

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

EXTRAÇÃO DO COLESTEROL DA GEMA DESIDRATADA

Parcer

*Este exemplar corresponde a edição final  
da tese defendida por Soraia Vilela Borges  
e aprovada pela Comissão Julgadora em 12.05.95*

SORAIA VILELA BORGES

Engenheira Química, FAENQUIL, 1985

Mestre em Ciência dos Alimentos, ESAL, 1988

*Enny Martucci*

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ENNY THEREZINHA MARTUCCI

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia  
de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Doutor  
em Engenharia de Alimentos

CAMPINAS

1995



8c

UNICAMP  
B644E

24812  
433/95

x  
R\$ 11,00  
08/06/95

CM-00070692-0

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

B732e

Borges, Soraia Vilela

Extração do colesterol da gema desidratada / Soraia Vilela Borges.  
-- Campinas, SP : [s.n], 1995.

Orientador: Enny Therezinha Martucci.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Engenharia de Alimentos.

I. Colesterol. 2.\* Colesterol - Extração. 3. \*Gema de Ovo. I.  
Martucci, Enny Therezinha. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

*Enny Therezinha Martucci*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ENNY THEREZINHA MARTUCCI (ORIENTADORA)

*Elbas*

Prof. Dr. ELIAS BASILE TAMBOURGI

*Suplente*

Prof. Dr. ENRIQUE ORTEGA RODRIGUEZ

*Suplente*

Prof. Dr. FERNANDO A. CABRAL

*Maria Angela A. Meireles*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MARIA ANGELA A. MEIRELES

*Maria Aparecida A. P. da Silva*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MARIA APARECIDA A. P. DA SILVA

*Ronei Poppi*

Prof. Dr. RONEI POPPI

Campinas, 12 de maio de 1995

A Deus

pela proteção e por seu Divino amor,  
CONSAGRO este trabalho.

A meus pais Antônio e Geruza  
A meus irmãos Sandra, Vanda, Vanessa, Antônio  
Eustáquio e Wellington  
pelo amor e força constantes  
Carinhosamente,

DEDICO

A prof. Dr. Carlos Alberto Gasparetto  
pelo apoio, amizade e incentivo  
Com gratidão e amizade,

OFEREÇO

"Esperança...

Sonho possível

Caminho provável

No coração que crê."

*(Michel Quoist)*

As grandes alegrias estão nos  
pequenos gestos de AMOR e de  
FRATERNIDADE.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por Sua proteção, pela fé e persistência, pela família e pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos meus queridos pais e irmãos pelo amor e apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos, que graças a Deus são muitos, pelo carinho, solidariedade e principalmente pela alegria que dão à minha vida.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso de doutoramento.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que viabilizou este projeto.

À prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Enny Therezinha Martucci pela valiosa amizade, apoio e orientação.

Ao prof. Dr. Edward Roy Bruns pela grande contribuição no planejamento experimental que facilitou a execução deste trabalho.

Aos professores Dr<sup>ª</sup> Maria Ângela A. Meireles e Dr. Fernando A. Cabral pelas valiosas discussões e demais auxílios que enriqueceram esta pesquisa.

À prof. Dr<sup>ª</sup> Maria Aparecida A. P. da Silva pelas instruções nas análises sensoriais.

Aos membros da banca examinadora pelas proveitosas sugestões.

À Neura Bragagnolo e profa. Dr<sup>ª</sup> Helena Godoy pelo valioso auxílio na análise do colesterol.

Aos técnicos de diversos laboratórios: Fátima (Fifa), Márcio, Ari, Jane, Judith, Quirino e respectivos professores responsáveis, pela colaboração imprescindível na realização de

vários testes laboratoriais.

À Carmem e Ângela pelo auxílio nos testes laboratoriais.

À D. Isaura pelo carinho, amizade e manutenção da limpeza do laboratório de Medidas Físicas.

Ao Antônio Henrique, Miro e Fátima pelos serviços computacionais.

A todos os funcionários e colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos e FEAGRI pelos favores prestados e agradável convívio.

Ao Prof. João Biagi, pela compreensão na fase final deste trabalho.

Ao Jonas pelo xerox algumas vezes "pendurado".

A todas as pessoas que indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
NOMENCLATURA.....	iii
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
1- OBJETIVOS.....	1
2- INTRODUÇÃO.....	2
3- REVISÃO DE LITERATURA	
3.1- GEMA	
3.1.1- Composição química.....	4
3.1.2- Colesterol.....	6
3.1.3- Propriedade emulsificante.....	8
3.2- SELEÇÃO DO SOLVENTE.....	9
3.2.1- Solubilidade dos lipídeos em acetona e propriedades do solvente.....	10
3.3- EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO.....	10
3.3.1- Parâmetros que influenciam o processo de extração.....	11
3.3.2- Métodos de cálculo.....	12
3.3.2.1- Balanço de massa.....	16
3.3.3- Aplicação da extração sólido-líquido para o colesterol.....	21
4- MATERIAL E MÉTODOS	
4.1- Matéria prima.....	23
4.2- Equipamentos.....	23
4.3- Reagentes.....	24
4.4- Esquemas de extração.....	24
4.5- Planejamento para otimização por superfície de resposta.....	25
4.6- Estudos de equilíbrio.....	30
4.7- Influência da extração sobre as respostas: colesterol	



