

CARACTERIZAÇÃO DA PUREZA DE FOSFATIDILCOLINA DA SOJA ATRAVÉS DE RMN DE ^1H E DE ^{31}P

Omar Mertins, Marcelo Sebben, Paulo Henrique Schneider, Adriana Raffin Pohlmann e Nádyá Pesce da Silveira*
Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970 Porto Alegre - RS, Brasil

Recebido em 31/7/07; aceito em 29/2/08; publicado na web em 22/9/08

CHARACTERIZATION OF SOYBEAN PHOSPHATIDYLCHOLINE PURITY BY ^1H AND ^{31}P NMR. A strategy is proposed to evaluate the purity of phosphatidylcholine from soybean lecithin, obtained by extraction or column chromatography, using the integrals ratio of ^1H NMR spectra. Integrals of methylene signals, around 1.3 and 1.6 ppm, are added and divided by the integral of the choline methyl groups, around 3.3 ppm. Before purification, a ratio of 19.68 ± 1.37 was determined. Using extraction, a ratio of 10.70 ± 0.61 was found, while from column chromatography, a value of 2.99 ± 0.25 was detected. ^{31}P NMR of standard phosphatidylcholine showed signals at -0.2 and -0.9 ppm, whereas the purified one showed a single signal at -0.9 ppm.

Keywords: NMR; phosphatidylcholine; purity determination.

INTRODUÇÃO

A fosfatidilcolina (FC) consiste de uma mistura de fosfolipídeos naturais constituídos por uma extremidade polar formada por um grupo colina e um grupo fosfato ligados à porção hidrofóbica, duas longas cadeias acílicas de 16 a 22 carbonos, por ligações ésteres com o glicerol (Figura 1). As cadeias acílicas podem conter uma ou mais insaturações. Devido à estrutura polar-apolar, ou seja, anfifílica, essas moléculas tendem a se auto-organizar em bicamadas com importantes funções biológicas, como por exemplo, as membranas celulares de organismos vivos. Imitando a natureza, cientistas vêm estudando as características de membranas utilizando FC, no intuito de desenvolver novos sistemas para as mais diversas áreas, em especial nas ciências farmacêuticas e na biomedicina.¹⁻¹⁰ Atualmente a FC é largamente empregada nas indústrias farmacêutica e cosmética como emulsificante, excipiente e na produção de lipossomas, bem como nas indústrias alimentícias e de tintas como estabilizante e emulsificante.¹¹⁻¹⁴

A FC tem sido purificada a partir de fontes naturais abundantes, como a gema de ovo.¹⁴ Com o advento do processamento industrial da soja para a produção de óleo, os resíduos de óleo denominados lecitina, considerados anteriormente como rejeitos, são uma fonte rica e barata de fosfolipídeos.¹³ A lecitina de soja contém, além da FC, outros fosfolipídeos importantes, como a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol, porém para determinadas aplicações esses produtos requerem graus de pureza específicos. Com esta preocupação, uma grande variedade de métodos de purificação da lecitina de soja foram desenvolvidos nas últimas décadas, originando muitas patentes e publicações.¹³⁻²³

Apesar da extensa literatura para processos de purificação, poucos trabalhos abordam a caracterização da FC através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Surpreendentemente, apenas alguns trabalhos são encontrados, os quais descrevem o uso de RMN de ^{31}P para a identificação de fosfolipídeos presentes nas membranas do cérebro humano e em anêmonas do mar.^{24,25}

O objetivo deste trabalho é apresentar uma metodologia para a avaliação do grau de pureza da FC da lecitina de soja, empregando a espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{31}P . Dois métodos de purificação foram empregados. O primeiro, um processo de extração, foi empregado para eliminar os ácidos graxos da lecitina de soja bruta.^{26,27}

O outro foi baseado no isolamento da FC através de cromatografia em coluna (CC).^{16,27} Ambos os processos são de custo satisfatório e possíveis de serem procedidos em escala laboratorial e industrial.

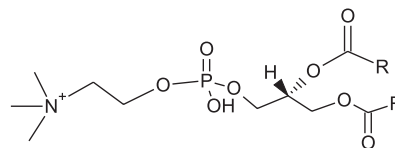


Figura 1. Estrutura molecular da fosfatidilcolina (FC). R representa longa cadeia hidrocarbonada que pode conter insaturações

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras de lecitina de soja bruta e FC de alta pureza foram gentilmente fornecidas pela indústria Solae do Brasil S. A. Para a execução dos experimentos as amostras foram abertas e mantidas sob atmosfera de argônio e temperatura de -14 °C.

