



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA- UFBA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LAÍS DE NOVAES PIRES

**DETERMINAÇÃO INDIRETA DE FOSFOLÍPIDIOS EM LECITINA
DE SOJA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR
EM FORNO DE GRAFITE COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA
RESOLUÇÃO**

Salvador
2016

LAÍS DE NOVAES PIRES

**DETERMINAÇÃO INDIRETA DE FOSFOLIPÍDIOS EM LECITINA
DE SOJA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR
EM FORNO DE GRAFITE COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA
RESOLUÇÃO**

Dissertação submetida ao Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira

Salvador
2016

de Novaes Pires, Laís

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE FOSFOLIPÍDIOS EM LECITINA
DE SOJA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR EM
FORNO DE GRAFITE COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO /
Laís de Novaes Pires. -- Salvador, 2016.

61 f.

Orientador: Leonardo Sena Gomes Teixeira.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós- graduação em
química) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade
Federal da Bahia, 2016.

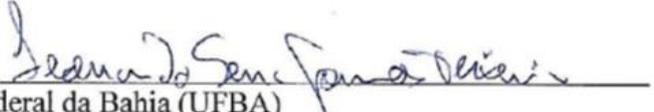
1. . I. Sena Gomes Teixeira, Leonardo. II. Título.

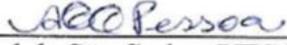
TERMO DE APROVAÇÃO

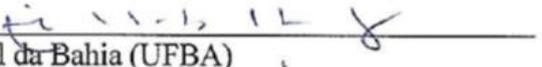
LAÍS DE NOVAES PIRES

“DETERMINAÇÃO INDIRETA DE FOSFOLÍPIDIOS EM LECITINA DE SOJA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR EM FORNO DE GRAFITE COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Amália Geiza Gama Pessoa 
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Junior 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 03 de outubro de 2016.

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo o apoio e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sido o meu refúgio em todas as dificuldades e iluminado o meu caminho a cada dia.

A toda minha família por ter acreditado em meu potencial e abraçado esse sonho junto comigo. Em especial meu pai Jocelito e minha mãe Vera Lúcia que foram meus maiores incentivadores e sempre apoiaram as minhas escolhas. Aos meus irmãos Luan e Marly. Obrigada por todo amor, compreensão e carinho.

Ao professor Leonardo por ter me acolhido e acreditado em meu potencial. Obrigada pela orientação, amizade, confiança e dedicação. Obrigada por partilhar de seus conhecimentos e contribuir de forma inestimável para a concretização deste trabalho.

Ao pesquisador Geovani Brandão, um verdadeiro “amigão” que surgiu em meu caminho e que esteve disposto a me ajudar em todos os momentos desse trabalho. Jou, obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pelas conversas jogada fora. Que você possa ser retribuído por tudo que fez por mim e que seus passos sejam abençoados sempre.

À pesquisadora Sarah Rocha, por não ter medido nenhum esforço em ajudar nas análises realizadas com ICP OES.

Aos colegas do grupo IDEIA pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Aos professores Marcos Bezerra e Valfredo Lemos que despertaram em mim o desejo em estudar química analítica.

À uma família muito especial que me apoiou quando muitas vezes me senti desamparada nessa cidade. Rosana e Naldo, foram os pais que ganhei em Salvador, serei sempre grata por todo apoio que me deram...

À três coleguinhas que estiveram ao meu lado nos momentos de altos e baixos...Shirlei, Andressa e Vaninha...obrigada por essa amizade!

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

Muito obrigada!

"Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é Dele a vitória alcançada em minha vida..."

Frederico Cruz

RESUMO

A lecitina de soja é um composto extraído do óleo de soja bruto pelo processo de degomagem. É um líquido viscoso de coloração marrom rico em fosfolipídios. Possui uma natureza anfifílica, o que a torna o emulsificante natural mais utilizado em indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos. Vários estudos têm sugerido a utilização terapêutica da lecitina, no aprimoramento da memória, na proteção do fígado e redução do colesterol. Devido à sua larga aplicação, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos que permitam monitorar a qualidade da lecitina comercializada. O objetivo deste trabalho foi realizar a determinação indireta de fosfolipídios em amostras de lecitina de soja através da determinação de fósforo por espectrometria de absorção molecular em forno de grafite com fonte contínua de alta resolução (HR-CS GF MAS) via absorção molecular do monóxido de fósforo (PO). Para injeção das amostras no equipamento, as mesmas foram diluídas em metilisobutilcetona (MIBK). Foram estudadas as condições térmicas para a medida do fósforo via PO para diferentes linhas de transição: 213,561; 246,400 e 324,620 nm. As melhores condições foram estabelecidas em 213,561 nm: temperatura de pirólise de 1300 °C, temperatura de volatilização de 2300 °C e Mg como modificador químico. Para aumentar a sensibilidade analítica, a medida do sinal de absorvância foi obtida pela soma de quatro linhas de transição molecular de PO vizinhas à 213 nm: 213,5610; 213,5259; 213,6172 e 213,6374 nm. Comparação entre curvas de calibração obtidas a partir de soluções aquosas de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e com soluções das amostras preparadas em MIBK mostraram que não houve efeito de matriz, sendo possível a calibração externa com padrões aquosos. Os limites de detecção e quantificação foram de 2,35 e 7,83 mg g^{-1} , respectivamente. O coeficiente de correlação (R) foi de 0,9976 para uma faixa linear de trabalho entre 0 e 200 mg L^{-1} . A precisão avaliada como desvio padrão relativo (RSD) foi de 2,47 % ($n = 10$) para uma amostra de lecitina de soja contendo 2,2% (m/v) de fósforo. O método desenvolvido foi aplicado para a análise de amostras de lecitina de soja comerciais. Para validação do método, as amostras também foram analisadas após digestão por via úmida em bloco digestor, seguida da determinação de fósforo por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A concentração de fosfolipídios nas amostras variou entre 38,1 e 45% (m/v) para o método proposto e entre 37 e 49,5% (m/v) para o método comparativo. O teste t-pareado comprovou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos (95% de nível de confiança).

Palavras Chave: lecitina de soja, fosfolipídios, monóxido de fósforo, espectrometria de absorção molecular em forno de grafite com fonte contínua de alta resolução.

ABSTRACT

Soy lecithin is a compound extracted from the crude soybean oil by the degumming process. It is a brown viscous liquid rich in phospholipids. It has an amphiphilic nature, which makes it the natural emulsifier most widely used in pharmaceutical, cosmetic and food industries. Various studies have suggested the therapeutic use of lecithin, improvement of memory, liver protection and cholesterol reduction. Due to its wide application becomes necessary methods for the monitoring of marketed lecithin quality. This paper presents a method for indirect determination of the phospholipids in soy lecithin samples through phosphorus determination by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR-CS GF MAS) via absorption of phosphorus monoxide (PO). For injection of samples in equipment, they were diluted in methyl isobutyl ketone (MIBK). Thermal conditions were studied to phosphorus measured via PO at different transition lines: 213.561; 246.400 and 324.620 nm. The best conditions were established in 213.561 nm: pyrolysis temperature of 1300 °C, volatilization temperature of 2300 °C and Mg as chemical modifier. To increase the analytical sensitivity, the measurement of the absorbance signal was obtained by the sum of four lines of molecular transition PO surrounding the of 213 nm: 213.5610; 213.5259; 213.6172 and 213.6374 nm. Comparison of calibration curves of the aqueous solutions of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and solutions of the samples prepared in MIBK no showed matrix effect, and it was possible external calibration with aqueous standards. The limits of detection and quantification were found to be 2.35 and 7.83 mg g^{-1} , respectively. The correlation coefficient (R) was 0.9976 for a linear response range between of 0 and 200 mg L^{-1} . The precision evaluated as relative standard deviation (RSD) was 2.47% ($n = 10$) for a sample of soy lecithin containing 2.2% (w/v) of phosphorus. The developed method was applied to analysis of the samples of soy lecithin commercial. To validation the method, samples were also analyzed after wet digestion in digester block, followed by of phosphorus determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The concentration of phospholipids in the samples varied between 38.1 and 45% (w/v) to the proposed method and between 37 and 49.5% (w/v) for comparative method. The paired t-test proved that there is no significant difference between the results obtained by the two methods (95% confidence level).

Keywords: soy lecithin, phospholipids, phosphorus monoxide, high-resolution continuum-source graphite furnace molecular absorption spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama do processo de degomagem do óleo de soja e obtenção da lecitina bruta.	18
Figura 2- Estrutura química molecular dos principais fosfolipídios presentes na lecitina de soja.	20
Figura 3- Diluição da lecitina de soja em diferentes solventes orgânicos.	39
Figura 4 - Perfil dos picos de absorção molecular de PO em 213,561 nm para uma amostra de lecitina de soja diluída em diferentes solventes orgânicos.	40
Figura 5 - Curvas de pirólise e vaporização para determinação de P em lecitina de soja via PO na ausência (●) e na presença dos modificadores Ca (■) e Mg (▲) nas linhas de absorção molecular 213,561; 246, 400; e 324,620 nm (n= 2).	42
Figura 6- Perfil dos picos de absorção de PO nas curvas de pirólise e vaporização em diferentes linhas moleculares de PO na presença de Mg, Ca e na ausência do modificador.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição (%) típica da lecitina de soja.....	19
Tabela 2- Programa de aquecimento para a determinação de PO em lecitina de soja por HR-CS GF MAS usando magnésio como modificador.	35
Tabela 3- Condições operacionais para determinação de P por ICP OES em amostras de lecitina de soja.	36
Tabela 4 - Temperaturas de pirólise e vaporização (°C) estabelecidas em cada linha de absorção de PO avaliada na presença e ausência de modificadores químicos.	44
Tabela 5- Comparação das curvas de calibração obtidas empregando adição do analito e padrões externos (n= 3).	47
Tabela 6- Características analíticas do método.	48
Tabela 7- Limites de detecção para determinação de P via PO usando o espectrômetro com fonte contínua de alta resolução com chama e forno de grafite.....	49
Tabela 8- Resultados da determinação de fósforo e fosfolipídios (%) em lecitina de soja.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (<i>Atomic absorption spectrometry</i>)
AOCS	Associação Americana de Química e Óleos (<i>American Oil Chemists' Society</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>Adenosine triphosphate</i>)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge-coupled device</i>)
EASI-MS	Espectrometria de massas ambiente com ionização por spray sonico (<i>Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry</i>)
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (<i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i>)
FT-NIR	Espectroscopia na região de infravermelho próximo com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Near Infrared</i>)
GTP	Trifosfato de guanina (<i>Guanine triphosphate</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HR-CS GF MAS	Espectrometria de absorção molecular em forno de grafite com fonte contínua de alta resolução (<i>High-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry</i>)
I.C.	Intervalo de confiança
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ITP	Trifosfato de inositol (<i>Inositol triphosphate</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação

LS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e fonte de linha
MAS	Espectrometria de absorção molecular (<i>Molecular absorption spectrometry</i>)
MIBK	Metilisobutilcetona (<i>Methyl isobutyl ketone</i>)
PA	Ácido fosfatídico (<i>Phosphatidic acid</i>)
PC	Fosfatidilcolina (<i>Phosphatidylcholine</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PET	Politereftalato de etileno
PI	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
PP	Polipropileno
PS	Fosfatidilserina (<i>Phosphatidylserine</i>)
RMN ³¹ P	Ressonância magnética nuclear de fósforo 31
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative standard deviation</i>)
SS- GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com análise direta de sólidos (<i>Solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
TLC	Cromatografia em camada fina (<i>Thin-layer chromatography</i>)
UV/vis	Ultravioleta visível
XRF	Fluorescência de raio- X (<i>X-ray fluorescence</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 LECITINA DE SOJA	17
2.2 O FÓSFORO E SUA IMPORTÂNCIA.....	21
2.3 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO POR TÉCNICAS ANALÍTICAS	22
2.3.1 O uso de modificador químico nas determinações de fósforo por ET AAS	25
2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO (HR-CS AAS)	28
2.4.1 Espectrometria de absorção molecular com fonte contínua de alta resolução (HR-CS MAS)	30
2.4.2 Monitoramento simultâneo de linhas do mesmo analito em HR-CS GF MAS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 EQUIPAMENTOS	35
3.2 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS	36
3.3 PROCEDIMENTOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS EM AMOSTRAS DE LECITINA DE SOJA.....	37
3.3.1 Estudo do preparo da amostra	37
3.3.2 Estudo do comportamento térmico	37
3.3.3 Estudo do efeito de matriz	37
3.3.4 Preparo das amostras para medidas por HR-CS GF MAS	37
3.3.5 Método comparativo	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 ESTUDO DO PREPARO DA AMOSTRA	39
4.2 ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO.....	41
4.3 ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ	46

4.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	48
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	50
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A lecitina é uma substância natural encontrada nos tecidos animais e em óleos vegetais. Sendo composta por colina, ácidos graxos, glicerol, glicolipídios, trigliceróis e, principalmente, por fosfolipídios como a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI), com quantidades menores de ácido fosfatídico (PA) e fosfatidilserina (PS) [1].

Dentre todos os óleos vegetais, o óleo de soja é aquele que possui uma maior quantidade de lecitina, que é separada do óleo bruto pelo processo de degomagem. A lecitina bruta é um líquido viscoso com coloração que varia do marrom a amarelo-claro, a depender da origem da matéria-prima e das condições do processo de separação. Contém cerca de 60-75% de fosfolipídios, 30-40% de óleo neutro e aproximadamente 0,5-2% de umidade. Lecitinas bem purificadas possuem um aroma tipicamente neutro e pouco sabor [2, 3].

Os fosfolipídios presentes na lecitina são componentes fundamentais das membranas celulares e, por conseguinte, essenciais para o crescimento, maturação e função adequada das células. Fosfatidilcolina é o fosfolipídio presente em maior quantidade na lecitina. Este contribui na formação da camada bilipídica da membrana de cada célula do corpo, além de ser precursor da síntese de colina dentro do organismo, um nutriente essencial para o transporte de gorduras para dentro e fora das células e também um precursor para síntese de acetilcolina – um importante neurotransmissor necessário para a memória e outras funções cerebrais [4].