e fosfolipídeos extraídos e propriedade emulsificante.....	31
4.8- Análises químicas.....	32
4.9- Propriedade emulsificante.....	33
4.10- Análise sensorial.....	33
4.11- Análises estatísticas.....	36
5- RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	38
6- CONCLUSÕES.....	68
7- SUGESTÕES.....	70
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICE	
A-1- Curva padrão do colesterol.....	77
A-2- Curva padrão dos fosfolipídeos.....	78
A-3- Cálculo do fator do fósforo.....	79
B-1- Método de cálculo para desvio padrão e erro padrão do efeito para o experimento fatorial.....	81
B-2- Método de cálculo do erro padrão do efeito para cada termo da equação de ajuste para contorno e superfície de resposta.....	82
B-3- Programa SAS de regressão não linear para ajuste da equação para construção do contorno e superfície de resposta.....	83
C-1- Dados experimentais de equilíbrio "prático" a 25°C, 15 min e 100rpm.....	84
C-2- Programa SAS de análise de variância e teste TUKEY par $N \times y_n$ e resultados.....	85
C-3- Programa SAS de regressão linear para $X_n \times Y_n$ .....	85
C-4- Programa SAS de regressão não linear para $Y_c \times Y_{sr}$ e resultados.....	86
D- Programa BASIC para simulação de sistema de extração contracorrente.....	87
E- Programa SAS para avaliação das respostas: colesterol e fosfolipídeos extraídos e estabilidade da emulsão.....	89
F- Programa SAS para análise de variância e teste de TUKEY dos resultados da análise sensorial.....	90

## LISTA DE FIGURAS

1-	Estrutura do colesterol.....	7
2a-	Cinética de extração para óleo de café com hexano em várias temperaturas.....	13
2b-	Cinética de extração para óleo de café com hexano em em diferentes proporções sólido/solvente.....	14
3-	Representação esquemática de uma operação de separação em único estágio.....	15
4-	Diagrama de solubilidade.....	19
5-	Curva de distribuição.....	20
6-	Ficha modelo para análise da preferência.....	34
7-	Ficha modelo para análise da aparência.....	35
8a-	Linhas de contorno representando o rendimento da extração do colesterol em função da temperatura e L/S.....	49
8b-	Superfície de resposta representando o rendimento da extração do colesterol em função da temperatura e L/S.....	50
9-	Diagrama de solubilidade para gema-acetona.....	54
10-	Curva de distribuição para gema-acetona.....	55
11-	Representação esquemática de um sistema de extração contracorrente.....	57
12-	Relação entre $Y_c$ e $Y_{sr}$ .....	59
13-	Simulação do número de estágios teóricos para sistema contracorrente de gema-acetona.....	59
14-	Simulação da quantidade de extrato para sistema contracorrente de gema-acetona.....	60
15-	Simulação da concentração mássica do extrato final em um sistema contracorrente de gema-acetona.....	61
16-	Simulação da concentração mássica do óleo no refinado ( $Y_n$ ) e no extrato ( $X_n$ ) para um sistema de extração de 6 estágios e rendimento de 91% de extração do colesterol.....	62
17-	Aceitação da aparência.....	66
18-	Aceitação da preferência.....	67

## LISTA DE TABELAS

1- Composição química da gema.....	4
2- Composição fosfolipídica da gema.....	5
3- Composição graxa dos fosfolipídeos (%).....	5
4- Valores reais e codificados atribuídos à variáveis do planejamento fatorial.....	27
5- Valores reais e codificados atribuídos à variáveis do planejamento composto rotacional de segunda ordem.....	27
6- Especificação das condições experimentais para o planejamento fatorial.....	28
7- Especificação das condições experimentais para o planejamento composto rotacional de segunda ordem.....	29
8- Especificação das condições experimentais para determinação do equilíbrio prático.....	31
9- Componentes da gema.....	38
10- Rendimento da extração do colesterol.....	40
11- Estimativa dos efeitos das variáveis do planejamento fatorial.....	41
12- Rendimento da extração do colesterol.....	43
13- Análise de variância para modelo linear.....	44
14- Análise de variância para modelo quadrático.....	46
15- Análise de variância para modelo quadrático corrigido.....	47
16- Massa de colesterol extraído e estabilidade da emulsão na determinação do tempo de equilíbrio "prático".....	52
17- Estimativa dos efeitos para colesterol extraído e estabilidade da emulsão.....	52
18- Análise de variância para curva de distribuição.....	56
19- Teste de TUKEY para colesterol, fosfolipídeos e capacidade emulsificante.....	64
20- Valores médios de aceitação de amostras de maionese para os atributos de aparência e sabor, aroma e textura (1 = desgostei muitíssimo, 9 = gostei muitíssimo).....	64

