SCREMIN, L. B.; KOOP, H. S.; SANTANA, M. J.; LIÃO, L. M.; FONTANA, J. D. Partially carboxymethylated cotton dust waste for sorption of textile wastewater coloured with the cationic dye Basic

Blue 41 as a model: synthesis, regeneration and biodegradability. **Cellulose**, v. 21, n. 4, p. 3041-3053, 2014/08/01 2014. ISSN 1572-882X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0304-5> >.

BIRGE, R. B.; BOELTZ, S.; KUMAR, S.; CARLSON, J.; WANDERLEY, J.; CALIANESE, D.; BARCINSKI, M.; BREKKEN, R. A.; HUANG, X.; HUTCHINS, J. T.; FREIMARK, B.; EMPIG, C.; MERCER, J.; SCHROIT, A. J.; SCHETT, G.; HERRMANN, M. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. **Cell Death Differ**, v. 23, n. 6, p. 962-78, Jun 2016. ISSN 1476-5403 (Electronic)

1350-9047 (Linking).

BUCHMAN, A. L.; SOHEL, M.; BROWN, M.; JENDEN, D. J. Verbal and visual memory improve after choline supplementation in long-term total parenteral nutrition: a pilot study. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 25, n. 1, 2001.

BURRI, L.; HOEM, N.; BANNI, S.; BERGE, K. **Marine Omega-3 Phospholipids: Metabolism and Biological Activities**. 2012. 15401-19.

CALDER, P. C. The ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet: impact on T lymphocytes function. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, p. 390-398, 2001.

CALDER, P. C.; YAQOUB, P.; THIES, F.; WALLACE, F. A.; MILES, E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 1, p. s31-s48, 2002.

CANTY, D. J.; ZEISEL, S. H. Lecithin and choline in human health and disease. **Nutr Rev**, v. 52, n. 10, p. 327-39, Oct 1994. ISSN 0029-6643 (Print)

0029-6643 (Linking).

CARVALHO, W. S.; MARTINS, D. F.; GOMES, F. R.; LEITE, I. R.; SILVA, G. L.; RUGGIERO, R.; RICHTER, E. M. Phosphate adsorption on chemically modified sugarcane bagasse fibres. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3913 - 3919, 2011.

CASEY, J. Lecithin as an antioxidant for fats in animal foods. Lec-T-36. **Central Soya European Proteins**, 1999.

CASTEJON, L. V. **Estudo da clarificação de lecitina de soja**. 2010. 133 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia

CHAURIO, R. A.; JANKO, C.; MUÑOZ, L. E.; FREY, B.; HERRMANN, M.; GAIPL, U. S. Phospholipids: Key Players in Apoptosis and Immune Regulation. **Molecules** **2009**, v. 14, p. 4892-4914, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/molecules14124892> >.

CHEN, Y. X.; WANG, G. Y. Adsorption properties of oxidized carboxymethyl starch and cross-linked carboxymethyl starch for calcium ion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.**, v. 289, n. 1 - 3, p. 75 - 83, 2006.

CHENG, H. N.; BISWAS, A. Chemical modification of cotton-based natural materials: Products from carboxymethylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1004 - 1010, 2011.

CHRISTIE, W. W. Phosphatidylethanolamine and related lipids: structure, occurrence, biochemistry and analysis. James Hutton Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Scotland., 01/07/2014 2014a. Disponível em: < <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39352> >. Acesso em: 01/03/2017.

_____. Phosphatidylinositol and related lipids: structure, occurrence, composition and analysis James Hutton Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Scotland., 14/07/2014 2014b. Disponível em: < <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39352> >. Acesso em: 12/03/2017.

COMFURIUS, P.; ZWAAL, R. F. A. The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 488, n. 1, p. 36-42, 1977/07/20 1977. ISSN 0005-2760. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005276077901205> >.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira - Grãos.** Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília - DF: Conab 2018.

CORRÊA JR., I. R.; PILLI, R. A. Reações aldólicas assimétricas catalíticas. **Química Nova**, v. 26, p. 531-541, 2003. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400016&nrm=iso >.

CULLIS, P. R.; HOPE, M. J.; TILCOCK, C. P. S. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. **Chem Phys Lipids**, v. 40, n. 2, p. 127-144, 1986/06/01/ 1986. ISSN 0009-3084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009308486900678> >.

DAICHENG, L.; FUCUI, M. **Soybean Phospholipids, Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products**. Prof. Dora Krezhova (Ed.). 2011. ISBN ISBN: 978-953-307-533-4.