Devido à natureza anfifílica, à fácil obtenção e excelente funcionalidade, os fosfolipídios possuem larga aplicação como emulsificante em alimentos, produtos farmacêuticos, e indústrias de cosméticos, dentre outros. Eles também têm ganhado atenção especial devido a alguns benefícios à saúde, ainda intrínsecos. Vários estudos têm sugerido a utilização terapêutica desses fosfolipídios, na forma de lecitina, no aprimoramento da memória, na proteção do fígado e redução do colesterol [5, 6].

Devido à sua complexa composição, a maioria dos trabalhos descritos na literatura para análise de lecitina, bem como o fracionamento de seus fosfolipídios, envolve procedimentos de alto custo e laboriosos [7]. É possível encontrar trabalhos

reportados para determinação de fosfolipídios em lecitina de soja por diferentes técnicas analíticas, como espectroscopia na região de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) [8], espectrometria de massas ambiente com ionização por spray sônico (EASI-MS) [7], cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [9], ressonância magnética nuclear de fósforo 31 (RMN ^{31}P) [9], espectrofotometria na região do UV-vis [10] e a colorimetria [11].

Uma estratégia pouco explorada para a análise da lecitina de soja consiste na determinação indireta de fosfolipídios através da determinação de fósforo. A determinação de fósforo foi considerada por muito tempo como um desafio para a maioria das técnicas espectrométricas atômicas, pois este elemento apresenta absorção em linhas de ressonância situadas na região UV-vácuo, que não está disponível nos equipamentos de absorção atômica convencionais. A determinação era realizada em linhas não-ressonantes, o que acarretava em problemas relacionados à sensibilidade. Muitos desses problemas foram contornados após a disponibilidade do espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (HR-CS AAS). Esse equipamento, além de oferecer vantagens nas determinações por absorção atômica, permite a determinação de moléculas diatômicas como PO, CS e NO. Tais moléculas devem ser estáveis em altas temperaturas e possuem uma estrutura rotacional fina que podem ser comparadas às linhas atômicas e reconhecidas pelo espectrômetro de alta resolução [12].

A espectrometria de absorção molecular com fonte contínua de alta resolução (HR-CS MAS) foi empregada anteriormente, por exemplo, na determinação de fósforo via molécula de PO em farinha de trigo [13], materiais biológicos [14] e plantas [15]. Entretanto, deve-se ressaltar que não foi encontrado na literatura nenhuma proposta de determinação indireta de fosfolipídios em amostras de lecitina de soja via molécula de PO por espectrometria de absorção molecular em forno de grafite com fonte contínua de alta resolução (HR-CS GF MAS).

Dessa forma, neste trabalho um método analítico foi proposto para determinação indireta de fosfolipídios em lecitina de soja por HR-CS GF MAS via absorção de PO. Para viabilização da introdução das amostras no espectrômetro diferentes solventes orgânicos foram testados como diluentes. Além disso, foram estudadas as condições térmicas para a medida do fósforo via PO, para diferentes linhas de transição na presença e ausência de modificadores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

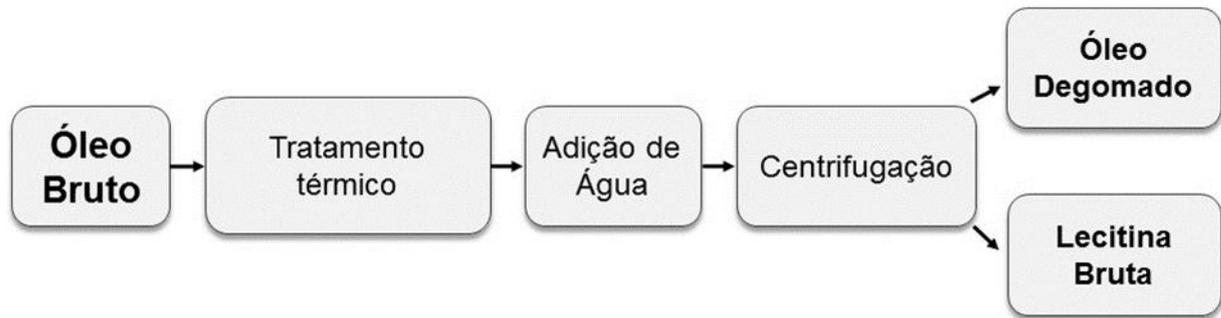
2.1 LECITINA DE SOJA

Em 1850 Maurice Goble de France isolou uma substância da gema de ovo que permitia a mistura entre água e óleo. Essa substância foi nomeada como Lecitina. Os primeiros usos para este emulsificante natural foram para produção de margarina, chocolate, tintas e cosméticos até que, na segunda metade do século XX, começou-se a explorar suas propriedades nutricionais e medicinais. Nos anos seguintes, descobriu-se que esse mesmo produto poderia ser obtido através do óleo de soja com as vantagens de ser mais puro, mais nutritivo e mais barato que aquele isolado da gema de ovo. Durante os anos de 1940, a lecitina de soja conquistou a indústria de alimentos, com o plantio e a moagem de soja acelerados nos Estados Unidos [16, 17].

O óleo de soja bruto extraído é composto por uma mistura de triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfatídeos, compostos oxigenados, pigmentos, quinonas, dicetonas, entre outros, e por isso deve passar por um processo de refinação. O primeiro passo desse processo é a degomagem, pelo qual ocorre a remoção dos fosfolipídios e de gomas mucilaginosas que afetam a qualidade e conservação do óleo. A presença de fosfolipídios em óleo cru pode causar deterioração da qualidade através da formação de gomas, que podem se formar durante o transporte e armazenamento. Essas gomas se hidratam e precipitam, arrastando o óleo e formando borras que causam hidrólise e rancificação, ao aumentar a acidez, gerando sabores e odores desagradáveis, além de causar entupimento de tubulações e válvulas nas indústrias. Portanto, a remoção da maior parte desses fosfolipídios torna-se essencial na qualidade do óleo produzido [7, 18].

O processo de degomagem consiste em um tratamento do óleo bruto com a adição de 1 a 3% de água sob agitação lenta durante 30-60 min e aquecimento a uma temperatura de 70-80°C conforme representado na Figura 1.

Figura 1- Diagrama do processo de degomagem do óleo de soja e obtenção da lecitina bruta.



Fonte: adaptado de [7].

Durante esse processo, os fosfolipídios hidratados passam a ser pouco solúveis em óleo, formando um precipitado que é então separado por centrifugação, onde cerca de 90% dos fosfolipídios são removidos do óleo bruto. O precipitado, contendo cerca de 50% de umidade é secado sob vácuo à temperatura de 70-80°C. Após a secagem obtém-se então a lecitina de soja comercial [7, 19, 20, 21].

Originalmente, o termo químico lecitina referia-se à fosfatidilcolina, entretanto, esse termo tem sido comumente utilizado para denominar misturas comerciais de diferentes fosfolipídios [7]. A palavra lecitina é derivada do termo grego “*lekitos*”, que significa “gema de ovo”. Quimicamente, trata-se de um composto orgânico rico em fósforo, formado por estruturas lipídicas polares (fosfolipídios) e lipídios apolares (ácido graxos) [3, 20]. Os fosfolipídios são encontrados em todas as células vivas, seja de origem animal ou vegetal. Nos animais estão concentrados nos órgãos vitais como cérebro, fígado e rim. Nos vegetais altas concentrações são encontradas em sementes e grãos. São constituintes da membrana celular e participantes ativos no processo de metabolismo das células, sendo essenciais para a vida [22].

Em grau comercial, a lecitina de soja geralmente contém cerca de 2,2% de fósforo, que corresponde a uma mistura complexa com cerca de 62-75% de fosfolipídios [18, 23]. A característica hidrofílica/hidrofóbica presente nas estruturas da lecitina comercial a distingue como emulsificante natural com maior número de aplicações nas indústrias alimentícias, sendo utilizada como emulsificador lipofílico em diversos produtos como margarinas, chocolates, biscoitos, caramelos e rações. É também bastante utilizada nas indústrias de tintas e cosméticos. A lecitina é considerada um surfactante não tóxico bem recebido pelo organismo, uma vez que faz parte integral das membranas celulares e pode ser completamente metabolizada [18, 23, 24]. A lecitina de soja como emulsificante, tem por função básica fazer o

revestimento físico das partículas, principalmente daquelas que contém gorduras em sua composição, de tal forma que, quando em meio aquoso, promova uma redução da tensão superficial entre as fases sólida e líquida. A diminuição da tensão superficial entre as fases faz com estas se misturem [25, 26]. Na Tabela 1 está descrita a composição típica da lecitina de soja.

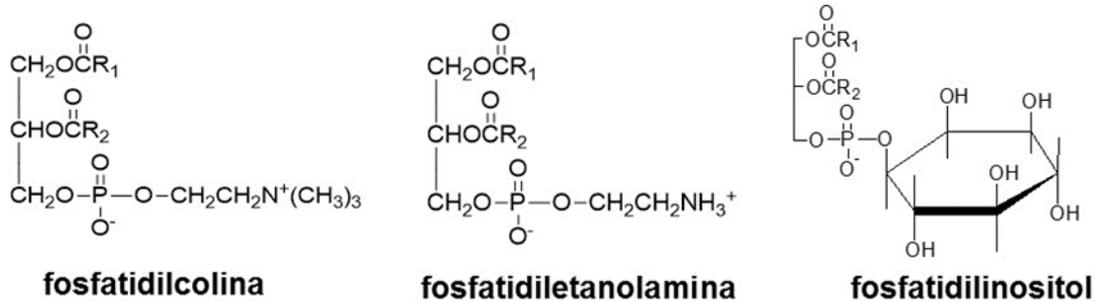
Tabela 1- Composição (%) típica da lecitina de soja [3].

Lipídios polares	Quantidade (%)
Fosfatidilcolina	20-22
Fosfatidiletanolamina	21-23
Fosfatidilinositol	18-20
Ácido fosfatídico	4-8
Esfingomielina	-
Glicolipídios	9-12
Outros fosfolipídios	15

Como pode ser observado na Tabela 1, os principais fosfolipídios usualmente encontrados na lecitina bruta são fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA), acompanhados por glicolipídios e outros fosfolipídios em menor proporção. A proporção dos fosfolipídios varia de acordo com a fonte e com os métodos de extração [3, 27, 28, 29].

Na Figura 2, é mostrada a estrutura química molecular dos três principais fosfolipídios presentes na lecitina de soja.

Figura 2- Estrutura química molecular dos principais fosfolipídios presentes na lecitina de soja.



Fonte: Adaptado de [22].

A natureza anfifílica da lecitina pode ser facilmente observada através da estrutura química da fosfatidilcolina, seu principal constituinte. O grupo fosfatidil é o componente hidrofílico e tem tendência a se associar com água, enquanto os dois ácidos graxos esterificados são componentes lipofílicos e se orientam para a fase lipídica. A fosfatidilcolina é responsável pela estabilidade da emulsão do tipo água/óleo, enquanto que fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol estabilizam a emulsão do tipo óleo/água [26, 30]. A molécula da fosfatidilcolina possui em sua fórmula molecular uma extremidade polar formada por um grupo colina, um grupo fosfato ligado à porção hidrofóbica e duas longas cadeias acíclicas de 16 a 22 carbonos, por ligações ésteres com o glicerol. Essas cadeias podem conter uma ou mais insaturações, devido à estrutura polar-apolar (anfifílica). As moléculas de fosfatidilcolina tendem a se auto organizar em bicamadas com importantes funções biológicas [18].

De todos os fosfolipídios presentes na lecitina, fosfatidilcolina é singularmente o mais importante. A colina é importante para a função hepática, presente na síntese dos componentes estruturais de todas as membranas celulares, na sinalização molecular, atua como fator de ativação plaquetária, além de ser precursora de um importante neurotransmissor, a acetilcolina, envolvida no controle muscular, cardiovascular, ocular, gastrointestinal, e numa série de outras funções [31].

A fosfatidilcolina está envolvida em diversas de reações metabólicas essenciais à vida. Algumas delas incluem: proporcionar estabilidade estrutural às membranas celulares; fornecer uma reserva de colina para o organismo e atuar como um segundo mensageiro. A fosfatidilcolina também pode interferir no metabolismo do

colesterol e outros lipídios, pois exerce um importante papel na absorção intestinal de lipídios por elevar a solubilidade das micelas lipídicas e fornecer revestimento da superfície para a formação de quilomicrons (lipoproteína transportadora de colesterol e triglicerídeos do intestino delgado para os tecidos), além de alterar a composição dos depósitos de gordura, removendo colesterol dos tecidos [32, 33].

Em especial, o sistema nervoso central, possui um elevado teor de fosfolipídios que são produzidos no fígado. Estudos demonstram que a ingestão de colina, sob a forma de lecitina, melhora o raciocínio lógico e reduz a perda de memória causada pelo envelhecimento [34]. Os fosfolipídios também estão presentes nas mitocôndrias das células, que são reguladoras do metabolismo celular e produzem energia para o corpo; na manutenção e no bom funcionamento do sistema nervoso; na proteção do fígado, e diminuem o excesso de colesterol no sangue [16, 22]. Sem fontes alimentares de lecitina, o fígado é incapaz de produzir uma quantidade suficiente para atender as necessidades do corpo. A suplementação com grânulos ou cápsulas de lecitina é, muitas vezes, a alternativa mais indicada para garantir uma quantidade adequada de fósforo e fosfolipídios no organismo [16].

2.2 O FÓSFORO E SUA IMPORTÂNCIA

O fósforo é um elemento-chave em todas as formas de vida. No organismo, está presente quase exclusivamente sob a forma de fosfato e fosfolipídios. O fosfato é considerado um importante tampão intracelular por desempenhar um papel fundamental no metabolismo das células. Está ligado à função de tamponamento dos íons hidrogênio na urina, é responsável pelo funcionamento dos leucócitos e possui um papel como um componente estrutural de fosfolipídios, nucleoproteínas, e ácidos nucleicos [14].