## NOMENCLATURA

- A - massa de solvente puro, (g)
- B - massa de sólido insolúvel ou inerte, (g)
- C - massa de soluto, (g)
- $C\alpha$  - concentração do soluto no equilíbrio ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
- CV - codificação de variáveis, (adimensional)
- $E_1$  - massa de solução aderida ao inerte que sai na corrente superior do estágio 1, (g)
- $E'_1$  - massa de solução aderida ao inerte que sai na corrente superior do estágio para tempo de contato curto, (g)
- F - massa de soluto e solvente na corrente superior que entra no estágio 1, (g)
- F - teste de Fisher
- K - coeficiente de distribuição, (adimensional)
- k - número de variáveis independentes, (adimensional)
- L/S - razão de massa de solvente para massa de sólidos totais em um estágio, (adimensional)
- $M_1$  - massa da solução na mistura do estágio 1, (g)
- N - velocidade do agitador, (rpm)
- $N_F$  - fração mássica de inertes, base livre de inertes, que entra na corrente superior do estágio 1, (adimensional)
- $N_{M_1}$  - fração mássica de inertes, base livre de inertes, na mistura do estágio 1, (adimensional)
- NE - número de experimentos totais
- NET - número de estágios teóricos
- n - número correspondente ao estágio
- p - peso (g)
- $R_0$  - massa de solvente e soluto na corrente inferior que entra no estágio 1, (g)
- $R_1$  - massa de solvente e soluto na corrente inferior que sai do estágio 1, (g)
- $R'_1$  - massa do solvente e soluto na corrente inferior que sai do estágio 1, após curto tempo de contato, (g)

- S - massa de sólidos totais em um estágio, (g)
- T - temperatura, ( $^{\circ}$ C)
- t - tempo, (min)
- v - volume ( $\text{cm}^3$ )
- $X_0$  - fração mássica do soluto na corrente inferior que entra no estágio 1, (adimensional)
- $X_1$  - fração mássica do soluto na corrente inferior que sai do estágio 1, (adimensional)
- $X_n$  - fração mássica do soluto na corrente inferior que sai do estágio n, (adimensional)
- $x_1$  - valor da variável codificada L/S
- $x_2$  - valor da variável codificada T
- $x_3$  - valor da variável codificada N
- $x_4$  - valor da variável codificada t
- $Y_C$  - fração mássica do colesterol no refinado, base livre de inertes, (adimensional)
- $Y_F$  - fração mássica do soluto, base livre de inerte, que entra no estágio 1, (adimensional)
- $Y_{sr}$  - fração mássica dos solúveis restantes no refinado, base livre de inertes, (adimensional)
- $Y_1$  - fração mássica do soluto, base livre de inerte, na corrente superior que sai do estágio 1, (adimensional)
- $Y_n$  - fração mássica do soluto, base livre de inerte, na corrente superior que sai do estágio n, (adimensional)
- $\hat{Y}$  - rendimento da extração do colesterol em função das variáveis codificadas, (%)
- $\alpha$  - valor da variável codificada axial, (adimensional)
- $\Delta$  - diferença mínima significativa para teste de TUKEY
- $\delta$  - desvio padrão do erro
- $\eta$  - rendimento da extração do colesterol em função das variáveis reais, (%)

## RESUMO

A extração do colesterol da gema desidratada de ovo de galinha foi pesquisada utilizando acetona como solvente. Um planejamento fatorial foi aplicado para determinação das variáveis (razão da massa do solvente para massa de sólido, L/S; temperatura, T; velocidade de agitação, N e tempo de contato, t) mais significativas no rendimento da extração do colesterol. Usando as variáveis mais importantes, um planejamento rotacional de segunda ordem foi realizado para otimização do rendimento do colesterol por análise da superfície e contorno da resposta. O equilíbrio "prático" de fases e simulação de um sistema de extração multiestágio contracorrente foram estudados a 25<sup>o</sup>C, 15 minutos de contato e 100 rpm. A quantidade de colesterol e fosfolípidos extraída e a estabilidade da emulsão de maionese foram avaliadas nas condições de equilíbrio "prático". Um teste sensorial foi realizado para verificar a adequação do uso da gema desidratada com baixo teor de colesterol como agente emulsificante.

Os resultados mostraram que as variáveis importantes no rendimento de extração do colesterol foram L/S e T. Um modelo de segunda ordem ajustou-se bem aos dados experimentais ( $R^2 = 0,998$ ), e as correspondentes superfície e contorno de resposta indicaram que maiores rendimentos podem ser obtidos com a elevação de L/S e diminuição da T. Do estudo de equilíbrio foi verificado que a solução de extrato retida pelos sólidos inertes é constante e que a fração mássica do soluto ( $Y_n$ ) no refinado é maior que a fração mássica do soluto no extrato ( $X_n$ ). A simulação de um sistema multiestágio contracorrente mostrou a viabilidade de obter alto rendimento na extração do colesterol (80-90%), variando a relação L/S e o número de estágios. A estabilidade das emulsões de maionese nas condições de equilíbrio "prático" não foram significativamente diferentes da obtida com a gema controle

(desidratada sem extração de colesterol). Do teste sensorial o produto foi considerado aceitável por cerca de 55% dos consumidores. Os resultados globais indicaram este processo como uma promissora tecnologia.

## SUMMARY

The extraction of cholesterol from dehydrated egg yolk from hen's egg was searched, using acetone as solvent. A factorial design was applied for determination of the significative variables (solvent/solids mass ratio, L/S; temperature, T; stirring speed, N and contact time, t) on cholesterol yield. Using the most important variables a rotatable second-order design was carried out for the optimization of cholesterol yield by response surface and contour analysis. "Practical" phase equilibrium and simulation of multistage countercurrent extraction system were studied at 25°C, 15 minutes of contact time and 100 rpm. The cholesterol and phospholipid contents and the emulsion stability of mayonnaises were determined at "practical" equilibrium conditions. A sensorial test was carried out for checking the suitability of the low cholesterol dehydrated egg yolk as an emulsifying agent in mayonnaises.