Purificação da lecitina de soja bruta por extração

A lecitina de soja bruta (10 g) foi dissolvida em 50 mL de acetato de etila (Merck®). Em seguida, lentamente e sob agitação, foram adicionados 2 mL de água destilada, ocorrendo a formação de duas fases. O sobrenadante foi separado da fase inferior e descartado. A fase inferior, com aspecto de gel, foi dispersa em 30 mL de acetona (Nuclear®), formando aglomerados que foram triturados utilizando-se um bastão de vidro. A seguir, a acetona foi separada por decantação e uma nova porção de 30 mL de acetona foi adicionada, repetindo-se o processo de trituração. O precipitado foi filtrado sob vácuo e seco em dessecador, fornecendo uma massa de 6,3 g. A amostra foi designada FC-1.

Purificação da lecitina de soja bruta por coluna cromatográfica

Uma massa de 70 g de sílica gel (Macherey-Nagel® 70-230 mesh) foi compactada com uma mistura de clorofórmio (Merck®), metanol (Synth®) e água (MilliQ®) (6,5:2,5:0,4)^{16,27} em uma coluna cromatográfica.

*e-mail: nadya@iq.ufrgs.br

tográfica de 65 cm de altura e 2,6 cm de diâmetro dotada de filtro de vidro sinterizado. A lecitina de soja bruta (7 g) foi dissolvida em clorofórmio e eluída com clorofórmio, metanol e água (6,5:2,5:0,4). As frações contendo a FC purificada, analisadas através de cromatografia em camada delgada, empregando-se o mesmo eluente, foram misturadas em balão de vidro. Sob agitação, adicionou-se sulfato de cálcio anidro (Merck®) para secagem da solução. Em seguida a mistura foi filtrada e os solventes foram evaporados sob pressão reduzida. A FC formou um filme fino na superfície interna do balão fornecendo uma massa de 0,98 g, correspondendo a um rendimento de 14%. A amostra foi designada FC-2.

Todos os procedimentos de purificação foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se o mesmo eluente da CC e placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®). As placas foram reveladas em atmosfera saturada de iodo. A FC de alta pureza fornecida pela indústria serviu como padrão de comparação, sendo designada FC-padrão.

Análise por espectroscopia de RMN

Para a obtenção dos espectros de RMN, amostras de lecitina de soja bruta, FC-padrão, FC-1 e FC-2 foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (Aldrich®). As amostras FC-1 e FC-2 foram preparadas no mesmo dia das análises de RMN.

Espectros de RMN de ^1H e de ^{31}P foram obtidos em equipamento Inova-300 (Varian 300 MHz) dissolvendo-se 40 mg de cada amostra em 1 mL de CDCl_3 . Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna para ^1H e trifetilfosfato como padrão externo para ^{31}P . As amostras foram analisadas em triplicata a 20 °C. Nas análises de RMN de ^1H utilizou-se um pulso de 6,85 us correspondendo a um ângulo de 45°, com um tempo de espera entre a aquisição dos FIDs de 1,359 s, tempo de aquisição de 3,641 s, largura espectral de 4499,4 Hz. Foram efetuadas 128 repetições em 10 min e 41 s. Já para as análises de RMN de ^{31}P , os espectros foram observados a 121,42 MHz, o pulso utilizado foi de 16,0 us a 45° com um tempo de aquisição de 1,600 s, largura espectral de 15000,9 Hz com 128 repetições em 3 min e 25 s.

O pico correspondente aos hidrogênios das metilas da porção colina foi usado para o cálculo de relação de pureza das amostras, pela comparação das razões de integração dos sinais dos hidrogênios metilênicos da porção alifática (1,3 e 1,6 ppm, identificados como 1 e 2, englobando-se as faixas de 1,170 a 1,450 ppm e de 1,451 a 1,780 ppm, respectivamente) dividida pela integração do sinal dos hidrogênios metilênicos da colina (3,3 ppm, identificado como 3, englobando-se a faixa de 3,180 a 3,410 ppm) como esquematizado na Equação 1:

$$\frac{1+2}{3} = \text{razão de integração} \quad (1)$$

Os valores dos tempos de relaxação (T1) obtidos para os hidrogênios empregados nas médias foram iguais ou menores que 0,85 s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 representa a placa de CCD obtida pela eluição das amostras. A CCD da lecitina de soja bruta (Figura 2a) indica a presença de pelo menos oito componentes diferentes. O processo de extração da lecitina de soja bruta permitiu a eliminação de ácidos graxos (Figura 2b), fornecendo assim uma lecitina com maior teor de fosfolípídeos em comparação com a lecitina bruta.