Devido a sua reatividade é encontrado na natureza exclusivamente na forma de fosfatos estáveis. Ocorre também como apatitas, rochas fosfáticas, e fosforitas marinhas. Sua estrutura eletrônica permite que forme complexos com compostos orgânicos e que se combine com outros elementos na forma de ácidos, sais e óxidos. O fósforo na forma de íons fosfato, é essencial para o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, funcionando como cofator em vários sistemas enzimáticos. Além disso, ele participa da composição de substâncias com alto potencial metabólico como, o trifosfato de adenosina (ATP), o trifosfato de guanina

(GTP), o trifosfato de inositol (ITP) e outros nucleotídeos. O fósforo constitui aproximadamente 1% da massa corpórea do ser humano, dessa quantidade cerca de 85% encontra-se nos dentes e ossos na forma de hidroxiapatita, a uma razão de 1:2 em massa com o cálcio. O restante está presente nos músculos, fígado, intestino, tecido nervoso, principalmente na forma de ésteres orgânicos (íons fosfato) e fosfolipídios [35].

A recomendação de ingestão diária de fósforo é de 700 mg para um indivíduo em fase adulta [36]. Sua ingestão é fundamental para o metabolismo dos seres humanos e animais. A sua falta no organismo pode acarretar sérios problemas à saúde, principalmente relacionados aos ossos e ao sistema nervoso. Do mesmo modo, o excesso pode levar às doenças como diarreia e calcificação de órgãos e tecidos [14].

O fósforo também é essencial para as plantas, e o nível de fósforo é muitas vezes um fator limitativo para retardar a taxa de crescimento de muitos organismos em um determinado ambiente. Um excesso de fósforo pode ser problemático, especialmente em sistemas aquáticos, resultando na abundância de algas, baixos níveis de oxigênio dissolvido, e a morte de certos peixes, invertebrados, e outros animais aquáticos [12,14].

Sua grande importância também apresenta destaque na indústria química, estando presente em produtos finais e intermediários, como componente essencial ou como resíduo indesejado gerado pelo processo de fabricação de reagentes químicos [12].

Dada a importância deste elemento, e considerando sua ampla aplicação em muitos campos (por exemplo, fertilizantes, pesticidas, ligas metálicas, produtos alimentares, etc.), o desenvolvimento de métodos rápidos e simples para a sua determinação em diversos tipos de amostras é de grande interesse.

2.3 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO POR TÉCNICAS ANALÍTICAS

O fósforo é um elemento dificilmente determinado com precisão pela maioria das técnicas analíticas. O maior problema para determinação do fósforo empregando técnicas espectrométricas atômicas está no fato das linhas de ressonância desse elemento estarem situadas entre 167,16 nm e 178,77 nm, região do ultravioleta no vácuo que não está disponível nos equipamentos de absorção

atômica convencionais. Nessa região, há intensas bandas de absorção de moléculas de água e oxigênio, sendo necessário equipamentos em que o monocromador seja mantido a vácuo ou preenchido com um gás inerte [37, 38, 39].

L'vov e Khartsyvov foram os primeiros pesquisadores a proporem o uso do dublete não-ressonante em 213,5 e 213,6 nm, como linhas alternativas para a determinação de fósforo por espectrometria de absorção atômica (AAS). Neste caso, a determinação de fósforo torna-se fortemente dependente da temperatura, pois o analito, além de ser atomizado, deve ser excitado. Como estes níveis excitados estão a cerca de 1,4 eV acima do estado fundamental ($^4S_{3/2}$), pode-se esperar uma população atômica razoável em temperaturas acima de 2650°C. Ainda assim, neste dublete, a sensibilidade é cerca de 100 vezes menor do que nas linhas de ressonância [37, 39].

A determinação de fósforo por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) tem sido tradicionalmente dificultada por algumas razões como: a impossibilidade prática de utilização de linhas de ressonância de fósforo; o seu comportamento químico complexo que resulta na formação de compostos voláteis e uma tendência para interagir com grafite; e, a sobreposição observada entre as linhas de fósforo moleculares e atômicas, o que torna muito difícil a obtenção de resultados confiáveis quando se utiliza linha de origem atômica [14].

Persson e Frech foram os primeiros a investigar os fatores que influenciam na determinação do fósforo por ET AAS, e descobriram que existem dois principais problemas associados com a determinação desse elemento. O primeiro está relacionado com o risco de perdas do analito por volatilização na forma de sub-óxidos e/ ou dímeros moleculares (P_2 , PO). O segundo deve-se ao fato do fósforo não precisar apenas ser atomizado, mas também excitado para sua determinação no dublete não ressonante 213,5-213,6 nm. Eles concluíram que, sem a formação de uma fase de alta estabilidade térmica formada pela adição do modificador, a determinação não teria viabilidade prática devido às grandes perdas de fósforo que ocorrem antes da etapa de atomização [37, 40].

Para que o fósforo seja excitado, é necessária uma energia adicional, pois uma temperatura eficaz no forno de grafite desempenha um papel decisivo na determinação. Na prática, isto significa que o analito deve ser retido na fase condensada o maior tempo possível, de modo que a temperatura máxima atingida

seja obtida no momento da volatilização. Isto irá assegurar um maior efeito de dissociação nos átomos e a maior quantidade possível de átomos no estado excitado [37, 41]. Além disso, deve ressaltar que a natureza da superfície de grafite (tanto na plataforma como na parede do tubo) influencia na estabilidade térmica do fósforo e, portanto, na sensibilidade das medidas [42].

Curtius *et al.* [40] investigaram a atomização do fósforo quando utilizaram forno de grafite pirolítico e eletrolítico e concluíram que, o grafite eletrolítico oferece um número maior de sítio ativos de carbono e, portanto, oferece condições mais favoráveis para determinação de fósforo do que os tubos revestidos de carbono pirolítico. Esse número de sítios ativos pode ainda ser aumentado quando o oxigênio é adicionado ao gás de purga argônio durante as fases térmicas de pré-tratamento.

Uma grande variedade de técnicas instrumentais tem sido utilizadas para a determinação de elementos não metálicos como o fósforo, incluindo os métodos gravimétricos e volumétricos, cromatografia iônica e várias técnicas espectrométricas, tais como a espectrometria de fluorescência de raios X (XRF), a espectrometria de absorção atômica (AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e técnicas mais sofisticadas acopladas com uma fonte contínua de alta resolução (HR-CS) [12].

Deve-se destacar que o fósforo é um elemento que ainda é intensivamente determinado por espectrofotometria UV-vis através do método do azul de molibdênio, onde o fósforo é convertido em íon ortofosfato, que reage com o íon molibdato em meio ácido para formar um heteropoli-ácido amarelo, e então é reduzido para o azul de molibdênio, que apresenta uma forte absorção na região do visível, cuja absorvância é obtida em 650 nm. A vantagem desse método é seu custo relativamente baixo por não requerer instrumentação sofisticada. Entretanto, exige a necessidade do preparo de amostras de forma extensiva, além da presença de interferentes devido a vários outros íons que também formam complexos com o íon molibdato e uma sensibilidade relativamente baixa, com elevados limites de detecção na faixa de mg L^{-1} [12, 43].

A determinação de fósforo por ICP OES sofre influência na sensibilidade porque a ionização do elemento pode ser incompleta nas determinações em linhas não-ressonantes, levando à formação de um plasma relativamente pobre em átomos excitados, o que acarreta em maiores limites de detecção [44]. No entanto, diversos

trabalhos acerca da determinação de P por ICP OES utilizando essas linhas, foram descritos com limites de detecção adequados à determinação. Santos *et al.* [45] realizaram a determinação de fósforo por ICP OES em 213,618 nm em amostras biodiesel, com um LD de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Em um trabalho similar realizado por Drglin [46], para a determinação de P em aço, um LD de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ foi obtido.

Apesar dos problemas também relacionados à sensibilidade, vários trabalhos têm sido relatados na literatura envolvendo a determinação de fósforo por ET AAS. Lyra *et al.* [42] realizaram a determinação direta de P por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite GF AAS com correção de fundo baseada no efeito Zeeman em amostras de biodiesel utilizando a linha de absorção em 213,618 nm. O LD obtido foi de 7,2 ng de P, relativo a uma concentração nas amostras de $1,2 \mu\text{g g}^{-1}$, e a massa característica foi de 9,1 ng de P. Resano *et al.* [47] determinaram fósforo em dois tipos de plásticos, politereftalato de etileno (PET) e polipropileno (PP) por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com análise direta de sólidos (SS- GF AAS), usando a mistura paládio e ácido ascórbico como modificador químico. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, à medida que uma precisão relativa de 7,8% foi obtida para as amostras de PET com um teor de fósforo em cerca de $45 \mu\text{g g}^{-1}$ e 6,7% para as amostras de PP contendo cerca de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ de P.

No entanto, na maioria dos trabalhos descritos para envolvendo as determinações de fósforo por ET AAS, os autores têm destacado a importância do modificador químico adequado buscando contornar as dificuldades apresentadas pela técnica.

2.3.1 O uso de modificador químico nas determinações de fósforo por ET AAS

O estudo de modificadores químicos visando obter maior sensibilidade e assegurar a formação estável da espécie é de grande importância nas determinações de fósforo. A estabilização do elemento através da adição de modificadores evita perdas do analito durante as etapas que antecedem a atomização. No entanto, ainda assim, grandes quantidades de fósforo são perdidas nessas etapas. Entre os modificadores químicos frequentemente utilizados para o fósforo destacam-se o lantânio, o nitrato de magnésio, fluoreto de sódio e a mistura de paládio com cálcio [37, 48].

Os estudos feitos por L'vov e Khartsyzov acerca da determinação de fósforo usando linhas de ressonância demonstraram que, nas temperaturas atingidas para a atomização em forno de grafite, a maior parte dos átomos continuam no estado fundamental e o sinal analítico gerado deriva-se de apenas uma pequena parte dos átomos de P. Além disso, o fósforo é conhecido por formar compostos gasosos de alta estabilidade térmica bem como compostos voláteis, o que justifica a necessidade do uso de um modificador químico [47].

Ediger *et al.* [41] foram os primeiros a investigar a determinação do P em um forno de grafite comercial e descobriram que a maioria dos compostos de fósforo, exceto fosfato de cálcio, não emitiram nenhum sinal de absorção atômica sem a adição de um modificador químico e propuseram o uso de lantânio como modificador para o fósforo. Uma das poucas exceções, foi relatada por Prévôt e Gente-Jauniaux, que determinaram fósforo em óleos vegetais, onde a matriz aparentemente, estabilizou o fósforo suficientemente, de maneira que a adição de lantânio não foi necessária [39].

Lepri e colaboradores [39] demonstraram que a maioria das linhas atômicas que estão acessíveis para o fósforo sofre forte sobreposição de linhas moleculares correspondentes à absorção de PO. A depender do modificador químico utilizado para as determinações por vaporização eletrotérmica, nenhum fósforo atômico é formado e o sinal analítico é proveniente da molécula diatômica PO, que forma-se quase exclusivamente no início da etapa de atomização. Quando o fósforo é medido por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com fonte de linha (LS GF AAS) no dublete não-ressonante 213,5/213,6 nm e sem a adição de um modificador, a absorção de P aumenta consideravelmente em temperaturas de atomização acima de 2400°C, e atinge cerca de 50% em 2700 °C. Os autores também investigaram a determinação do fósforo por HR-CS GF AAS utilizando o mesmo dublete não-ressonante, na ausência e na presença de modificadores químicos selecionados. Paládio puro ou com a adição de cálcio ou de ácido ascórbico foi o único modificador que ajudou a atomizar quase exclusivamente fósforo atômico.

Em um trabalho similar, Lepri *et al.* [48] avaliaram a determinação de fósforo na presença e na ausência de diferentes modificadores químicos por LS GF AAS com um sistema de correção do sinal de fundo baseado no efeito Zeeman, investigando a capacidade dessa correção ao lidar com a absorção molecular gerada pela molécula

de PO. Sugeriram que lantânio e fluoreto de sódio produzem uma mistura de moléculas de PO e fósforo atômico, em uma proporção fortemente dependente da temperatura de atomização e que apenas o paládio puro ou misturado ao cálcio é capaz de produzir quase exclusivamente fósforo atômico.

A formação da molécula de PO durante a atomização do fósforo em um forno de grafite foi confirmada por Sturgeon e Willie [49], usando a espectrometria de emissão com o plasma acoplado indutivamente conectado a um vaporizador eletrotérmico. O espectro de absorção molecular é parte da transição eletrônica $X^2\Pi \rightarrow D^2\Pi$ da molécula de PO que exibe uma estrutura fina de rotação pronunciada.

Curtius *et al.* [50] estudaram o uso de diferentes modificadores na determinação de fósforo por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Foi feita uma investigação do comportamento de cada modificador diante das temperaturas de pirólise, da melhor massa de fósforo a ser aplicada e sua relação com a vida útil do tubo de grafite e com a reprodutibilidade dos valores de absorvância integrada. O estudo também concluiu que paládio sozinho ou com a adição de cálcio foi o melhor modificador a ser utilizado na determinação de fósforo por atomização eletrotérmica. Observaram que o modificador lantânio teve comportamento semelhante aos citados, mas este além de provocar um efeito de memória pronunciado, ataca o grafite do forno quando utilizado em alta concentração.

Os mesmos autores realizaram a determinação de fósforo sem o uso de modificador químico e concluíram que, a superfície de grafite, a temperatura de pirólise e as condições da atomização têm influência direta na determinação e a sensibilidade pode variar em mais de uma ordem de magnitude. No entanto, mesmo sob condições favoráveis, uma grande quantidade de fósforo é perdida antes da etapa de atomização, de modo que uma determinação sem o uso de um modificador químico não teria importância prática para a química analítica [40].

Coskun e Akman [51] utilizaram como modificador a mistura de Pd + Ca para a determinação de fósforo em amostras de alimentos usando análise direta de sólidos. Resano *et al.* [47] mostraram que a combinação de paládio com ácido ascórbico ofereceu os melhores resultados para a determinação de fósforo em materiais plásticos utilizando análise direta por amostragem sólida. López-García [52] determinou P em amostras de leite, mel e fórmulas infantis preparadas por suspensão usando amostragem direta na presença de peróxido de hidrogênio e a

mistura Pd + Mg como modificador químico através de um atomizador eletrotérmico equipado com lâmpada de deutério e corretor de fundo baseado no efeito Zeeman. Hernandez *et al.* [53] estudaram a estabilidade do fósforo durante a atomização eletrotérmica na presença de fluoreto de sódio como modificador químico.