The results showed that the most significant variables were: L/S and T. A second-order model fitted well the experimental points ( $R^2 = 0,998$ ), and the corresponding response surface and contour indicated that the highest cholesterol yield was obtained by rising the L/S and decreasing the temperature. From equilibrium studies it was verified that the retention of extract solution by the inert solids is constant, and the solute mass fraction of raffinate ( $Y_n$ ) is higher than the solute mass fraction of the extract ( $X_n$ ). The simulation of multistage countercurrent extraction system showed that it is possible to obtain higher cholesterol yield (80-90%) by changing the L/S and stage numbers. The stability of mayonnaise emulsions in the equilibrium conditions was not significantly different in comparison with that obtained with the egg yolk control (without cholesterol extraction). From the sensorial tests the product was considered acceptable for about 55% of the consumers. The overall results indicate this process as a promising technology.



## 1-OBJETIVOS

Na tentativa de obter-se gema desidratada do ovo de galinha com baixa concentração de colesterol e manutenção das propriedades emulsificantes, esta pesquisa tem como objetivos:

- Modelagem matemática da extração do colesterol via análise de superfície de resposta,
- Obtenção das concentrações de colesterol no equilíbrio "prático" (ou equilíbrio dependente das condições operacionais do processo, otimizadas pela análise de superfície de resposta) entre as fases do sistema: refinado-extrato.
- Determinação do número de estágios teóricos mediante simulação de um sistema de extração multiestágio contracorrente.
- Avaliação da capacidade emulsificante da gema residual em função dos níveis de colesterol e fosfolipídeos extraídos.
- De acordo com a avaliação do item anterior, determinar a concentração máxima de colesterol que pode ser extraída sem comprometer a propriedade emulsificante.
- Testar a aceitação do produto, mediante teste sensorial, utilizando condições de máxima extração, na formulação de maionese.

## 2-INTRODUÇÃO

O ovo de galinha é um alimento que contém proteínas de alto valor biológico, vitaminas, sais minerais e a gema constitui uma notável fonte lipoprotéica, STADELMAN & COTTERILL (1986). Por esta riqueza em nutrientes, os ovos e seus produtos derivados são importantes para a saúde humana, porém estão sujeitos a deterioração química e microbiana e um dos meios para evitá-la e prolongar sua vida útil é a secagem por atomização, MASTERS (1972).

A gema "in natura" ou desidratada, devido a presença de fosfolipídeos, é comumente usada como agente emulsificante em maioneses e massas em geral. O inconveniente está no fato de apresentar alto teor de colesterol, substância esta envolvida em distúrbios cardiovasculares, SWEENEY & WEIHRAUCH (1976); LARSEN & FRONIN (1981) e MACNAMARA (1987). Este fato tem estimulado o interesse dos pesquisadores em reduzir os níveis de colesterol no ovo de galinha tanto por via genética, HARGIS (1988), quanto química LARSEN & FRONIN (1981), TORKASKA & CLANDINI (1985).

A extração sólido-líquido ou lixiviação é amplamente utilizada na indústria alimentícia para diferentes finalidades: obtenção de um novo produto, remoção de constituintes indesejáveis ou como uma etapa auxiliar de outros processos. Dentre suas múltiplas utilizações SCHWARTZBERG (1980) cita: extração de açúcares, óleos vegetais, compostos voláteis, produção de café e chá solúveis, isolado protéico de soja, entre outros.

No caso da extração do colesterol da gema líquida ou desidratada este composto orgânico está associado às proteínas e sua remoção tem sido feita por combinação de solventes de mesma natureza e diferentes características polares, a fim de obter-se maior seletividade, rendimento e manutenção das propriedades funcionais da gema, DEUEL (1951); LARSEN & FRONIN (1981); WARREN et alii (1988). Entretanto tais objetivos não tem sido alcançados com os solventes utilizados (clorofórmio, metanol, entre outros) e

que além disso são proibidos pelo CODEX ALIMENTARIUS (1985) para utilização em alimentos, devido provavelmente, à toxicidade e concentração residual no refinado.

A análise do desempenho e desenvolvimento da extração é auxiliada pela determinação do número de estágios teóricos ou de equilíbrio, o qual é baseado nas curvas de solubilidade e distribuição do soluto nas fases e também pela modelagem matemática do processo. Esta modelagem leva em consideração os fatores que influenciam na extração e pode ser obtida, de modo empírico, através da otimização da mesma pelo método de superfície de resposta, cuja principal vantagem está na redução do número de ensaios experimentais, BOX et alii (1978).

#### JUSTIFICATIVAS PARA A PESQUISA

- Possibilidade de oferecer ao consumidor um produto com baixo teor de colesterol que atenda às necessidades nutricionais e funcionais da gema do ovo de galinha.

- Conhecendo a solubilidade das diferentes classes de lipídios em acetona, testar sua adequação para obtenção deste produto. (De posse da informação da baixa solubilidade dos fosfolipídeos em acetona, é interessante testar a adequação deste solvente na extração do colesterol)

- Devido à importância das condições de equilíbrio no projeto de extratores e ausência destes dados na literatura para este caso específico, seu estudo faz-se necessário.