DARABI, M.; GUILLAS-BAUDOIN, I.; LE GOFF, W.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. Therapeutic applications of reconstituted HDL: When structure meets function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 157, p. 28-42, 2016/01/01/ 2016. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725815002028> >.

DIJKSTRA, A. J. Edible Oil Processing: Introduction to Degumming. 2014. Disponível em: < <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40325> >.

DO, U. H.; LO, S. L. Separation of phospholipids using a diethylaminoethyl-silica gel column and thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 381, Oct, 1986 1986.

EMBRAPA. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos, e subprodutos**. EMBRAPA Soja - Londrina PR. 2: 41 p. 2015.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; FRASCH, S. C.; WARNER, M. L.; HENSON, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ**, v. 5, n. 7, p. 551-62, Jul 1998. ISSN 1350-9047 (Print)

1350-9047 (Linking).

FERREIRA, A. K.; SANTANA-LEMOS, B. A. A.; REGO, E. M.; FILHO, O. M. R.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **Br J Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2819-2828, 2013. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.510> >.

FOLCH, J. Brain cephalin, a mixture of phosphatides. Separation from it of phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine, and a fraction containing an inositol phosphatide. **The journal of biological chemistry**, v. 35, p. 146, 27/08/1942 1942. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/146/1/35.full.pdf> >.

FONTANA, J. D.; BALDO, G. R.; GRZYBOWSKI, A.; TIBONI, M.; SCREMIN, L. B.; KOOP, H. S.; SANTANA, M. J.; LIÃO, L. M.; DÖHLER, L. Textile cotton dust waste: partial diethylaminoethylation and its application to the sorption/removal of the model residual textile dye Reactive Red 239. **Polymer Bulletin**, v. 73, n. 12, p. 3401-3420, 2016/12/01 2016. ISSN 1436-2449. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1663-x> >.

FORNAZIERI JR, A. K., ÁLVARO LUIZ; BARRERA, PAULO; ANSEMI, RENATO; BASTOS, EDNA; MATOS, MARIALICE PAVAN DE; SCHMIDT, ANTONIO PIRES; PADOVANI, MARIA ISABEL;. **Manual Brasil Agrícola: Principais produtos agrícolas**. São Paulo, Brasil: Ícone, 1999. ISBN 85-274-0572-5.

GAREGG, M. A. C.; ROBERTS, E. J. **Removal of color, polysaccharides, phenolics and turbidity from sugar-containing solutions and derivated fibrous residues therefore** 1996.

GLASSMAN, F. Y.; SCHNEIDER, J. L.; RAMAKRISHNAN, R.; DINGMAN, R. K.; RAMANATHAN, M.; BANKERT, R. B.; BALU-IYER, S. V. Phosphatidylserine Is Not Just a Cleanup Crew but Also a Well-Meaning Teacher. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018/04/09/ 2018. ISSN 0022-3549. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354918302004> >.

GONG, R.; JIN, Y.; CHEN, F.; CHEN, J.; LIU, Z. Enhanced malachite green removal from aqueous solution by citric acid modified rice straw. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 2, p. 865 - 870, 2006.

GORMLEY, J. J. Brewer's yeast and lecithin – two underrated health promoters. . **Better Nutrition**, v. 59, n. 2, 1997.

GUPTA, A. K. S. Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Raffination der Speiseöle. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 3, p. 79-86, 1986/01/01 1986. ISSN 0015-038X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/lipi.19860880302> >. Acesso em: 2018/08/18.

JANGLE, R. D.; MAGAR, V. P.; THORAT, B. N. Phosphatidylcholine and its purification from raw de-oiled soya lecithin. **Separation and Purification Technology**, v. 102, p. 187-195, 2013/01/04/ 2013. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005242> >.

KAMEL, S.; ABOU-YOUSEF, H.; YOUSEF, M.; EL-SAKHAWY, M. **Potential use of bagasse and modified bagasse for removing of iron and phenol from water**. 2012. 250–256.

KIM, H.-Y.; HUANG, B. X.; SPECTOR, A. A. Phosphatidylserine in the brain: Metabolism and function. **Progress in Lipid Research**, v. 56, p. 1-18, 2014/10/01/ 2014. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782714000289> >.

KIM, H.; KIM, K.; LEE, H.-R.; JO, H.; JEONG, D.-W.; RYU, J.; GWEON, D.-G.; CHOI, S. Q. Formation of stable adhesive water-in-oil emulsions using a phospholipid and cosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 55, p. 198-203,

2017/11/25/ 2017. ISSN 1226-086X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X17303350> >.

KNUIMAN, J. T.; BEYNEN, A. C.; KATAN, M. B. **Lecithin intake and serum cholesterol. The American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda,** v. 49, 1989.