Welz *et al.* [54] também demonstraram que a maioria das linhas atômicas sensíveis para o fósforo que estão atualmente acessíveis sofrem com a forte sobreposição de linhas moleculares correspondentes a absorção de PO. Os autores comprovaram que, dependendo do modificador químico utilizado, apenas PO (e não fósforo atômico) é formado e medido, e estudaram esse fato utilizando diferentes tipos de sistemas de correção de fundo.

Essas descobertas acerca da importância do uso do modificador químico nas determinações de fósforo por ET AAS demonstraram que muitos dos trabalhos publicados anteriormente poderiam conter resultados equivocados, ao ponto de Lepri *et al.* afirmarem que “a história sobre a determinação de fósforo por atomização eletrotérmica convencional no dublete 213,547/213,618 nm deveria ser reescrita” [39].

Muitos desses problemas com relação à determinação de fósforo foram contornados após a disponibilidade do espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (HR-CS AAS). Esse equipamento possui uma fonte que permite uma ampla faixa de determinação, uma excelente resolução espectral, e um eficiente sistema de correção de sinal de fundo. Além de oferecer vantagens para a determinação por absorção atômica, permite também determinações de moléculas diatômica [12, 55].

2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO (HR-CS AAS)

Por muito tempo, o fósforo foi visto em pesquisas como um elemento que dificilmente poderia ser determinado com precisão em baixas de concentrações pela maioria das técnicas analíticas. Mesmo quando os métodos mais sensíveis como ICP-MS e GF AAS eram usados, os limites de detecção eram incomparáveis àqueles obtidos para outros elementos [56].

A recente introdução e disponibilidade comercial do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua está oferecendo novas possibilidades para a espectrometria de absorção e sua utilização para determinação de elementos não-metálicos. A utilização de uma fonte contínua de alta intensidade combinada com um espectrômetro de alta resolução e um detector de arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) torna possível selecionar o comprimento de onda ótimo para a determinação desejada e excluir a maioria das interferências espectrais [12]. O equipamento conta com uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade constituída por dois eletrodos de tungstênio. Essa lâmpada emite radiação em uma faixa contínua do espectro eletromagnético, entre 190 e 850 nm, cuja intensidade de emissão excede a de uma lâmpada de cátodo oco em cerca de 1 a 3 ordens de grandeza [57]. A alta resolução da técnica está relacionada ao uso de um monocromador duplo, constituído por um prisma, uma rede de difração *echelle* e um dispositivo com arranjo de carga acoplada como detector, permitindo uma alta resolução de aproximadamente 2 pm por pixel (unidade fotossensível do detector) [58].

Entre as principais vantagens oferecidas pela HR-CS AAS, pode-se destacar que nenhuma fonte de radiação específica do elemento é necessária, e que a absorção pode ser medida em qualquer comprimento de onda, incluindo bandas de absorção molecular. Além disso, a medida da absorção atômica e do fundo ocorrem simultaneamente, o que permite captar até mesmo os sinais de fundo mais rápidos, o que implica em resultados com maior confiabilidade. Estas particularidades ampliam as aplicações dessa técnica, que se estendem desde os elementos de transição comumente determinados por AAS até elementos de difícil determinação em instrumentos convencionais, como fósforo e enxofre [57, 59].

Outra vantagem do equipamento está na possibilidade do uso da absorvância integrada no comprimento de onda desejado, uma ferramenta que permite selecionar pixels adicionais ao pixel central do pico, gerando um incremento do sinal obtido e, conseqüentemente aumentando a sensibilidade [60].

A HR-CS AAS também tem possibilitado uma melhor compreensão acerca da importância da escolha correta do modificador químico a ser utilizado. A técnica também permite a observação simultânea de linhas atômicas de P e bandas moleculares de PO, bem como uma visão sobre o mecanismo de formação dos

átomos de PO e a avaliação de outros sistemas de correção de fundo [39, 48, 61, 62].

2.4.1 Espectrometria de absorção molecular com fonte contínua de alta resolução (HR-CS MAS)

Várias alternativas têm sido propostas para contornar os problemas relacionados às linhas de ressonância do fósforo. Entre elas o uso de bandas PO, em que as estruturas de absorção molecular podem ser usadas para determinação elementar quando as larguras espectrais dessas estruturas são comparáveis à das linhas de absorção atômica, como é o caso das moléculas diatômicas [61].

A espectrometria de absorção molecular (MAS), é uma técnica desenvolvida para determinação de metais em chama e forno de grafite para o monitoramento da absorção de moléculas diatômicas, estáveis em altas temperaturas e que possuam uma fina estrutura rotacional, como PO, CS e NO, que podem ser comparadas à linhas atômicas e reconhecidas pelo espectrômetro de alta resolução [12, 60]. Os espectros moleculares resultam de transições entre os diferentes estados energéticos da molécula, cada um com um nível de energia específico, e assim como os átomos, as transições também são quantizadas. Contudo, devido ao maior número de transições (vibracionais e rotacionais), os espectros moleculares apresentam muito mais linhas do que os atômicos, sobre uma ampla faixa do espectro eletromagnético [43].

A pesquisa utilizando MAS começou em 1972, com a investigação do espectro de PO em uma chama ar-acetileno. Em 1976, foi possível a determinação de fósforo com um espectrômetro de absorção atômica equipado com uma lâmpada de deutério, utilizando a absorção molecular de PO a 246 nm em uma chama de acetileno-óxido nitroso [12, 63].

A maioria das aplicações de HR-CS MAS envolve a utilização do forno de grafite, devido aos limites de detecção serem menores quando comparados com a chama [63]. O primeiro trabalho sobre MAS usando um forno de grafite foi publicado por Dittrich em 1978, onde investigou-se a absorção molecular do gálio e do índio usando vaporização eletrotérmica e uma lâmpada de cátodo oco de H₂ como fonte de radiação. No entanto, pesquisas posteriores não tiveram êxito devido aos problemas constantes que surgiam em relação à ineficiente correção de fundo e perdas significativas de sensibilidade [12, 63, 64].

Um dos primeiros trabalhos sobre MAS envolvendo a determinação de fósforo através da molécula PO foi realizado por Fuwa *et al.*, ao usarem uma chama de ar-acetileno e uma fonte contínua de excitação. Embora os resultados não tenham mostrado um bom desempenho analítico com limite de detecção de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, este trabalho serviu de base para muitas pesquisas subsequentes [12].

Desde a sua introdução, a HR-CS AAS provou ser um significativo passo com relação à espectrometria de absorção com fonte de linha tradicional (LS AAS). A radiação emitida pela fonte contínua permite a seleção de qualquer uma das linhas rotacionais utilizadas para determinações indiretas de não-metals, como fósforo, enxofre e os halogênios via moléculas diatômicas gasosas termicamente estáveis [57, 48].

Com o uso desse equipamento, as determinações envolvendo P podem ser realizadas utilizando a linha atômica $213,6175 \text{ nm}$ ou bandas de absorção molecular, em chama ou em forno de grafite. Diferentes dos equipamentos que faziam uso de lâmpadas de cátodo oco de fósforo de pouca intensidade, com a lâmpada de xenônio usada em HR-CS AAS é possível obter a mesma intensidade em todos comprimentos de onda e intensidade de uma a três ordens de grandeza mais elevada que as emitidas pelas fontes de linhas tradicionais [65, 12, 48].

Huang *et al.* [38] determinaram P, S, F e Cl via absorção molecular de PO, CS, GaF e AlCl, respectivamente, por HR-CS MAS utilizando uma chama de ar-acetileno, de modo que, as espécies moleculares foram avaliadas através do espectro rotacional fino exibido por essas espécies. Em um trabalho similar, Heitman *et al.* [13] relataram a determinação P, S, F e Cl via absorção molecular de PO, CS, GaF e AlCl, respectivamente, utilizando HR-CS GF MAS em materiais de referência de farinha de trigo. O LD obtido para o fósforo foi de $0,9 \text{ ng}$ sem o uso do modificador químico.

Resano *et al.* [14] determinaram fósforo em materiais biológicos certificados utilizando amostragem sólida com HR-CS AAS e HR-CS MAS. O estudo otimizou as melhores condições para ambas as técnicas comparando o desempenho de cada uma. Para a absorção atômica foi necessário o uso de tungstênio como modificador químico permanente juntamente com paládio e ácido ascórbico a uma elevada temperatura de atomização ($2650 \text{ }^\circ\text{C}$) afim de garantir a conversão completa dos átomos de P. O LD atingido foi de $4,9 \text{ ng}$. Para absorção molecular de PO apenas o W foi usado como modificador e uma temperatura de vaporização de $1900 \text{ }^\circ\text{C}$ foi

suficiente. O LD foi de 21 ng. Apesar de um menor LD ter sido alcançado nas medidas feitas por AAS, foi necessário também um rigoroso controle do programa de temperatura e uma mistura complexa de modificadores. Por outro lado, quando o fósforo foi monitorado através de linhas moleculares de PO, a determinação foi realizada em uma menor temperatura de vaporização e permitiu o uso de um único modificador. Ao comparar os métodos utilizados, os autores concluíram que tanto AAS como MAS permitiram a determinação exata e precisa de P nas amostras certificadas, no entanto, quando a determinação foi realizada por MAS, foi possível utilizar menores temperaturas de vaporização, o que aumenta a vida útil do tubo de grafite.

Uma estratégia para aumentar a sensibilidade nas determinações envolvendo moléculas diatômicas, que tem sido pouco utilizada, consiste no somatório de absorvâncias de linhas próximas para gerar um aumento do sinal analítico. Tais moléculas possuem várias linhas de absorção de sensibilidade semelhantes que podem ser utilizadas em uma mesma determinação [15, 66].

2.4.2 Monitoramento simultâneo de linhas do mesmo analito em HR-CS GF MAS

Uma das grandes vantagens relacionadas ao uso de espectrômetro de fonte contínua está relacionada com a capacidade de monitorar várias linhas atômicas principais e secundárias ou moleculares simultaneamente. Devidos às bandas moleculares apresentarem diversas linhas com sensibilidades muito próximas, torna-se interessante a exploração do somatório das absorvâncias de diferentes comprimentos de onda para um determinado analito com a finalidade de obter um aumento do sinal analítico [15, 67].

O monitoramento simultâneo de várias linhas atômicas ou moleculares podem trazer muitas vantagens, tais como: melhoria na sensibilidade e na precisão pela soma dos sinais de diferentes linhas do mesmo elemento ou molécula; melhoria na linearidade com a utilização de pixels laterais; aumento do alcance linear através da monitorização de multipletos; correção simples com a seleção de um padrão interno adequado, ou correção matemática exata dos espectros sobrepostos [15, 67].

Resano e colaboradores [55] monitoraram as seis transições moleculares mais fortes de sulfeto de carbono (CS) na vizinhança de 258 nm e obtiveram uma melhoria em termos de precisão quando o sinal analítico foi gerado a partir do

somatório dessas linhas. O LD também demonstrou ser três vezes menor (3 ng) quando comparado ao obtido para medidas realizadas em uma única transição molecular (9 ng).

Na maioria dos casos, ao usar as informações dessas linhas, ocorre um aumento na confiabilidade dos resultados analíticos, uma vez que interferências potenciais podem ser detectadas se diferentes linhas fornecerem resultados analíticos significativamente diferentes. No caso da molécula diatômica PO, a sensibilidade do método pode ser muito mais elevada com a possibilidade de monitorar cerca de 10 linhas na vizinhança de 213,618 nm. Em tal caso, a estrutura rotacional hiperfina de transições eletrônicas moleculares são tipicamente monitoradas e várias características espectrais com uma largura semelhante à de linhas atômicas estão disponíveis, o que pode fazer com que o LD seja três vezes menor [68, 69]. Além disso, por apresentar três diferentes transições eletrônicas, a molécula de PO possui uma grande quantidade de linhas de diferentes sensibilidades, que podem ser usadas para a determinação [12].

No entanto, é necessário um estudo para escolher as melhores linhas de sensibilidades semelhantes. Quando a sensibilidade das linhas que constituem o múltiplo é significativamente diferente não faz muito sentido combinar os sinais obtidos para todas as linhas, uma vez que a adição das linhas menos sensíveis melhoraria pouco o sinal analítico geral, e provocaria ao mesmo tempo, um aumento do sinal de fundo, podendo aumentar o LD final [66, 68].

Dessa forma, o somatório de linhas moleculares é um importante artifício disponível nos equipamentos com fonte contínua de alta resolução para a determinação de elementos não-metálicos através da absorção molecular. Uma vez que todas as informações das transições moleculares estão disponíveis, há a possibilidade de ampliar o estudo de interferentes e aumentar consideravelmente a confiabilidade dos resultados analíticos [68, 69].

Resano *et al.* [14] usaram o somatório de nove linhas de absorção de PO ao redor de 213,618 nm afim de diminuir o limite de detecção na determinação de P em amostras biológicas. Bechlin *et al.* [15] também avaliaram o somatório das linhas 246,400, 247,780 e 247,620 nm para a determinação de fósforo via PO em plantas por HR-CS F AAS e observaram um aumento na sensibilidade ao utilizarem esse artifício para as determinações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Propor um método analítico para determinação indireta de fosfolipídios em lecitina de soja por espectrometria de absorção molecular em forno de grafite com fonte contínua de alta resolução (HR-CS GF MAS) através da determinação de fósforo via absorção de PO.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o solvente adequado para realizar a diluição da amostra de lecitina de soja para viabilização da introdução da amostra no espectrômetro;
- Avaliar o comportamento da espécie PO em diferentes linhas de absorção moleculares;
- Investigar modificadores químicos que possibilitem a estabilização do PO durante a etapa de pirólise;
- Otimizar o programa de temperatura do forno de grafite por curvas de pirólise e vaporização para amostras de lecitina de soja;
- Obter as características analíticas do método desenvolvido (limite de detecção e quantificação; precisão e exatidão) e validá-lo;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de lecitina de soja comerciais.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPAMENTOS

As medidas de absorção molecular foram realizadas com um espectrômetro de fonte contínua de alta resolução Modelo ContrAA 700 da Analytik Jena AG (Jena, Alemanha), equipado com uma lâmpada de xenônio de arco curto XBO 301 com uma potência nominal de 300 W, operando em modo hot-spot. Tubos de grafite revestidos piroliticamente com plataforma integrada fornecidos pelo mesmo fabricante foram utilizados para as determinações. O gás de purga utilizado foi o argônio (White Martins, Brasil) com 99,998% de pureza em uma vazão de 2,0 Lmin⁻¹. Os sinais analíticos foram medidos como valores de absorvância integrada, A_{int} (área do pico), com cinco pixels conforme sugerido por Lima [70], usando as linhas de absorção molecular de PO em 213,5610 nm, 213,5259 nm, 213,6172 nm e 213,6374 nm, 246,4000nm e 324,6200nm. O programa de aquecimento usado para as determinações de P via PO é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Programa de aquecimento para a determinação de PO em lecitina de soja por HR-CS GF MAS usando magnésio como modificador.