- A gema em pó foi utilizada por várias razões: evitar problemas na separação de fases (formação de emulsão) e melhorar a solubilidade dos lipídeos na acetona, pois a presença de água tornaria o solvente mais polar com conseqüente redução da mesma. Tal fato implicaria em um aumento na quantidade de solvente utilizado e maiores gastos na sua recuperação.

### 3- REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1- GEMA

##### 3.1.1-Composição química

A gema compreende 30% do peso total do ovo de galinha e apresenta 50% de sólidos, aproximadamente. Sua composição química é apresentada na TABELA 1.

TABELA 1- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA GEMA

COMPONENTE	% ( base úmida)
Proteína	15,7 - 16,6
Lipídeos	31,8 - 35,5
Triglicerídeos	65,0
Fosfolipídeos	23,0
Colesterol	5,2
Carboidratos	0,2 - 1,00
Cinzas	1,1

FONTE: STADELMAN & COTTERILL, 1986

Os fosfolipídeos, cuja composição é apresentada na TABELA 2, são lipídeos conjugados que apresentam um radical fosfato em sua molécula. Podem estar associados às proteínas, constituindo as chamadas lipoproteínas, das quais a lecitina, representando 73% dos fosfolipídeos, desempenha importante papel como agente emulsificante das gorduras, dada às suas características polares e apolares, DEUEL (1951). A porcentagem de ácidos graxos dos principais fosfolipídeos é apresentada na TABELA 3.

TABELA 2- COMPOSIÇÃO FOSFOLIPÍDICA DA GEMA

COMPONENTE	PORCENTAGEM (%)
Fosfaditilcolina (lecitina)	73,0
Fosfaditiletanolamina (cefalina)	15,0
Lisofosfaditilcolina	5,8
Esfingomelina	2,5
Lisofosfaditiletanolamina	2,1
Plasmogênio	0,9
Inositolfosfolipídio	0,6

FORTE: STADELMAN & COTTERILL, 1986

TABELA 3- COMPOSIÇÃO GRAXA DOS FOSFOLIPÍDEOS(%)

ÁCIDOS GRAXOS	PM	PC		PE		LPC
		a	b	a	b	a
16:0	255,422	27,9	37,0	45,3	21,6	20,6
16:1	253,406	-	0,6	4,6	-	-
18:0	283,476	7,7	12,4	13,6	32,5	6,5
18:1	281,460	36,3	31,4	28,2	17,3	29,6
18:2	279,444	21,6	12,0	4,1	7,0	30,3
18:3	277,429	6,5	1,0	0,9	2,0	3,2
20:4	304,475	-	2,7	1,8	10,2	9,8
22:5	330,513	-	0,8	-	3,0	-
22:6	328,497	-	2,1	-	6,4	-

FORTE: a- NAVARRO et al., 1972

b- STADELMAN & COTTERILL, 1986

PC- Fosfaditilcolina

PE- Fosfaditiletanolamina

LPC- Lisofosfaditilcolina

### 3.1.2- Colesterol

O colesterol é um monoálcool resultante da hidrólise de gordura animal e vegetal, SABINE (1977), contendo em sua estrutura um núcleo esterol, conforme ilustra a FIGURA 1. É insaponificável e apresenta solubilidade similar aos lipídeos (solúvel em solventes orgânicos em geral, e em óleos e gorduras). Está presente na gema em quantidade variável, dependendo do genótipo das aves, STADELDEMAN & COTTERIL (1986). Estes mesmos autores citam valores de 30-36 mg/g de sólidos secos.

WARREN et alii (1988) usando o método HPLC encontraram 29,5 mg/g de gema em pó obtida da secagem por atomização.

SWEENEY & WEIHRAUCH (1976), fizeram uma extensa revisão sobre os métodos disponíveis para determinação do colesterol, cujos resultados para gema "in natura" variaram de 18,60-21 mg/g.

A importância biológica do colesterol, segundo METZLER (1977) reside no fato de:

- ser precursor de esteróis nos tecidos animais, tais como: ácidos biliares, hormônios (androgênicos, estrogênicos, progesterona, adrenocorticóides);
- fazer parte da constituição da membrana celular;
- participar da síntese da vitamina D<sub>3</sub>.

Entretanto, elevados níveis deste composto ou sua presença junto a gorduras saturadas no sangue, tem sido correlacionados com cardiopatia coronária e arterosclerose, ANDERSON et alii (1976); REISER (1978) e McNAMARA (1987).

Segundo FRONING et alii (1990), esta discussão tem levado a um decréscimo no consumo de ovos e conseqüente prejuízo nutricional para a população; por outro lado, tem estimulado o aparecimento de produtos com teor mais baixo de colesterol, como por exemplo, formulações dietéticas em que a gordura da gema é substituída por similares vegetais, ovos geneticamente modificados com diferentes conteúdos de matéria graxa (alteração no balanço de