A massa de 0,98 g obtida na purificação da FC por CC corresponde a um rendimento de 14% (m/m), de acordo com o teor de FC

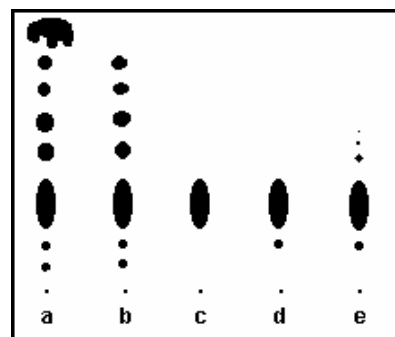


Figura 2. Representação para CCD de lecitina de soja bruta (a), FC-1 (b), FC-2 (c), FC-padrão (d) e FC-2 após 7 dias de armazenagem (e). $R_f=0,21$ para a mancha maior correspondente à fosfatidilcolina

normalmente presente na lecitina de soja bruta (10 a 20%).^{28,29} O acompanhamento da CC pela CCD permitiu o monitoramento dos processos de purificação. A Figura 2c representa a placa obtida após a purificação através da CC produzindo-se a amostra FC-2, conforme resultados anteriormente descritos na literatura.^{19,21,30} A Figura 2d representa a eluição de FC-padrão, a qual apresentou indícios de degradação. A Figura 2e representa a placa de CCD da amostra purificada em nosso laboratório (FC-2), que foi mantida em solução de clorofórmio, sob atmosfera de argônio, ao abrigo da luz e temperatura baixa (-14 °C), 7 dias após a purificação.

Além da CCD, as amostras foram caracterizadas por RMN de ^1H . A Figura 3 apresenta os espectros obtidos para as amostras de FC-1, FC-2 e FC-padrão. Os picos em torno de 3,3 ppm (sinal 3, Figura 3b) correspondem aos hidrogênios das metilas da porção colina. Os picos entre 1,3 e 1,6 ppm (sinais 1 e 2, Figura 3b) correspondem às metilenas das cadeias de ácidos graxos, esterificadas com o glicerol. A relação entre as integrações desses sinais 1+2 e 3 (Equação 1) forneceu as razões de integração descritas na Tabela 1.

Os resultados da Tabela 1 mostram que ocorre uma diminuição da razão de integração em função do aumento da concentração de FC nas amostras, ou seja, o aumento da sua pureza. Os valores encontrados indicam que a lecitina de soja obtida por extração apresentou um grau de pureza de FC superior ao da lecitina de soja bruta e a FC-2 apresentou um grau de pureza superior ao da FC-padrão. Além disso, comparando os espectros da Figura 3, é possível observar que o pico em torno de 3,3 ppm sofre uma sensível redução na amostra FC-1 (a), enquanto que para a FC-padrão (c) um pico em torno de 3,9 ppm aparece com uma intensidade alta em relação aos outros dois espectros.

Com o objetivo de verificar a influência do grau de hidratação nos resultados, procedeu-se a um experimento de hidratação da amostra FC-padrão, adicionando-se quantidades crescentes de água até 8% em massa. Foram obtidos os espectros de RMN de ^1H para as amostras em triplicatas independentes nas mesmas condições. Os resultados obtidos para o cálculo da relação de pureza foram submetidos ao cálculo estatístico pelo método ANOVA (SigmaStat for Windows version 3.5) para avaliação da significância da variação do resultado entre as amostras de diferentes graus de hidratação e em relação à amostra não hidratada. O resultado mostrou que não houve diferença significativa para um nível de significância de alfa = 0,05, pois $P = 0,099$, ou seja, $P > 0,05$.

Com o objetivo de verificar a presença de lisofosfatidilcolina nas amostras FC-2 e FC-padrão, os espectros de RMN de ^{31}P (Figuras 4a e 4b) foram obtidos. Os espectros mostram a presença do grupo fosfato da FC na região de -0,9 ppm, em concordância com espectros da literatura obtidos nas mesmas condições.^{24,25} O pico com deslocamento químico de -0,2 ppm observado na amostra FC-padrão corresponde ao grupo fosfato da lisofosfatidilcolina, segundo a literatura,^{24,25}