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, °C/s	Permanência, s	Vazão do gás L min ⁻¹
Secagem	110	3	20	2.0
Secagem	140	5	15	2.0
Pirólise	1300	200	20	2.0
Autozero	1300	0	5	0
Vaporização	2300	2500	5	0
Limpeza	2450	500	4	2.0

Como método comparativo, amostras de lecitina de soja comerciais foram digeridas em sistema aberto convencional, utilizando um bloco digestor modelo TECNAL TE 040/25 e as determinações foram feitas por espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), modelo 720 series (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). As condições operacionais utilizadas para a determinação de P foram semelhantes às otimizadas por Korn *et al.* [71] e encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3- Condições operacionais para determinação de P por ICP OES em amostras de lecitina de soja.

Parâmetro	Valor
Potência (kW)	1,10
Vazão do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Nebulizador	V-Groove
Câmara de nebulização	Sturman-Master
Vazão de nebulização (L min ⁻¹)	0,75
Linha espectral (nm)	213,618

3.2 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas usando água ultrapura obtida a partir do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA) com uma resistividade maior que 18.0 MΩcm. As vidrarias utilizadas foram descontaminadas previamente em solução de HNO₃ a 10% (v/v) durante 12 h, lavadas em seguida com água ultrapura e secas à temperatura ambiente.

A solução de cálcio 0,1 % (m/v) utilizada como modificador químico, foi preparada a partir da dissolução de 125 mg de CaCl₂ (Merck, Darmsdt, Alemanha) em propanol para um volume final de 50 mL. Para o preparo da solução de magnésio, também utilizado como modificador químico, foi necessária a dissolução de 175 mg de MgCO₃ (Merck) em um volume mínimo de HCl 2 mol L⁻¹ com posterior diluição em propanol para um volume final de 50 mL.

Uma solução estoque de fósforo 1000 mg L⁻¹ foi preparada pela dissolução de fosfato de amônio monobásico anidro (Merck) em água ultrapura. As soluções intermediárias de trabalho foram preparadas pela diluição da solução estoque com água ultrapura.

Metilsubutilcetona (Merck), pentano (Merck), hexano (Merck), acetona (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido acético (Vetec), metiletilcetona (Merck), propanol (Vetec) e metanol (Vetec) foram testados como solventes para diluição das amostras de lecitina de soja.

Foram analisadas seis amostras de lecitina de soja em cápsulas de diferentes marcas adquiridas em lojas comerciais de produtos naturais.

3.3 PROCEDIMENTOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS EM AMOSTRAS DE LECITINA DE SOJA

3.3.1 Estudo do preparo da amostra

Solventes orgânicos como metilisobutilcetona (MIBK), pentano, hexano, acetona, ácido acético e metiletilcetona foram testados como diluentes da amostra.

3.3.2 Estudo do comportamento térmico

Estudos foram realizados para definir as melhores condições térmicas e o melhor modificador químico a ser utilizado nas linhas de absorção molecular de PO em 213,561, 246,400 e 324,620 nm. Esse estudo foi realizado variando as temperaturas de pirólise e vaporização entre 700-1800°C e 1700-2700°C, respectivamente, na ausência e na presença dos modificadores químicos cálcio e magnésio preparados na concentração de 0,1% (m/v) em propanol.

3.3.3 Estudo do efeito de matriz

Comparou-se as curvas de calibração obtidas empregando o método da adição de analito, em uma solução da amostra de lecitina diluída em MIBK e o método de calibração externa usando solução padrão aquosa preparada a partir de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Essas curvas foram construídas de modo que houvessem massas de fósforo equivalentes às seguintes concentrações: 0; 40; 80; 100; 120; 160 e 200 mg L⁻¹.

As medidas foram realizadas por absorvância integrada usando as linhas moleculares de PO isoladas em 213,561, 246,400 e 324,620 nm e pelo somatório de quatro linhas vizinhas à 213 nm (213,5610; 213,5259; 213,6172 e 213,6374 nm) que possuem sensibilidades próximas.

3.3.4 Preparo das amostras para medidas por HR-CS GF MAS

Foram pesadas massas de aproximadamente 0,1000 g de cada amostra de lecitina de soja diretamente em tubos de polietileno e diluídas em 10 mL de MIBK

P.A (Merck). Todas as amostras foram preparadas em triplicatas para as medidas por HR-CS GF MAS para obtenção dos sinais de absorção nas linhas moleculares de PO. A determinação foi realizada pela medida do sinal de absorvância integrada resultante do somatório das linhas de absorção de PO 213,5610, 213,5259, 213,6172 e 213,6374 nm na presença de 5 μ L do modificador químico Mg.

3.3.5 Método comparativo

O método desenvolvido foi validado através da comparação dos resultados obtidos com as amostras tratadas por diluição em MIBK seguidas da determinação por HR-CS GF MAS com aqueles resultantes de amostras tratadas por digestão ácida e determinação por ICP OES. O procedimento de digestão das amostras foi feito conforme sugerido por Korn *et al.* [71], com algumas modificações.

Massas de aproximadamente 0,2000 g de cada amostra de lecitina foram pesadas diretamente em tubos digestores. Em seguida, foi adicionado 3,0 mL de HNO₃ concentrado e 1,0 mL de H₂SO₄ concentrado. A temperatura do sistema foi variada em etapas. Nos primeiros 15 min, a temperatura foi mantida a 150 °C e depois mantida mais 15 min em 180 °C. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de H₂O₂ 30% (v/v) e então, a temperatura foi elevada para 220° C. O tempo total do procedimento foi de 2 h. Após resfriamento a temperatura ambiente, a diluição do digerido final foi feita para 10 mL com água ultrapura em frascos de polietileno. A digestão de todas as amostras foi realizada em triplicata e brancos analíticos também foram obtidos do mesmo modo como as amostras.

A curva de calibração foi preparada a partir de soluções padrão de fósforo 1000 mg L⁻¹ (Specsol, Quimlab, Brasil). Em cada solução foi adicionado 1,0 mL de H₂SO₄ 10% (v/v) e diferentes quantidades da solução padrão, afim de obter soluções nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 mg L⁻¹.

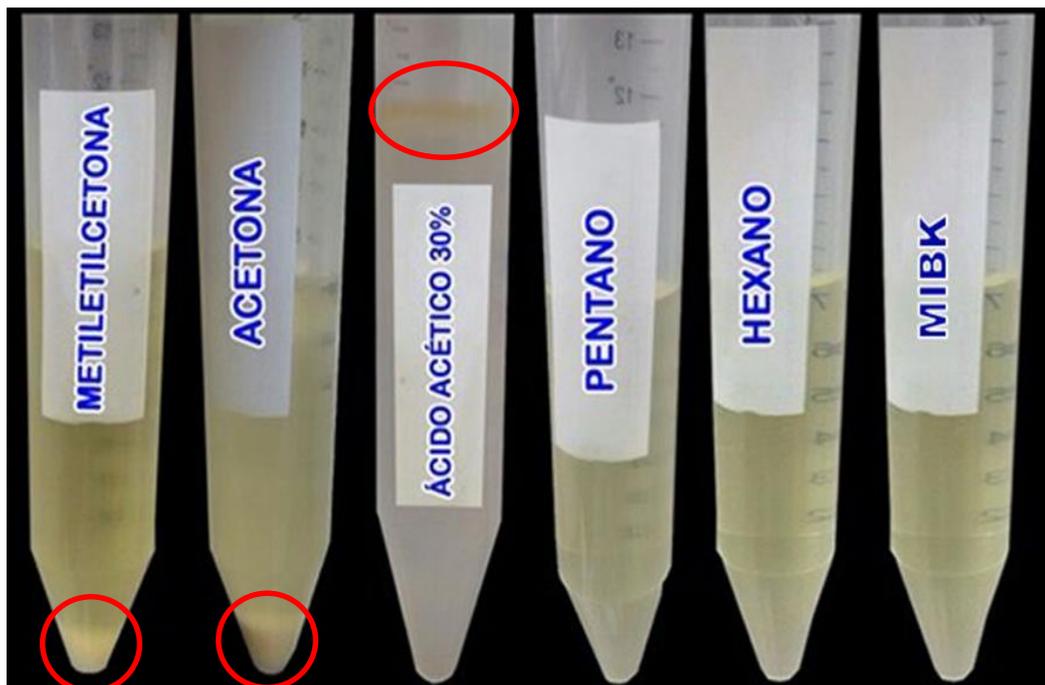
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DO PREPARO DA AMOSTRA

Inicialmente, a proposta do trabalho era realizar a análise por amostragem direta com o amostrador sólido, mas devido à elevada viscosidade da amostra, não foi possível prosseguir com essa ideia. A alternativa foi converter a amostra em uma forma compatível com o instrumento utilizado através da diluição em um solvente orgânico de modo que não houvesse perda do analito.

A diluição em solventes orgânicos é uma forma de preparo de amostras que viabiliza de forma simples e rápida análises empregando a espectrometria atômica envolvendo matrizes oleosas. Dentre os solventes utilizados com mais frequência para diluição de amostras dessa natureza estão a metilisobutilcetona (MIBK), pentano, hexano, acetona, ácido acético, metiletilcetona, propanol, metanol e tolueno [72, 73, 74]. Considerando que a lecitina é constituída por diferentes fosfolipídios com diferentes grupos que lhes conferem diferentes polaridades e solubilidade em solventes orgânicos [10], no presente trabalho, alguns desses solventes foram testados para diluição das amostras como ilustrado na Figura 3.

Figura 3- Diluição da lecitina de soja em diferentes solventes orgânicos.

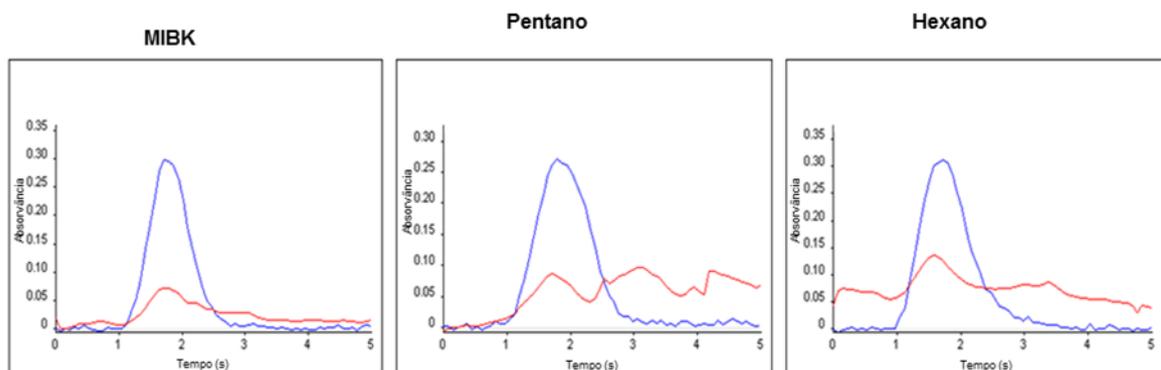


Como pode ser visto na Figura 3, nos testes de solubilização com a acetona e a metiletilcetona, houve dissolução parcial da amostra. Em ácido acético 30% (v/v) houve dissolução parcial da amostra com formação de uma solução turva. A solubilização completa das amostras foi observada quando se utilizou MIBK, pentano e hexano.

Realizou-se, então, um estudo acerca dos valores de absorvância e da estabilidade dos sinais analíticos, observando o perfil dos picos de absorção obtidos com o uso dos três solventes como diluentes da lecitina. As medidas foram realizadas em 213,561 nm, utilizando temperaturas de pirólise e vaporização de 1200 °C e 2300 °C, respectivamente. Essas condições já haviam sido otimizadas por Lima [70] na determinação de P via PO em biodiesel.

Sinais analíticos estáveis, após sucessivas medidas, foram encontrados para esses solventes. Observou-se também que as respostas analíticas foram similares quando se utilizou MIBK, pentano ou hexano; entretanto picos mais estreitos e os menores sinais de fundo foram obtidos com as amostras diluídas em MIBK. O resultado desse estudo encontra-se ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Perfil dos picos de absorção molecular de PO em 213,561 nm para uma amostra de lecitina de soja diluída em diferentes solventes orgânicos.