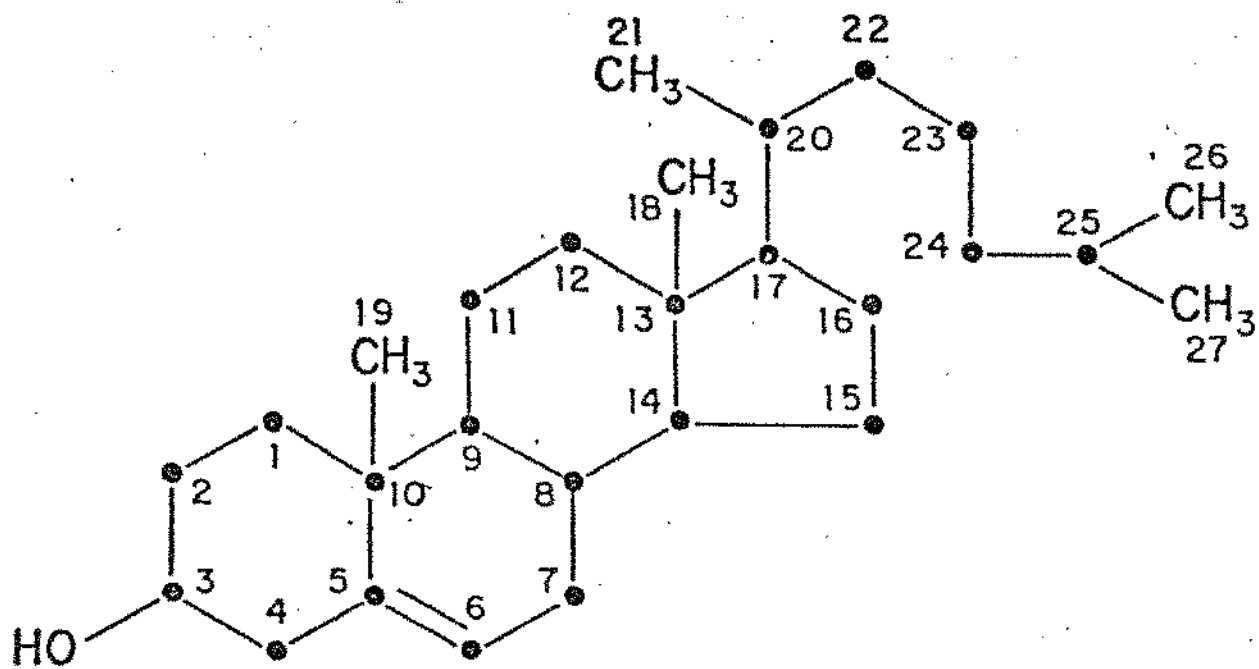


FIGURA 1- ESTRUTURA DO COLESTEROL (SABINE, 1977)

ácidos graxos saturados e insaturados) e, gema com baixo teor de colesterol pela utilização de métodos tradicionais de extração, e mais recentemente, a extração com CO<sub>2</sub> no estado supercrítico.

A NCEP- National Cholesterol Education Program (1988) recomenda para indivíduos com concentração de colesterol entre 200-239 mg/dl no plasma, uma dieta que restrinja a ingestão tanto de colesterol como de gorduras saturadas, visando diminuir o risco da ocorrência de moléstias cardiovasculares.

### 3.1.3- Propriedade Emulsificante

A gema constitui uma emulsão tipo óleo-água, e por esta razão é um eficiente agente emulsificante, imprescindível na formulação de maioneses, molhos para salada, bolos, cremes, etc, STADELMAN & COTTERILL (1986).

A formação de uma emulsão inicia-se pela ação dos agentes de superfície ou surfactantes com a redução da tensão interfacial entre as fases imiscíveis. Os surfactantes formam um filme ao redor das gotículas de óleo, orientando sua parte apolar para a fase lipídica e a polar para a fase aquosa, impedindo a coalescência dos glóbulos de gordura e o líquido no qual é mais solúvel forma a fase contínua da emulsão. Na gema os principais surfactantes polares (lecitina, cefalina e lipoproteínas) favorecem a formação de emulsão óleo-água; o colesterol, sendo menos polar, favorece a emulsão água-óleo. As diferentes emulsões são distintas com relação a viscosidade e, sua estabilidade depende da concentração e da solubilidade relativa desses agentes emulsificantes nas duas fases, da relação óleo/água, da energia mecânica necessária para sua formação, COTTERILL et alii (1976).

O teste da estabilidade da emulsão é indicativo da ação dos agentes emulsificantes em mantê-la estável. A instabilidade é caracterizada visualmente pela formação de um creme superficial, ou seja, coalescência dos glóbulos de gordura, ou pela separação física dos mesmos sob ação de força centrífuga, sendo esta última,



a base dos testes utilizados na determinação da estabilidade da maionese, TORNBERG & HERMANSSON (1977); LIEU et alii (1978) e YANG & COTTERILL (1989).

O potencial dos agentes emulsificantes da gema para formação de emulsões estáveis é influenciado por vários fatores e dentre eles as condições de processamento (congelamento, pasteurização, desidratação, entre outros) são bastante discutidas na literatura, COTTERILL et alii (1976); YANG & COTTERILL (1989).

Congelamento, liofilização e secagem por atomização de gema com 10% de sal, de acordo com os resultados obtidos por YANG & COTTERILL (1989), causaram desestabilização da gordura da gema, levando à redução da estabilidade das maioneses obtidas com estes produtos.

No caso da extração dos lipídios com solventes de diferentes polaridades (clorofórmio, metanol, isopropanol, hexano) para obtenção da gema com baixo teor de colesterol, a mesma não é seletiva em relação a este composto, podendo solubilizar outros componentes graxos e alterar a integridade protéica, prejudicando seriamente a estabilidade das emulsões, LARSEN & FRONIN (1981), CHUNG & FERRIER (1991).