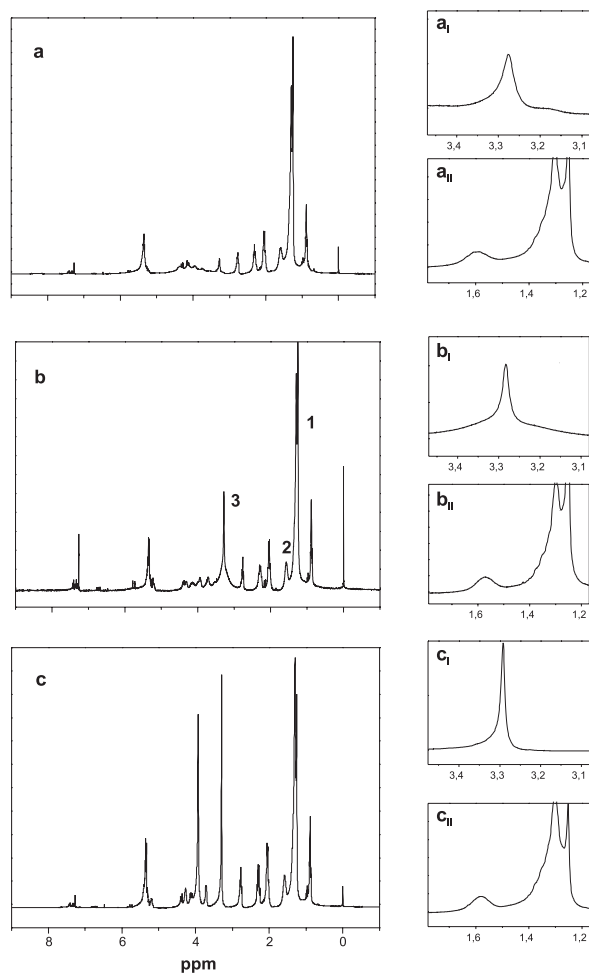


Figura 3. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm, padrão interno TMS) com as respectivas expansões das regiões de integração (3,180 a 3,410 ppm, acima e 1,170 a 1,450 ppm e 1,451 a 1,780 ppm, abaixo) da FC-1 (a), FC-2 (b) e FC-padrão (c)

Tabela 1. Relação de pureza obtida por RMN de ^1H

Amostra	Razão de integração
Lecitina de soja bruta*	$19,68 \pm 1,37$
FC-1	$10,70 \pm 0,61$
FC-padrão*	$4,42 \pm 0,11$
FC-2	$2,99 \pm 0,25$

*Solae do Brasil S.A.

indicando que este é o primeiro produto de degradação. Na Figura 4a verifica-se que a amostra FC-2 não apresenta pico em -0,2 ppm, podendo-se concluir que a purificação através de CC foi obtida com sucesso e que a razão igual a $2,99 \pm 0,25$ (RMN de ^1H) corresponde à FC de alta pureza (superior a 95%).

CONCLUSÕES

Os processos de purificação empregados neste trabalho propiciaram a obtenção de fosfatidilcolina de baixa e alta pureza para poder-se avaliar o método de RMN de ^1H proposto. A análise das razões de integração mostrou-se adequada para a avaliação da relação de pureza das amostras de lecitina e de fosfatidilcolina. A razão de integração igual a $2,99 \pm 0,25$, calculada a partir dos dados de RMN de ^1H para a amostra purificada (FC-2), corresponde a um produto de pureza

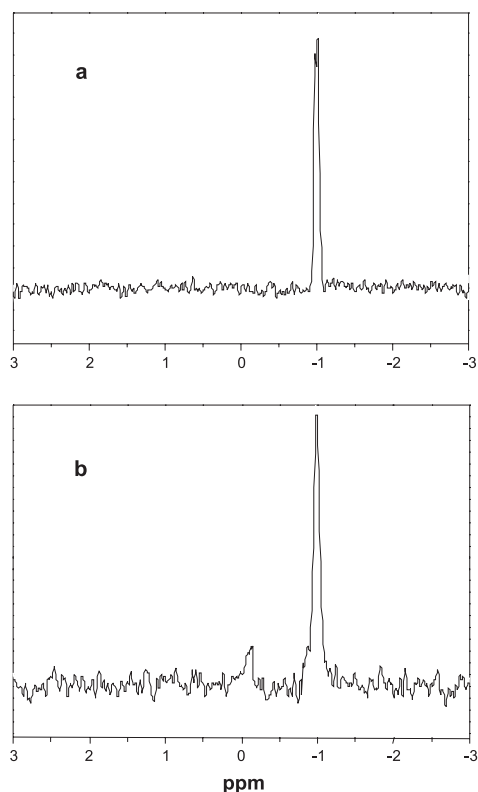


Figura 4. Espectros de RMN de ^{31}P (CDCl_3 , 121,42 MHz, ppm, padrão externo trifetilfosfato) de FC-2 (a) e FC-padrão (b)

superior ao da amostra padrão (FC-padrão) fornecida pela indústria, cuja razão foi de $4,42 \pm 0,11$. A análise por RMN de ^{31}P confirmou que a amostra purificada (FC-2) era composta por fosfatidilcolina de grau de pureza maior do que a amostra padrão pela presença de um único pico em torno de -0,9 ppm, enquanto que a amostra padrão apresentou um sinal em torno de -0,2 ppm.