*Sinal analítico (—); Sinal de fundo (—);

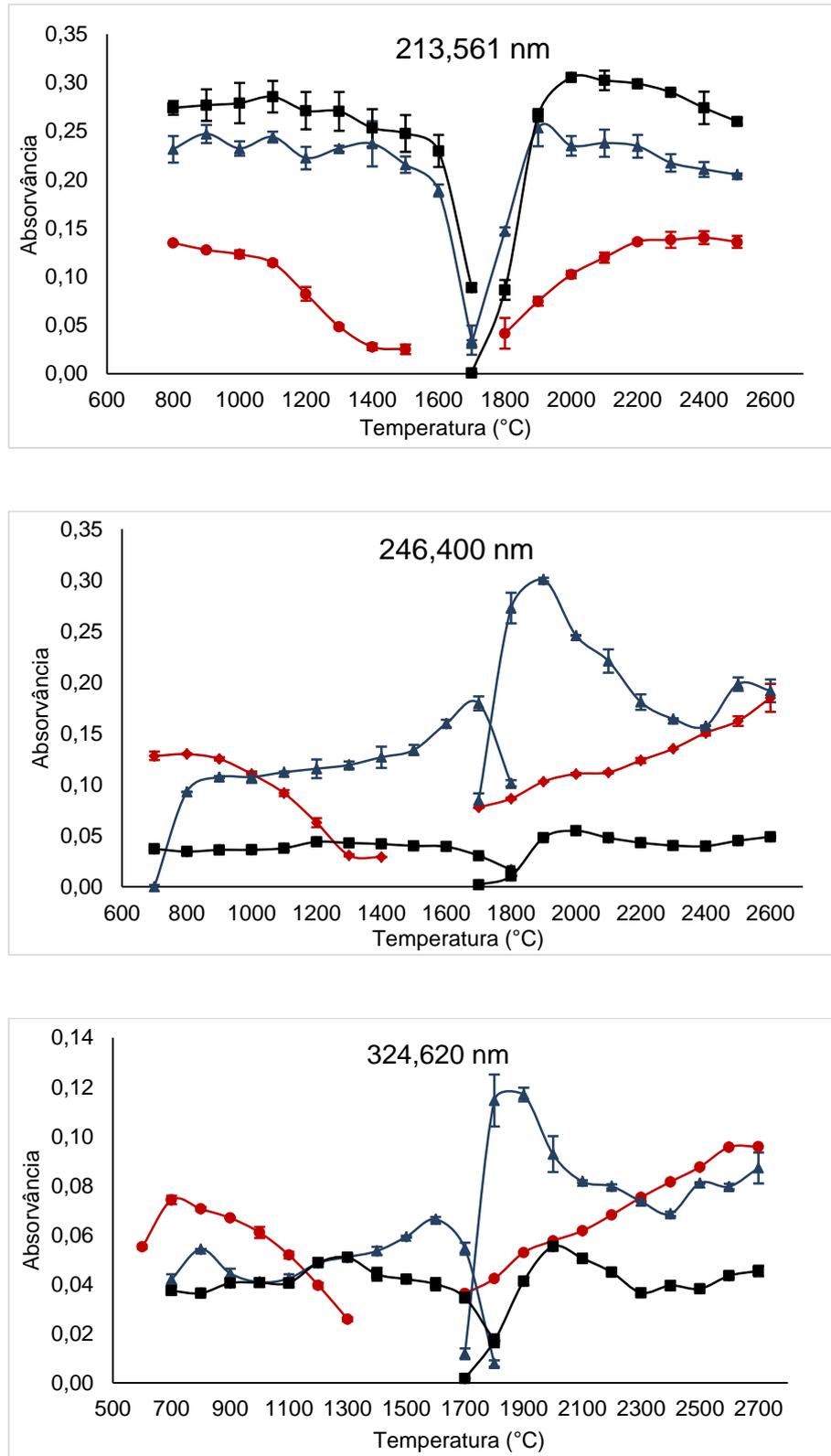
Com base nesses resultados, o MIBK foi selecionado como solvente para diluição das amostras de lecitina. Contudo, por se tratar de um solvente orgânico volátil, houve sempre o cuidado em se preparar as amostras momentos antes das medidas por HR-CS GF MAS. Deve-se destacar que o MIBK foi empregado anteriormente como solvente para diluição de matrizes orgânicas para determinações por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica [73, 75, 76].

4.2 ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO

A molécula diatômica de PO apresenta três diferentes transições eletrônicas, e conseqüentemente, possui uma grande quantidade de linhas moleculares com diferentes sensibilidades que podem ser usadas para determinação de fósforo [63]. Alguns trabalhos têm sido relatados acerca do estudo de absorção de PO em diferentes linhas moleculares. Huang *et al.* [3838], por exemplo, estudaram a absorção dessa molécula em 246,40, 247,78, 324,62 e 327,04 nm na atomização por chama, atentos às possíveis interferências em cada linha. Já Resano *et al.* [14] realizaram estudos sobre a absorção de PO em forno de grafite, explorando o somatório de linhas na região espectral ao redor da linha 213 nm.

Com base nessas investigações, no presente trabalho, foram avaliadas as seguintes linhas de transições moleculares de PO: 213,561; 213,5259; 213,6172; 213,6374; 246,400 e 324,620 nm, com o intuito de se estabelecer a linha de PO mais adequada para a quantificação de fosfolipídios nas amostras de lecitina de soja. Como as linhas ao redor de 213 nm possuem sensibilidades semelhantes, o estudo do comportamento térmico nessa região espectral foi realizado com medidas apenas em 213,561 nm. Esse estudo também foi realizado em 246,400 e 324,620 nm para uma amostra de lecitina de soja diluída em MIBK (1:100 m/v), na ausência e na presença dos modificadores químicos cálcio e magnésio. As curvas de pirólise e vaporização obtidas em cada linha estão apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Curvas de pirólise e vaporização para determinação de P em lecitina de soja via PO na ausência (●) e na presença dos modificadores Ca (■) e Mg (▲) nas linhas de absorção molecular 213,561; 246,400; e 324,620 nm (n= 2).



Os sinais obtidos indicam que a formação de PO foi favorecida na presença dos modificadores. Pode-se observar também que os maiores sinais analíticos em 213,561 nm foram obtidos na presença de cálcio, enquanto que em 246,400 nm e 324,620 nm, os maiores sinais analíticos foram obtidos na presença de magnésio. Como já esperado, houve um decréscimo na sensibilidade e estabilidade térmica do analito quando nenhum modificador foi utilizado. Ainda assim, foi possível afirmar que ocorreu absorção da molécula nessa condição. De acordo com Lepri e colaboradores [39, 48], na ausência de um modificador, a molécula diatômica PO é formada logo no início da fase de vaporização e, sob essas condições, fósforo atômico não é formado e toda a absorção é proveniente da molécula de PO, cujo espectro se sobrepõe à linha atômica.

Nas curvas de pirólise e vaporização, pode também ser observado que o analito apresentou um comportamento térmico semelhante quando cálcio e magnésio foram usados como modificadores químicos nas medidas realizadas em 213,5611 nm. Provavelmente, um mesmo mecanismo de estabilização do analito foi obtido para ambos os modificadores, o que indica que os dois podem ser utilizados para a determinação do fósforo em lecitina de soja. Huang *et al.* [77], ao realizarem um trabalho semelhante usando a atomização em chama, relataram que a presença de cálcio pode causar forte supressão da absorção de PO devido à formação de fosfato de cálcio (CaPO_4), que é termicamente estável, tornando-se um interferente na determinação de fósforo por F AAS. No entanto, quando a atomização é realizada em forno de grafite, a formação de CaPO_4 pode favorecer a estabilização do fósforo durante essa etapa, pois esse fosfato é termicamente estável. Um mecanismo semelhante ocorre quando o magnésio é utilizado como modificador químico.

A adição de cálcio ainda pode resultar na formação de óxido de cálcio (CaO), que poderá depositar-se na superfície do forno de grafite e das lentes do equipamento ou na formação de CaC_2 , resultante da interação com o grafite [56]. A formação de óxido de magnésio (MgO) também pode ocorrer, mas apenas quando baixas temperaturas de vaporização são utilizadas, pois esse óxido pode permanecer no forno até 2000 °C.

Os resultados obtidos mostram também que as curvas de pirólise e vaporização foram bem definidas apenas em 213,561 nm. Nessa linha de absorção, uma melhor resposta analítica foi alcançada em uma temperatura de pirólise de

1300 °C e a etapa de atomização foi marcada pela estabilização do sinal entre 2100-2300 °C. Na Tabela 4 são sumarizadas as condições estabelecidas de pirólise e atomização para cada linha. Essas condições foram escolhidas observando não somente a intensidade do sinal analítico, mas também o perfil do pico de absorção e os sinais de fundo gerados em cada situação.

Tabela 4 - Temperaturas de pirólise e vaporização (°C) estabelecidas em cada linha de absorção de PO avaliada na presença e ausência de modificadores químicos.

Linha	Temperatura °C	Mg	Ca	Sem modificador
213,561 nm	Pirólise	1300	1100	800
	Vaporização	2300	2200	2200
246, 400 nm	Pirólise	1600	1100	800
	Vaporização	2300	2100	2500
324,620 nm	Pirólise	1600	900	1400
	Vaporização	2200	2000	2700

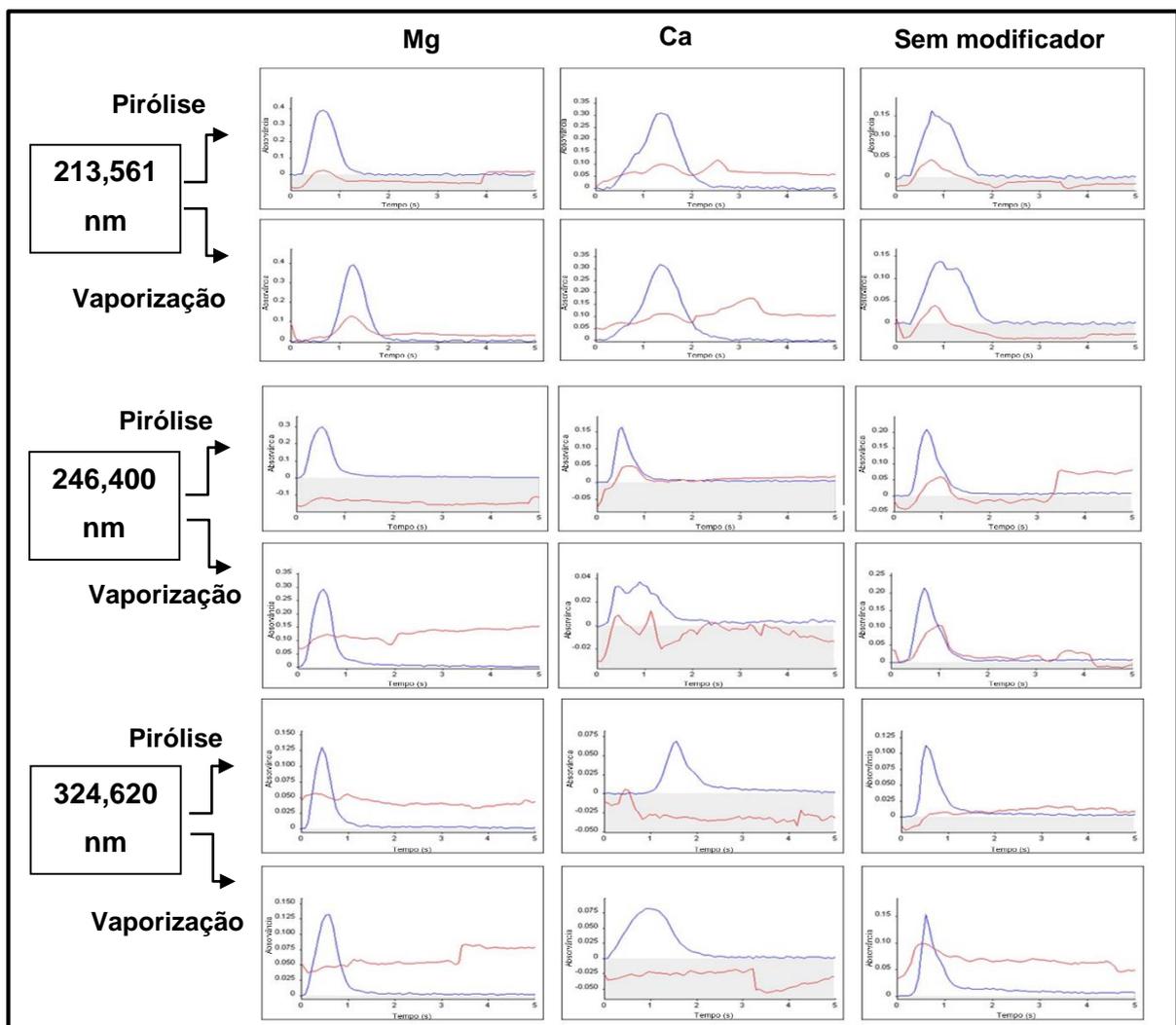
Ao observar as temperaturas de pirólise e vaporização estabelecidas para cada linha de absorção, pode-se confirmar as diferentes sensibilidades para a determinação de PO. Os resultados estão em consonância com o que foi observado previamente por Dessuy [78], onde relatou-se dificuldades na otimização das etapas de pirólise e vaporização usando as linhas de transição molecular em 246,400 nm e 324,620 nm. É importante destacar que a transição eletrônica $X^2 \Pi \leftrightarrow D^2 \Pi$ da molécula PO está situada na mesma faixa espectral do dublete não ressonante do fósforo: 213,547/ 213,618 nm [39], acarretando em uma maior sensibilidade para as determinações de PO feitas em 213,561 nm, e conseqüentemente uma melhor definição na otimização dessas etapas.

Deve-se ressaltar que temperaturas de vaporização acima de 2300°C podem resultar em uma diminuição acentuada na sensibilidade na determinação de PO, o que pode ser resultado de fatores como: menor tempo de residência das moléculas de PO no forno; formação de fósforo atômico, que começa a ser significativa em temperaturas mais altas; ou a eventual formação de outras espécies moleculares

diferentes de PO, tais como P_2 e PO_2 . Tal comportamento foi observado no estudo da temperatura de vaporização em 213,561 nm na presença dos modificadores, em que o sinal de absorvância do PO diminuiu em temperaturas acima de 2300 °C [14]. Esse fato, associado à análise dos picos de absorção obtido em 2300 °C (Figura 6), temperatura em que os picos foram mais estreitos e um menor sinal de fundo foi notado se comparado às outras duas temperaturas com um sinal analítico semelhante (2100 °C e 2200 °C), determinou a escolha desta temperatura para a formação da molécula de PO.

Um estudo também foi realizado acerca do perfil dos picos de absorção obtidos nas diferentes linhas moleculares que foram descritas na Tabela 4. Esses picos estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6- Perfil dos picos de absorção de PO nas curvas de pirólise e vaporização em diferentes linhas moleculares de PO na presença de Mg, Ca e na ausência do modificador.