### 3.2- SELEÇÃO DO SOLVENTE

Os solventes recomendados para uso em alimentos não devem exibir evidência de carcinogenicidade e seus resíduos nos produtos devem ser os mais baixos possíveis, da ordem de partes por bilhão. Os solventes mais comumente usados no processamento de alimentos tem sido água, soluções aquosas de ácidos e sais não tóxicos, hexano comercial e alguns alcanos, etanol e poucos álcoois de baixo peso molecular, acetona, metil etil cetona e cloreto de metileno. Solventes como benzeno e muitos clorinados, não devem ser usados no processamento de alimentos, SCHWARTZBERG (1987).

Usualmente é desejável que o solvente seja de baixo custo, não corrosivo, não inflamável ou explosivo, atóxico, facilmente removível e recuperável. Se possível, solventes inflamáveis devem ser usados a temperaturas inferiores ao seu ponto de ebulição, para prevenir vazamento de vapores de solvente ocasionado pela pressão do processo, SCHWARTZBERG (1987), e conseqüentes riscos de inflamabilidade e também prejuízos financeiros devido a estas perdas.

### 3.2.1 - Solubilidade dos lipídeos em acetona e propriedades do solvente.

Segundo DEUEL (1951), os ácidos graxos saturados, gorduras neutras, esteróis e carotenóides são solúveis em acetona. Já os fosfolipídeos não o são, exceto os ácidos fosfatídicos, que são solúveis em acetona a baixa temperatura.

A acetona ou propanona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) é um líquido volátil, inflamável, solúvel em água, álcool e éter, apresenta ponto de ebulição  $56,6^\circ\text{C}$ , densidade relativa 0,792, PERRY & CHILTON (1980).

### 3.3- EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

O termo lixiviação é usado amplamente para descrever operações de extração sólido-líquido, as quais envolvem solubilização ou dissolução preferencial de um soluto presente no sólido quando em contato com um solvente líquido. Tratando-se de materiais secos e havendo perda de estrutura original dos mesmos, com pouca resistência à transferência de massa, o estágio inicial dessa operação é a dissolução do soluto no interior do sólido; caso haja resistência nos sólidos, verdadeira lixiviação ocorre, SCHWARTZBERG (1980).

A transferência de massa do soluto pode ocorrer por 3 diferentes mecanismos: convecção, difusão molecular ou difusão turbulenta. O processo pode ser dividido em três etapas: primeiro ocorre mudança de fase do soluto assim que ele se dissolve no solvente; segundo, há difusão do soluto dos poros internos para a superfície da partícula e terceiro há transferência do soluto para a solução em contato com o sólido. Cada uma destas etapas pode ser responsável pela limitação da taxa de extração e esta tem influência na seleção do equipamento. Assim, se a difusão do soluto através da estrutura porosa for o fator controlador, o material deve ter o tamanho reduzido para que o soluto atravessasse uma distância pequena; se por outro lado a resistência maior estiver na transferência do soluto para a solução, alto grau de agitação é requerido. Esta operação pode ser realizada por diferentes processos em diferentes equipamentos. Entre os processos podemos ter: batelada e semi-contínuo (regime não permanente) e contínuo (regime permanente) e os equipamentos operando por estágios ou continuamente. O tipo de equipamento empregado dependerá da natureza do sólido. Tratando-se de sólidos finos, como a gema em pó, a percolação do solvente não seria adequada, pois estes sólidos finos ofereceriam alta resistência ao escoamento do fluido; os equipamentos mais adequados seriam tanques com agitação suficiente para manter os sólidos finos em suspensão, COULSON & RICHARDSON (1976).

### 3.3.1- <sup>^</sup>Parâmetros que influenciam o processo de extração

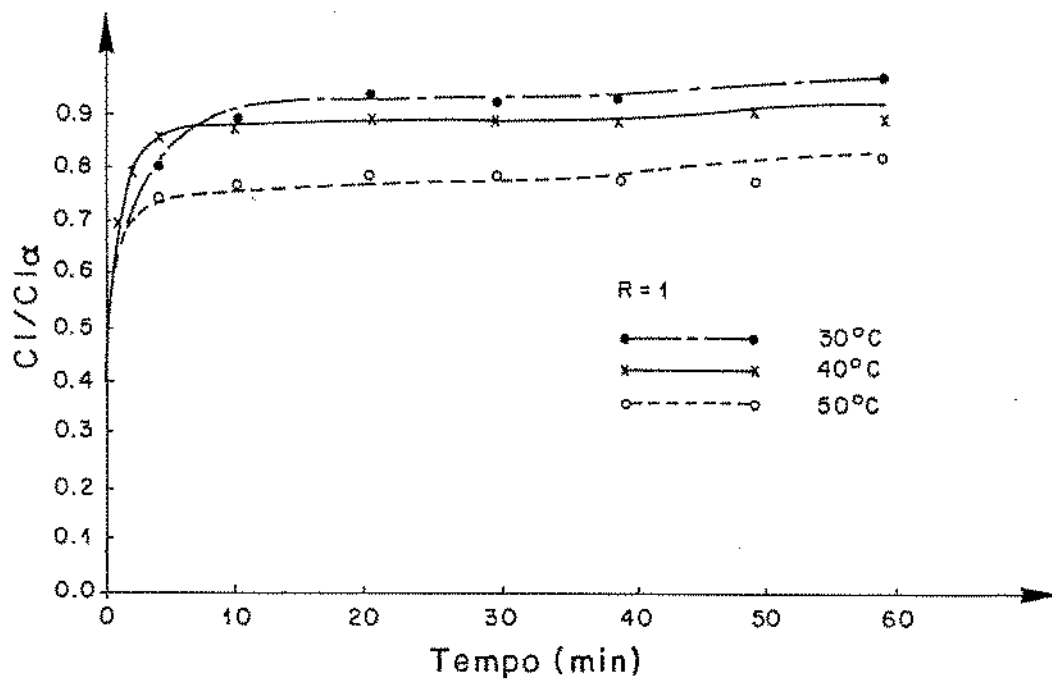
Quando duas fases são contactadas ocorre uma transferência de massa do soluto entre elas, cuja extensão dependerá, entre outros fatores, da temperatura, da razão entre alimentação e solvente (S/L), da velocidade de agitação (N) e tempo de contato (t), BRENAN (1976); LONG (1977); VOILLEY & CLO (1981); TURKAY et alii (1985); DIBERT et alii (1989b); CHIEN et alii (1990).