AGRADECIMENTOS

À Solae do Brasil S.A., ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasília/Brasil), à Rede Nanocosméticos (MCT/CNPq) e à cooperação CAPES/COFECUB (411/03) pelo apoio financeiro. Ao Dr. V. U. Costa pela obtenção dos espectros de RMN de ^{31}P , ao Dr. F. Rodembusch pelos auxílios no tratamento dos espectros e à Ms. F. S. Poletto pela avaliação estatística. O. Mertins agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq pelas bolsas de mestrado e doutorado e M. Sebben agradece à UFRGS/PIBIC/CNPq pela bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- Caracciolo, G.; Marchini, C.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Amenitsch, H.; Montani, M.; Amici, A.; *Langmuir* **2007**, *23*, 4498.
- Zhou, Y.; Raphael, R. M.; *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2451.
- Mertins, O.; Cardoso, M. B.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 2425.
- Jemiola-Rzeminska, M.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Strzalka, K.; *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *135*, 27.
- Abrunhosa, F.; Faria, S.; Gomes, P.; Tomaz, I.; Pessoa, J. C.; Andreu, D.; Bastos, M.; *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 17311.

6. Frézard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 511.
7. Naumowicz, M.; Figaszewski, Z. A.; *Biophys. J.* **2005**, 89, 3174.
8. Petelska, A. D.; Naumowicz, M.; Figaszewski, Z. A.; *Colloids Surf. B* **2005**, 44, 158.
9. Ferreira, M.; Caetano, W.; Itri, R.; Tabak, M.; Oliveira Jr., O. N.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 502.
10. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P.; *Chem. Phys. Lipids* **2005**, 138, 29.
11. Maron, L. B.; Covas, C. P.; Silveira, N. P.; Pohlmann, A.; Mertins, O.; Tatsuo, L. N.; Sant'anna, O. A. B.; Moro, A. M.; Takata, C. S.; Araujo, P. S.; Costa, M. H. B.; *J. Liposome Res.* **2007**, 17, 155.
12. Charrois, G. L. R.; Allen, T. M.; *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2004**, 1663, 167.
13. Zhang, W.; He, H.; Feng, Y.; Da, S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 798, 323.
14. Shah, A.; Akoh, C. C.; Toledo, R. T.; Corredig, M.; *J. Supercrit. Fluids* **2004**, 30, 303.
15. Kikuo, S.; Yousuke, I.; Yutaka, M.; *JP60197696* **1985**.
16. Roger, B.; *FR2614621* **1988**.
17. Shigehiko, Y.; *JP63112589* **1988**.
18. Kearns, J. J.; Tremblay, P. A.; *US5084215* **1992**.
19. Singleton, W. S.; Gray, M. S.; Brown, M. L.; White, J. L.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1965**, 42, 53.
20. Fager, R. S.; Shapiro, S.; Litman, B. J.; *J. Lipid Res.* **1977**, 18, 704.
21. Primes, K. J.; Sanches, R. A.; Metzner, E. K.; Patel, K. M.; *J. Chromatogr.* **1982**, 236, 519.
22. Abidi, S. L.; Mounts, T. L.; Rennick, K. A.; *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, 17, 3705.
23. Zhang, W. N.; He, H. B.; Feng, Y. Q.; Da, S. L.; *J. Chromatogr., A* **2004**, 1036, 145.
24. Merchant, T. E.; Ven, L. T. M.; Minsky, B. D.; Diamantis, P. M.; Delapaz, R.; Galicich, J.; Glonek, T.; *Brain Res.* **1994**, 649, 1.
25. Meneses, P.; Navaro, N.; *Comp. Biochem. Physiol.* **1992**, 102B, 403.
26. *GB413714* **1934**.
27. Mertins, O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2004.
28. Yung, H. C.; Jenn, J. S.; *Aquaculture* **1991**, 96, 167.
29. Rioux, F.; Perea, A.; Yousef, I. M.; Lévy, E.; Malli, L.; Carillo, M. C.; Tuchweber, B.; *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1214, 193.
30. Scartazzini, R.; Luisi, P. L.; *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 829.