KOREMATSU, S.; YAMADA, H.; MIYAHARA, H.; IHARA, K. Increased levels of anti-phosphatidylcholine and anti-phosphatidylethanolamine antibodies in pediatric patients with cerebral infarction. **Brain and Development**, v. in press article, 2017. ISSN 0387-7604. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0387760417300104> >.

KORIS, A.; VATAI, G. Dry degumming of vegetable oils by membrane filtration. **Desalination**, v. 148, n. 1, p. 149-153, 2002/09/10/ 2002. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916402006690> >.

KUTSENKO, L. I.; BOCHEK, A. M.; VLASOVA, E. N.; VOLCHEK, B. Z. Synthesis of carboxymethyl cellulose based on short fibers and lignified part of flax pedicels (boon). **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 2014 - 2018, 2005.

LEE, B.; SUR, B.-J.; HAN, J.-J.; SHIM, I.; HER, S.; LEE, H.-J.; HAHM, D.-H. Krill phosphatidylserine improves learning and memory in Morris water maze in aged rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1085-1093, 2010/08/16/ 2010. ISSN 0278-5846. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584610002150> >.

LEHTINEN, O.-P.; NUGROHO, R. W. N.; LEHTIMAA, T.; VIERROS, S.; HIEKKATAIPALE, P.; RUOKOLAINEN, J.; SAMMALKORPI, M.; ÖSTERBERG, M. Effect of temperature, water content and free fatty acid on reverse micelle formation of phospholipids in vegetable oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 160, p. 355-363, 2017/12/01/ 2017. ISSN 0927-7765. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776517306288> >.

LEVENTIS, P. A.; GRINSTEIN, S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. **Annu Rev Biophys**, v. 39, p. 407-27, 2010. ISSN 1936-1238 (Electronic)

1936-122X (Linking).

LI, J.; WANG, X.; ZHANG, T.; WANG, C.; HUANG, Z.; LUO, X.; DENG, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 81-98, 2015/04/01/ 2015. ISSN 1818-0876. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087614000725> >.

LIU, D. C. **A Method of Producing Powdery Phospholipids Using Basified Concentrated Phospholipids**. ZL200410024223.8 2007.

LIU, D. C.; FENG, J. J.; AN, L. G.; ZHU, H. R.; HAN, L. Y. **A New Method of Producing Powdery Phospholipids Using Concentrated Phospholipids of Peanut, Soybean or Colza As Raw Materials**. ZL200310105345.5 2006b.

LIU, D. C.; YANG, Y. T.; AN, L. G. **A New Technique of Producing Powdery Phospholipids**. ZL200510042316.8 2006a.

M. CABEZAS, D.; DIEHL, B.; TOMÁS, M. **Emulsifying properties of hydrolysed and low HLB sunflower lecithin mixtures**. 2015.

MAJERUS, P. W.; KISSELEVA, M. V.; NORRIS, F. A. The role of phosphatases in inositol signaling reactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 10669 - 10672, 1999.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions - Principles, Practices, and Techniques**. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press, 2004. 632 ISBN 9781420039436.

MENDES, A. C. **Lecitina de Soja: processo de obtenção e refino**. 2000. (Monografia). Curso de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MENEGUELO, R. **Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10**. 2007. Dissertação (Mestrado). Interunidades em Bioengenharia, USP, São Carlos - SP.

MIGUEL JR, A. Síndrome do Anticorpo Antifosfolípíde (SAF) nos abortos de repetição. 2012. Disponível em: < <http://www.medicinageriatrica.com.br/2012/11/26/sindrome-antifosfolipidica-nos-abortos-de-repeticao/> >. Acesso em: 07/03/2017.

MILLER, D. L. Health benefits of lecithin and choline. **Cereal Foods World**, v. 47, n. 5, 2002.

MIRANDA, D. T. S. Z. **Suplementação da dieta de ratos diabéticos com lecitina de soja: efeitos sobre funções de células do sistema imunitário e sobre concentrações plasmáticas de lipídios**. 2005. 69 (Mestrado). Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

MOLBASE. CAS No.9013-34-7 Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-Cellulose). 2018. Disponível em: < <http://www.molbase.com/en/cas-9013-34-7.html> >. Acesso em: 12/08/2018.

MOLDOVEANU, S.; DAVID, V. **Modern sample preparation for chromatography**. Elsevier, 2015.