*Sinal analítico (—); Sinal de fundo (—);

O que pode se notar nessa figura é que os picos mais estreitos e os menores sinais de fundo foram obtidos em 213,561 nm ao usar o Mg como modificador químico. Todos os picos obtidos nas demais linhas foram largos e indefinidos e apresentaram um acentuado sinal de fundo. Dessa forma, a Figura 6 confirma que o Mg seria o modificador químico mais adequado ao trabalho. No entanto, com o intuito de continuar verificando o comportamento do PO em diferentes linhas moleculares, continuou-se com o estudo das três linhas usando magnésio como modificador químico.

4.3 ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ

Curvas de calibração foram obtidas pela técnica de adição de analito e com o uso de padrões aquosos com uma faixa de concentração que variou de 0 a 200 mg L⁻¹. A curva de adição foi obtida a partir de uma amostra de lecitina de soja em meio orgânico (MIBK) e a curva de calibração externa foi obtida usando padrões aquosos obtidos a partir de di-hidrogeno fosfato de amônio (NH₄H₂PO₄), conforme sugerido por Heitmann *et al.* [13] que também realizou a determinação de P via absorção molecular de PO por HR-CS GF MAS usando a calibração externa com este sal.

As curvas de calibração foram avaliadas para cada uma das três linhas de absorção de PO em 213,561, 246,400 e 324,620 nm, usando Mg como modificador químico e as respectivas temperaturas de pirólise e vaporização estabelecidas para cada caso (Tabela 4). Além das curvas de calibração obtidas em 213,561 nm, curvas obtidas com o somatório dos sinais analíticos obtidos com as linhas localizadas ao redor de 213 nm (213,5259, 213,6172, 213,6374 e 213,5610 nm) também foram avaliadas. As condições térmicas foram as mesmas estabelecidas para a linha em 213,561 nm individualmente.

Na Tabela 5 são apresentados os coeficientes angulares e os coeficientes de correlação obtidos para as curvas de calibração aquosa e orgânica em cada linha de absorção.

Tabela 5- Comparação das curvas de calibração obtidas empregando adição do analito e padrões externos (n= 3).

Linha de absorção nm	Adição do analito		Calibração externa	
	R	a	R	a
Somatório das linhas próximas à 213	0,9988	0,0045 ± 0,0004	0,9976	0,0043 ± 0,0005
213,561	0,9982	0,0014 ± 0,0002	0,9980	0,0012 ± 0,0001
246,400	0,9726	0,0005 ± 0,0001	0,9993	0,0015 ± 0,0001
324,620	0,9926	0,0011 ± 0,0001	0,9683	0,0028 ± 0,0005

a: coeficiente angular; R: coeficiente de correlação.

Os valores listados na Tabela 5 indicam que os coeficientes angulares obtidos pelos dois tipos de curvas de calibração apresentaram valores próximos para as medidas feitas em 213,561 nm e com o somatório de linhas em sua vizinhança. Para essas linhas observa-se também que os valores dos coeficientes foram maiores para as curvas por adição de analito. Nas medidas realizadas em 246,400 e 324,620 nm os coeficientes angulares foram maiores para a curva por calibração externa.

É possível também extrair da Tabela 5 os intervalos de confiança do coeficiente angular (a) em cada linha de absorção. Observa-se que os intervalos obtidos pelas curvas de padrão orgânico interceptam nos intervalos do padrão aquoso apenas quando as medidas foram realizadas em 213,561 nm isolada ou com o somatório de suas linhas vizinhas. Para as outras duas linhas de absorção, não há uma interseção entre os intervalos de confiança dos coeficientes angulares obtidos pelas duas técnicas de calibração. Isso significa que apenas nas medidas feitas em 213,516 nm e naquelas feitas usando o somatório de linhas vizinhas à 213 nm pode-se fazer o uso de calibração externa usando padrões aquosos, e que não há diferenças entre os dois métodos de calibração propostos nas medidas realizadas com essas linhas de absorção. Para as medidas realizadas em 246,400 e 324,620 nm, apenas a calibração com adição do analito poderia ser utilizada para evitar os efeitos de matriz na aplicação do método.

Para as medidas feitas em nas linhas vizinhas à 213 nm, também foram obtidos maiores coeficientes de correlação (R). Esse coeficiente mede o grau de

relacionamento linear entre os valores de absorvância e concentração do analito, quando mais próximo de 1, maior é essa correlação.

Por ter obtido bons valores de a e R , uma boa relação linear nos dois tipos de calibração e por permitir o uso da calibração externa, a determinação de P via PO poderia ser aplicada na linha de absorção 213,561 nm ou usando o somatório da absorvância das linhas vizinhas. As próximas etapas do trabalho seguiram com determinações usando somente essas linhas.

4.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO DESENVOLVIDO

Os limites de detecção e de quantificação do método proposto foram calculados como três e dez vezes o desvio padrão de dez medidas do branco, divididos pela inclinação da curva de calibração, respectivamente. A sensibilidade foi representada pela inclinação da curva analítica e a precisão foi expressa como desvio padrão relativo (% RSD), dado pela razão do desvio padrão de dez réplicas de uma mesma amostra pelo valor da média da concentração determinada. Esses parâmetros foram obtidos usando determinações em 213,5610 nm e pelo somatório dos sinais obtidos em suas linhas vizinhas (213,5259 nm; 213,6172 nm; 213,6374 nm; 213,5610 nm) e encontram-se listados na Tabela 6.

Tabela 6- Características analíticas do método.

Parâmetro	Somatório 213 nm	213,5610 nm
LD*	2,35	11,37
LQ*	7,83	37,90
Sensibilidade**	0,0043	0,0012
% RSD***	2,47	4,23

LD: Limite de detecção, LQ: Limite de quantificação, RSD: desvio padrão relativo, * mg g⁻¹, ** em g mg⁻¹, *** %RSD para uma concentração de 2,2% (m/v).

É possível observar que a sensibilidade e a precisão foram melhores quando o somatório de linhas de PO na vizinhança de 213,561 nm foi usado. Esse fato resultou em valores mais baixos de LD e LQ quando a estratégia de somatório dos sinais analíticos foi utilizada, em consonância com o reportado previamente na literatura [15, 69].

Resano e colaboradores [69], ao monitorarem a molécula de PO, já haviam relatado que a sensibilidade do método pode ser muito mais elevada com o uso das linhas nas proximidades de 213 nm. Em tal caso, a estrutura rotacional hiperfina de transições eletrônicas moleculares são tipicamente monitoradas e várias características espectrais com uma largura semelhante à de linhas atômicas estão disponíveis. Uma vez que, todas as informações destas linhas estão disponíveis, haverá um aumento na confiabilidade dos resultados analíticos, o que fará com que o LD seja três vezes melhor. Uma melhoria no LD também foi relatada por Bechlin [15] ao usar o somatório de linhas de absorção na determinação de P via PO.

Resano *et al.* [14] ainda recomendaram a utilização dos sinais combinados mesmo quando resultados satisfatórios são obtidos com apenas uma linha molecular, uma vez que o uso desse artifício leva a uma estimativa mais robusta do resultado final. Contudo, é importante ressaltar que o aumento de sensibilidade só ocorre quando as linhas envolvidas no somatório de absorção possuem sensibilidades semelhantes. Caso contrário, a contribuição no aumento de absorvância será pouca se comparada ao significativo aumento no sinal de fundo.

Como discutido anteriormente, a maioria dos trabalhos, envolvendo essa determinação, alcança limites de detecção e quantificação elevados. Na Tabela 7 encontram-se listados alguns limites de detecção obtidos para determinações de P via PO por HR-CS MAS.

Tabela 7- Limites de detecção para determinação de P via PO usando o espectrômetro com fonte contínua de alta resolução com chama e forno de grafite.

Vaporização	Comprimento de onda, nm	LD	Amostra	Referência
Forno de grafite	246,40	0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$	Farinha de trigo	[13]
Forno de grafite	Somatórios de 9 linhas ao redor de 213	20 $\mu\text{g g}^{-1}$	Materiais biológicos	[14]
Chama ar-acetileno	247,620	13,7 mg L^{-1}	Plantas	[15]
Chama ar-acetileno	324,62	1,3 mg L^{-1}	Ferro fundido	[38]

Os dados da Tabela 7 indicam o método desenvolvido apresentou um limite de detecção esperado para a determinação de fósforo. Os outros parâmetros obtidos também se mostraram adequados para a aplicação do método na lecitina de soja, uma amostra com alto teor de fósforo, conforme será descrito no próximo tópico.

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método proposto foi aplicado na determinação indireta de fosfolipídios em seis amostras de lecitina de soja em cápsulas adquiridas em casas comerciais de produtos naturais. Devido à falta de material de referência certificado para amostras de lecitina de soja, a exatidão do método foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos por HR-CS GF MAS em amostras diluídas em MIBK com os resultados obtidos por amostras analisadas após digestão por via úmida em bloco digestor, seguida da determinação por ICP OES. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 8. A comparação dos dois conjuntos de dados foi feita através da aplicação do teste-t pareado e observou-se que não houve diferença significativa à um nível de confiança de 95%.

Tabela 8- Resultados da determinação de fósforo e fosfolipídios (%) em lecitina de soja.

Amostra	Fósforo		Fosfolipídios	
	HR-CS GF MAS	ICP OES	HR-CS GF MAS	ICP OES
1	1,29 ± 0,01	1,45 ± 0,01	38,7 ± 0,1	43,5 ± 0,3
2	1,35 ± 0,03	1,22 ± 0,06	40 ± 1	37 ± 2
3	1,51 ± 0,05	1,65 ± 0,02	45 ± 2	49,5 ± 0,5
4	1,35 ± 0,09	1,43 ± 0,02	40 ± 3	42,9 ± 0,6
5	1,44 ± 0,04	1,38 ± 0,01	43 ± 1	41,4 ± 0,1
6	1,27 ± 0,06	1,23 ± 0,03	38,1 ± 0,2	37 ± 1

A concentração de fosfolipídios presentes na lecitina de soja é diretamente proporcional ao conteúdo de fósforo [3, 79]. A concentração de fósforo e, conseqüentemente de fosfolipídios, em amostras de lecitina de soja depende da procedência da soja bem como das condições utilizadas no processo de degomagem do óleo [2]. O fator de proporcionalidade é calculado tomando-se por base a massa molar média dos fosfolipídios presentes na lecitina ou no óleo, divididos pela massa atômica do fósforo. Os métodos da Sociedade Americana de Química e Óleos (AOCS) [80], dão um fator aproximado de 30 para se estimar o teor de fosfolipídios presentes em lecitinas extraídas do óleo de soja bruto [81]. Dessa forma, tendo sido realizada a determinação de fósforo via molécula de PO, tal quantidade foi relacionada com os fosfolipídios através da Equação 1:

$$\% \text{ fosfolipídios} = 30 \times \% \text{ teor de fósforo} \qquad \text{Equação 1}$$

Os resultados expressos em termo de percentagem de fosfolipídios, também estão apresentados na Tabela 8. Os resultados obtidos para o teor de fosfolipídios estão de acordo com resultados encontrados previamente por HPLC (28,9- 44,1%) [82], por RMN-P³¹ (47% e 50,7 %) [83, 9] e EASI-MS (50,4%) [7].

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método desenvolvido possibilitou a determinação de fosfolipídios através da determinação de P via PO por HR-CS GF MAS em amostras de lecitina de soja. Ficou evidente que a formação do analito foi favorecida na presença dos modificadores químicos cálcio e magnésio para as medidas realizadas em 213,561 nm. O método apresentou a vantagem de permitir o uso da calibração por padronização externa, garantindo que com a diluição realizada da amostra com MIBK, não há efeito de matriz que interfira no sinal analítico relativo à molécula de PO, para as determinações realizadas em realizadas nessas linhas de absorção.

Foi possível concluir que cada uma das linhas de transição molecular de PO possui diferentes sensibilidades para a absorção dessa molécula. Os parâmetros analíticos tais como limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão foram adequados para o objetivo do trabalho. Cabe destacar que, o somatório de linhas com sensibilidades semelhantes mostrou-se eficiente na melhoria desses parâmetros, comparados aos obtidos pela absorvância integrada resultante do monitoramento de uma única linha.

Foi possível verificar a confiabilidade do método ao constatar que não houve diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas por diluição em MIBK e digestão ácida por via úmida seguidas da determinação por diferentes técnicas analíticas (HR-CS GF MAS e ICP OES).

Como perspectivas, têm-se a aplicação do método em outras matrizes oleosas que possam conter elevadas concentrações de fósforo e o desenvolvimento de métodos que permitam a determinação de metais e interferentes em lecitina de soja usando a diluição em MIBK como preparo da amostra. É possível também monitorar a qualidade de lecitina de soja comercial por outras técnicas analíticas, como RMN P^{31} e HPLC, que permitam o fracionamento e a determinação dos diferentes fosfolipídios presentes na lecitina.

REFERÊNCIAS

- [1] COOPER, L.; AINSCOUGH, T. FT-NIR analysis of lecithin. **International News on Fats, Oils, and Related Materials**. v. 27, n. 1, p. 706-707, 2016.
- [2] RYDHAG, L.; WILTON, I. The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 8, p. 830–837, 1981.
- [3] SOARES, M. S. **Processamento de óleo de soja utilizando ultrafiltração em miscela na etapa de degomagem e na obtenção de lecitina**. 2004. 185 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- [4] 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, n. 9, p. 187–195, 2013.
- [5] WOOD, J. L.; ALLISON R. G. Effects of consumption of choline and lecithin on neurological and cardiovascular systems. **Federation Proceedings** v. 41, n. 14, p. 3015–3021, 1982.
- [6] MERTINS, O.; SEBEN, M.; SCHNEIDER, P. H.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ^1H e de ^{31}P . **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1856-1859, 2008.
- [7] FERNANDES, G. D. **Caracterização de lecitinas comerciais por espectrometria de massas ambiente com ionização sonic-spray**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- [8] LI, H.; GOULDEN, M.; COCCIARDI, R.; HUGHES, J. Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy as a Quality Control Tool for the Analysis of Lecithin and By-Products During Soybean Oil Processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 9, p. 835–841, 2009.
- [9] HELMERICH, G.; KOEHLER, P. Comparison of Methods for the Quantitative Determination of Phospholipids in Lecithins and Flour Improvers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6645–6651, 2003.
- [10] JOHN, J. V. PARK, H.; LEE, H. R.; SUH, H.; KIM, I. Simultaneous extraction of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from soybean lecithin. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 10, p. 1647–1654, 2015.
- [11] TOTANI, Y.; PRETORIUS, H. E.; PLESSIS, L. M. Extraction of Phospholipids from Plant Oils and Colorimetric Determination of Total Phosphorus. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, n. 4, p. 162-163, 1982.

- [12] WELZ, B.; LEPRI, F. G.; ARAUJO, R. G. O.; FERREIRA, S. L. C.; HUANG, M.; OKRUSS, M.; BECKER-ROSS, H. Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, n. 2, p. 137–148, 2009.
- [13] HEITMANN, U.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M. Determination of non-metals *via* molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 11, p. 1314-1320, 2006.
- [14] RESANO, M.; BRICEÑO, J.; BELARRA, M. A. Direct determination in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer: comparasion of atomic and molecular absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 10, p. 1343–1354 , 2009.
- [15] BECHLIN, M. A.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis. **Microchemical Journal**, v. 109, n. 5, p.134 - 138, 2013.
- [16] GORMLEY, J. J. Brewer's yeast and lecithin two underrated health promoters. **Better Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 32, 1997.
- [17] NIEUWENHUYZEN, W. V.; The changing world of lecithins. **International News on Fats, Oils, and Related Materials**, v. 25, n. 4, p. 193-272, 2014.
- [18] SILVEIRA, E. L. C. **Desenvolvimento de novas propostas para análise de biodiesel e estudo da relação entre ponto de fulgor e o teor de álcool residual**. 2012. 218 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- [19] BASSO, R. C.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; VIOTTO, L. A. Degumming and production of soy lecithin, and the cleaning of a ceramic membrane used in the ultrafiltration and diafiltration of crude soybean oil. **Journal of Membrane Science**, v. 330, n. 1, p. 127–134, 2009.
- [20] MOUNTS, T. L. Processing of Soybean Oil for Food Uses. **Cereal Foods World** v. 34, n. 3, p. 268-272,1989.
- [21] RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2–15, 2013.
- [22] SZUHAI, B. F. Lecithins. In: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. sixth edition. Edited por Fereidoon Shahidi, 2005, cap. 13, v. 6, n. 9, p. 361–456.
- [23] GAN, L. J.; WANG, X.; YANG, D.; ZHANG, H.; SHIN, J.; HONG, S.; PARK, S. H.; LEE, K. Emulsifying properties of lecithin containing different fatty acids obtained

by immobilized lecithase ultra-catalyzed reaction. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 91, n. 4, p. 579–590, 2014.

[24] MACHADO, A. R.; ASSIS, L. M.; MACHADO, M. I. R.; SOUZA-SOARES, L. A. Importance of lecithin for encapsulation processes. **African Journal of Food Science**, v. 8, n. 4, p. 176-182, 2014.

[25] CASTEJON, L. V. **Estudo da clarificação da lecitina de soja**. 2010 p. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

[26] VISSOTTO, F. Z.; MONTENEGRO, F. M.; SANTOS, J. M.; OLIVEIRA, S. J. R. Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 666–671, 2006.

[27] FERNANDES, G. D.; ALBERICI, R. M.; PEREIRA, G. G.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N.; BARRERA-ARELLANO, D. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1855–1860, 2012.

[28] 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.

[29] KULIGOWSKI, J.; QUINTÁS, G.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares - Fourier transform infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 77, n. 1, p. 229–234, 2008.

[30] STROPPIA, V. L. Z. **Influência de lecitina e PGPR no processo de microestruturação de chocolate amargo**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

[31] MILLER, D. L. Health benefits of lecithin and choline. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 47, n. 5, p. 178-184, 2002.

[32] STRAYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

[33] YONGZHI, J.; SANG, K. N.; SUNG, I. K. Egg phosphatidylcholine decreases the lymphatic absorption of cholesterol in rats. **The Journal of Nutrition**, v.131, n. 9, p. 2358-2363, 2001.

[34] SPIERS, P. A.; MYERS, D.; HOCHANADEL, G. S.; LIEBERMAN, H. R.; WURTMAN, R. J. Citicoline improves verbal memory in aging. **Archives of Neurology**, v. 53, n.1, p. 441–448, 1996.

- [35] LYRA, A. O. P. **Concentração de proteínas totais, uréia, cálcio e fósforo em saliva total estimulada de dependentes químicos em desintoxicação**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Pós- Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- [36] OLIVEIRA, T. C. Fósforo: função, metabolismo e recomendações. **Revista Digital de Nutrição**, v. 1, n. 1, p. 1-24, 2007.
- [37] CURTIUS, A. J. Determinação de fósforo em aços por espectrometria de absorção atômica no forno de grafite. **Química nova**, v. 21, n. 3, p. 253-258, 1998.
- [38] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of phosphorus by molecular absorption of phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 338-345, 2006.
- [39] LEPRI, F. G. DESSUY, M. B.; VALE, M. G. R. ; BORGES, D. L. G. ; WELZ, B. ; HEITMANN, U. Investigation of chemical modifiers for phosphorus in a graphite furnace using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 8, p. 934-944, 2006.
- [40] CURTIUS, A. J.; SCHLEMMER, G.; WELZ, B. Determination of phosphorus by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Part 1. Determination in the absence of a modifier. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 1, n. 6, p. 421-427, 1986.
- [41] EDIGER, R. D.; KNOTT, A. R.; PETERSON, G. E.; BEATY, R. D.; The determination of phosphorus by atomic absorption using the graphite furnace. **Atomic Absorption Newsletter**, v. 17, n. 1 p. 28-32, 1978.
- [42] LYRA, F. H.; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, G. P.; PESSOA, H. M.; CASTRO, E. V. R. Direct determination of phosphorus in biodiesel samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a solid sampling accessory. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 24, n. 9, p.1262 -1266, 2009.
- [43] LEPRI, F. G. **Investigações sobre a determinação de enxofre em materiais biológicos, estabilização, atomização e correção de fundo baseada no Efeito Zeeman para o fósforo e determinação de elementos traço em carvão utilizando espectrometria de absorção atômica e molecular de alta resolução com fonte contínua**. 2009. 13 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- [44] KNAUTHE, B.; OTTO, M. Nonmetals in the argon-inductively coupled plasma-optical emission spectrometry: I. Phosphorus, sulfur and carbon. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 371, n. 8, p. 1052-1056, 2001.

- [45] SANTOS, E. J.; HERRMANN, A. B.; CHAVES, E. S.; VECHIATTO, W. W. D.; SCHOEMBERGER, A. C.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry with internal standardization after multivariate optimization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 22, n.10, p.1300-1303, 2007.
- [46] DRGLIN, T. Determination of phosphorus in steel using inductively coupled plasma atomic emission. **Materiali in Tehnologije**, v. 39, n. 4, p. 119-123, 2005.
- [47] RESANO, M.; BELARRA, M. A.; CASTILLO, J. R.; VANHAECKE, F. Direct determination of phosphorus in two different plastic materials (PET and PP) by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, n. 10, p. 1383–1388, 2000.
- [48] LEPRI, F. G.; WELZ, B. ; DESSUY, M. B. ; VALE, M. G. R. ; BOHRER, D. ; LOOS-VOLLEBREGT, M. T.C. ; HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H. Investigation of the feasibility to use Zeeman-effect background correction for the graphite furnace determination of phosphorus using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry as a diagnostic tool. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 1, p. 24–32, 2010.
- [49] STURGEON, R. E. ; WILLIE, S. N. Excitation and detection of molecular species with furnace atomization plasma emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 7, n. 2, p. 339-342, 1992.
- [50] CURTIUS, A. J.; SCHLEMMER, G.; WELZ, B. Determination of phosphorus by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Part 2. Comparison of Different Modifierst. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 2, n. 6, p. 115 –124, 1987.
- [51] COSKUN, N.; AKMAN, S. Direct determination of phosphorus in different food samples by means of solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry using Pd+Ca chemical modifier. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 3, p. 415–419, 2005.
- [52] LÓPEZ-GARCÍA, I. Fast determination of phosphorus in honey, milk and infant formulas by electrothermal atomic absorption spectrometry using a slurry sampling procedure. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 1, p. 48–55, 2007.
- [53] HERNÁNDEZ, E.; ALVARADO, J.; ARENAS, F.; VÉLEZ, M. Thermal stabilisation of phosphorus during electrothermal atomic absorption spectrometry using sodium fluoride as chemical modifier. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, n. 12, p. 1391–1396, 1997.
- [54] WELZ, B.; BORGES, D. L. G.; LEPRI, F. G.; VALE, M. G. R.; HEITMANN, U. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - An analytical and diagnostic tool for trace analysis. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 873–883, 2007.

- [55] RESANO, M.; FLORÉZ, M. R. Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 3, p. 401-412, 2012.
- [56] HUGHES, D. M.; GRÉGOIRE, D. C.; HIROHITO, N.; CHAKRABARTI, C. L. The vaporization of phosphorus compounds and the use of chemical modifiers for the determination of phosphorus by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 52, n. 4, p. 517-529, 1997.
- [57] BORGES, D. L. G.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 1, n. 18, p. 58-67, 2005.
- [58] WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R. High-Resolution Continuum-source Atomic Absorption Spectrometry – What Can We Expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 220-229, 2003.
- [59] WELZ, B. High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 1, p. 69-71, 2005.
- [60] BECHLIN, M. A. **Determinação de boro, enxofre e fósforo em plantas medicinais por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua**. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de Araraquara- Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- [61] DESSUY, B. M.; VALE, M. G. R.; LEPRI, F. G. ; WELZ, B. ; HEITMANN, U. Investigation of phosphorus atomization using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 5, p. 429-434, 2007.
- [62] DESSUY, M. B.; VALE, M. G. R.; LEPRI, F. G. ; BORGES, D. L.G. ; WELZ, B. ; SILVA, M. M. ; HEITMANN, U. Investigation of artifacts caused by deuterium background correction in the determination of phosphorus by electrothermal atomization using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 2, p. 337-348, 2008.
- [63] BUTCHER, D. J. Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 1-15, 2013.
- [64] PEREIRA, E. R.; CASTILHO, I. N. B.; WELZ, B.; GOIS, J. S. ; BORGES, D. L. G. ; CARASEK, E.; ANDRADE, J. B. Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 96, p. 33-39, 2014.

- [65] CAMPOS, R. C., CORREIA, C. L. T. ; VIEIRA, F. ; SAINT'PIERRE, T. D. ; OLIVEIRA, A. C.; GONÇALVES, R. Direct determination of P in biodiesel by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B- Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 352–355, 2011.
- [66] RESANO, M.; RELLO, L.; FLÓREZ, M.; BELARRA, M. A. On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 321-328, 2011.
- [67] HEITMANN, U.; WELZ, B.; BORGES, D. L. G.; LEPRI, F. G. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 11, p. 1222–1230, 2007.
- [68] RESANO, M.; GARCÍA-RUIZ, E. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 1, p. 323–330, 2011.
- [69] RESANO, M.; FLÓREZ, M. R.; GARCÍA-RUIZ, E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 88, n. 13, p. 85–97, 2013.
- [70] LIMA, A. S. **Estratégias analíticas para determinação de contaminantes inorgânicos em amostras de biodiesel**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.
- [71] KORN, M. G. A.; SANTOS, D. C. M. B.; GUIDA, M. A. B.; BARBOSA, I. S.; PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F.; LIMA, J. L. F. C. Evaluation of Digestion Procedures for Simultaneous Determination of Ca, P, Mg, K and Na in Biodiesel by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2278-2284, 2010.
- [72] AMORIM, F. A. C.; WELZ, B.; COSTA, A. C. S.; LEPRI, F. G.; VALE, M. G. R.; FERREIRA, S. L. C. Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 349–359, 2007.
- [73] VALE, M. G. R.; DAMIN, I. C. F.; KLASSEN, A.; SILVA, M. M.; WELZ, B.; SILVA, A. F.; LEPRI, F. G.; BORGES, D. L. G.; HEITMANN, U. Method development for the determination of nickel in petroleum using line-source and high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 77, n. 2, p. 131–140, 2004.
- [74] SOUZA, R. M. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de elementos-traço em amostras oleosas e pastosas por ICP OES e ICP-MS**. 2007. 184 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

[75] MARTÍN-POLVILLO, M.; ALBI, T.; GUINDA, A. Determination of trace elements in edible vegetable oils by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 4, p. 347–353, 1994.

[76] GONZALEZ, M. C.; RODRIGUEZ, A. R.; GONZALEZ, V. Determination of Vanadium, Nickel, Iron, Copper, and Lead in Petroleum Fractions by Atomic Absorption Spectrophotometry with a Graphite Furnace. **Microchemical Journal**, v. 35, n. 1, p. 94-106, 1987.

[77] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. The influence of calcium and magnesium on the phosphorus monoxide molecular absorption signal in the determination of phosphorus using a continuum source absorption spectrometer and an air–acetylene flame. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 3, p.346-349, 2006.

[78] DESSUY, B. M. **Investigação do comportamento de modificadores químicos para fósforo em forno de grafite usando espectrometria de absorção atômica de linha de fonte contínua de alta resolução**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

[79] ERICKSON, D. R. Degumming and Lecithin Processing and Utilization. In: **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. Ed. ERICKSON, D. R. American Soybean Association, St. Louis, Missouri and American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, p.174-183, 1995.

[80] LIST, G. R.; HEAKIN, A. J.; EVANS, C. D.; BLACK, L. T.; MOUNTS, T. L. Factor for converting elemental phosphorus to acetone insolubles in crude soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 6, p. 511-522, 1978.

[81] WEIHRAUCH, J. L.; SON, Y. S. Phospholipid content of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 12, p. 1971–1978, 1983.

[82] HURST, W. J.; MARTIN, R. A. The analysis of phospholipids in soy lecithin by HPLC. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 9, p. 1462–1463, 1984.

[83] NIEUWENHUYZEN, W. V.; TOMÁS, M. C. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, n. 5, p. 472-486, 2008.