MORE, N. S.; GOGATE, P. R. Intensification of degumming of crude soybean oil using ultrasound in combination with oxidizing agents. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 128, p. 132-142, 2018/06/01/ 2018. ISSN 0255-2701. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255270118300485> >.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais, na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

NADA, A.-A. M. A.; HASSAN, M. L. Ion exchange properties of carboxylated bagasse. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 2, p. 1399-1404, 2006/10/15 2006. ISSN 0021-8995. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/app.24255> >. Acesso em: 2018/08/12.

NELSON, D. L. C., M.L. **Principles of biochemistry**. 6th. Lehninger, 2013.

NGUYEN TUYET, M. U.; VAN DE WALLE, D.; PETIT, C.; BEHEYDT, B.; DEPYPERE, F. L. A.; DEWETTINCK, K. Mapping the Chemical Variability of Vegetable Lecithins. **(2014) JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY**, 2014. ISSN 0003-021X. Disponível em: < <http://lib.ugent.be/catalog/pug01:4350587> >.

NZAI, J. M.; PROCTOR, A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 571-576, 1998/12/01/ 1998. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814698000430> >.

OLIVEIRA, C. G. **Proposta de modelagem transiente para clarificação de óleos vegetais**. 2001. 161 (Mestrado). Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

OSELLA, M. C.; RE, G.; BADINO, P.; BERGAMASCO, L.; MIOLO, A. Phosphatidylserine (PS) as a potential nutraceutical for canine brain aging: A review. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 3, n. 2, p. 41-51, 2008/03/01/ 2008. ISSN 1558-7878. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1558787807002195> >.

OSTERBERG, R. The Copper(II) complexity of O-Phosphorylethanolamine. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 14, p. 471 - 485, 1960.

OUTHOUSE, E. L. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochemical Journal**, v. 30, n. 2, p. 197-201, 1936.

OZTURK, B.; YAVUZCETIN, O.; SRIDHAR, S. A Novel Coupled Resonator Photonic Crystal Design in Lithium Niobate for Electrooptic Applications. **International Journal of Optics**, v. 2015, p. 6, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2015/426569> >.

PALACIOS, L. E.; WANG, T. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. **JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY**, v. 82, n. 8, p. 571-578, 2005/08/01 2005. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1111-4> >.

PATIL, V. V.; GALGE, R. V.; THORAT, B. N. Extraction and purification of phosphatidylcholine from soyabean lecithin. **Separation and Purification Technology**, v. 75, n. 2, p. 138-144, 2010/10/13/ 2010. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586610003163> >.

PENDARIES, C.; TRONCHÈRE, H.; PLANTAVID, M.; PAYRASTRE, B. Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. **FEBS Lett.**, v. 546, n. 1, p. 25 - 31, Jul - 3 2003.

PICHOT, R. W., R.L.; NORTON, I.T. Phospholipids at the interface: Current trends and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14 (6), p. pp. 11767 - 11794, 2013. Disponível em: < <http://doi.org/10.3390/ijms140611767> >.

PIRES, L. N.; BRANDÃO, G. C.; TEIXEIRA, L. S. G. Determination of phospholipids in soybean lecithin samples via the phosphorus monoxide molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 225, p. 162-166, 2017. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617300195> >.

PODOBED, O. V.; FEDOROVA, L. M.; IAKUSHEVA, I. V.; ABAKUMOVA, O. I. U.; TSVETKOVA, T. A.; KOVALEVA, G. G.; GAVRILCHAK, A. V.; SHEKHTER, A. B. **The effect of phosphatidylcholine on repair processes in liver cells in acute CCl4 damage.** . **Voprosy Meditsinskoj Khimii**, v. 14, 1995.

PRICE, N.; FEI, T.; CLARK, S.; WANG, T. Extraction of phospholipids from a dairy by-product (whey protein phospholipid concentrate) using ethanol. **Journal of Dairy Science**, 2018/08/16/ 2018. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218307537> >.

PUSHPAMALAR, V.; LANGFORD, S. J.; AHMAD, M.; LIM, Y. Y. Optimization of reaction conditions for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 312 - 318, 2006.

RACZ, I.; BORSA, J. Swelling of carboxymethylated cellulose fibres. **Cellulose**, v. 4, n. 4, p. 293-303, 1997/12/01 1997. ISSN 1572-882X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1023/A:1018400226052> >.

RISTIĆ-MEDIĆ, D.; TAKIĆ, M.; RADJEN, S. Chapter 11 - Soybeans, Flaxseeds, and Fish Oil in the Treatment of Renal Disease. In: HOLBAN, A. M. e GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Therapeutic Foods**: Academic Press, 2018. p.329-372. ISBN 978-0-12-811517-6.

ROUSSEAU, R. W.; FERRELL, J. K.; REARDON, R. F. Synthesis of diethylaminoethyl cellulose on cotton fabric. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**., v. 23, n. 2, p. 250 - 252, 1984.

RUSSETT, C. Lecithin applications in animal feeds. **Specialty Products Research Notes**, v. LEC-D-56, 1997.

SAKAKIMA, Y.; HAYAKAWA, A.; NAGASAKA, T.; NAKAO, A. Prevention of hepatocarcinogenesis with phosphatidylcholine and menaquinone-4: in vitro and in vivo experiments. **Journal of Hepatology**, v. 47, n. 1, 2007.

SCHOLFIELD, C. R. Composition of soybean lecithin. **JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY**, v. 58, n. 10, p. 889-892, 1981/10/01 1981. ISSN 0003-021X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/BF02659652> >. Acesso em: 2018/08/27.

SCHOLFIELD, C. R.; DUTTON, H. J. Sources of Color in Soybean Lecithin. **A.O.C.S**, v. 31, p. 257-261, 1954.

SHEARS, S. B. The versatility of inositol phosphates as cellular signals. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1436, p. 49 - 67, 1998.

SHI, Y. G. **Soybean Products Technology**. Beijing - China: China Light Industry Press, 2005. ISBN 7-5019-4807-0.

SIGMA-ALDRICH. Avicel® PH-101. 2018. Disponível em: < https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/11365?lang=pt®ion=BR&qclid=EA1a1QobChMI0vmG5Pvo3AIVa7XtCh09NQ7BEAAYASAAEgL9zPD_BwE >. Acesso em: 12/08/2018.

SINGH, R. P.; GANGADHARAPPA, H. V.; MRUTHUNJAYA, K. Phospholipids: Unique carriers for drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 166-179, 2017/06/01/ 2017. ISSN 1773-2247. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224717301119> >.

SUN, N.; CHEN, J.; WANG, D.; LIN, S. Advance in food-derived phospholipids: Sources, molecular species and structure as well as their biological activities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 199-211, 2018/10/01/ 2018. ISSN 0924-2244. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417302972> >.

SZUHAJ, B. F. **Lecithins: Sources, Manufacture and Uses**. American Oil Chemists' Society. Urbana, USA: AOCS Monograph 1989.

TAHIR, H.; SULTAN, M.; AKHTAR, N.; HAMEED, U.; ABID, T. Application of natural and modified sugar cane bagasse for the removal of dye from aqueous solution. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p. S115-S121, 2016/09/01/ 2016. ISSN 1319-6103. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610312001391> >.

VERARDO, V.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; MONTEALEGRE, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; CABONI, M. F.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; BENDINI, A. Optimization of a solid phase extraction method and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the determination of phospholipids in virgin olive oil. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 2083-2090, 2013/12/01/ 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913004705> >.

VERBSKY, J. W.; CHANG, S. C.; WILSON, M. P.; MOCHIZUKI, Y.; MAJERUS, P. W. The pathway for the production of inositol hexakisphosphate in human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 1911 - 1920, 2005.

VIEL, G.; BOSCOLO-BERTO, R.; CECCHETTO, G.; FAIS, P.; NALESSO, A.; FERRARA, S. D. Phosphatidylethanol in Blood as a Marker of Chronic Alcohol Use: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 14788 - 14812, 2012.

WANG, L.; WANG, A. Adsorption properties of congo red from aqueous solution onto n,o-carboxymethyl-chitosan. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1403 - 1408, 2008.

WELLNER, N.; DIEP, T. A.; JANFELT, C.; HANSEN, H. S. N-acylation of phosphatidylethanolamine and its biological functions in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 3, p. 652-662, 2013. ISSN 1388-1981. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198112001965> >.

XIE, M. Phospholipids. In: (Ed.). **Reference Module in Food Science**: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-08-100596-5.

YAŞAR, F.; TOĞRUL, H.; ARSLAN, N. Flow properties of cellulose and carboxymethyl cellulose from orange peel. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 197 - 199, 2007.

ZHOU, D.-Y.; RAKARIYATHAM, K. Phospholipids. In: (Ed.). **Reference Module in Food Science**: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-08-100596-5.

ZHU, D.; DAMODARAN, S. Composition, thermotropic properties, and oxidative stability of freeze-dried and spray-dried milk fat globule membrane isolated from cheese whey. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 16, p. 8931-8, Aug 24 2011. ISSN 1520-5118 (Electronic)

0021-8561 (Linking).

ZWAAL, R. F.; SCHROIT, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. **Blood**, v. 89, n. 4, p. 1121 - 1132, 1997.