As curvas de extração apresentadas na FIGURA 2, mostram a variação da concentração do extrato em relação à concentração de equilíbrio ( $C_{\alpha}$ ), com o tempo de contato ou extração. À medida que este tempo aumenta mais soluto é extraído. Entretanto a taxa de extração declina com o tempo de tal modo que o estado de equilíbrio é atingido, onde a concentração do extrato é praticamente constante (platô da curva). Observando a FIGURA 2a nota-se que o aumento da temperatura eleva a taxa de extração, pois segundo COULSON & RICHARDSON (1976) esta favorece maior solubilização do soluto e também pode promover aumento do coeficiente de difusão. A FIGURA 2b mostra o efeito da proporção sólido/solvente ou S/L sobre a taxa de extração. Quanto mais elevada for esta razão, maior será o potencial de transferência de massa, e o equilíbrio será atingido mais rapidamente. A concentração de equilíbrio do soluto também será elevada com o aumento dessa razão, DIBERT et alii (1989b).

### 3.3.2- Métodos de cálculo

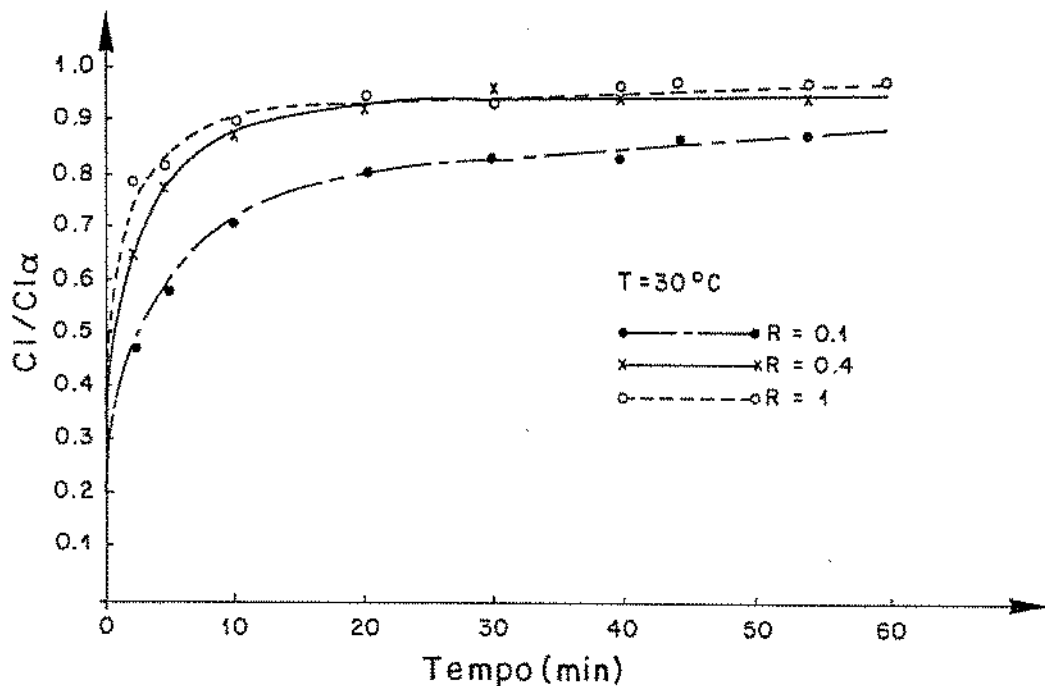
A modelagem de um processo de extração sólido-líquido, necessária para o projeto dos equipamentos e determinação das condições operacionais, requer informações sobre os dados de equilíbrio do sistema, ABRAHAM et alii(1988).

Estes dados podem ser obtidos experimentalmente através de um balanço de massa do sistema de extração, representado por um único estágio, conforme ilustra a FIGURA 3. Neste estágio quantidade suficiente de solvente é adicionada para dissolver todo o soluto presente. Considerando que não haja adsorção preferencial do solvente ou soluto pela matriz sólida e que o tempo de contato seja adequado para que toda a dissolução ocorra, temos um sistema formado por uma massa de sólidos insolúveis imersos em uma solução de soluto, formando duas fases. Estas fases são separadas por sedimentação, filtração, drenagem ou centrifugação. Admitindo que esta separação seja ideal, não haverá soluto associado com os sólidos inertes. Tal situação corresponde a um estágio ideal de



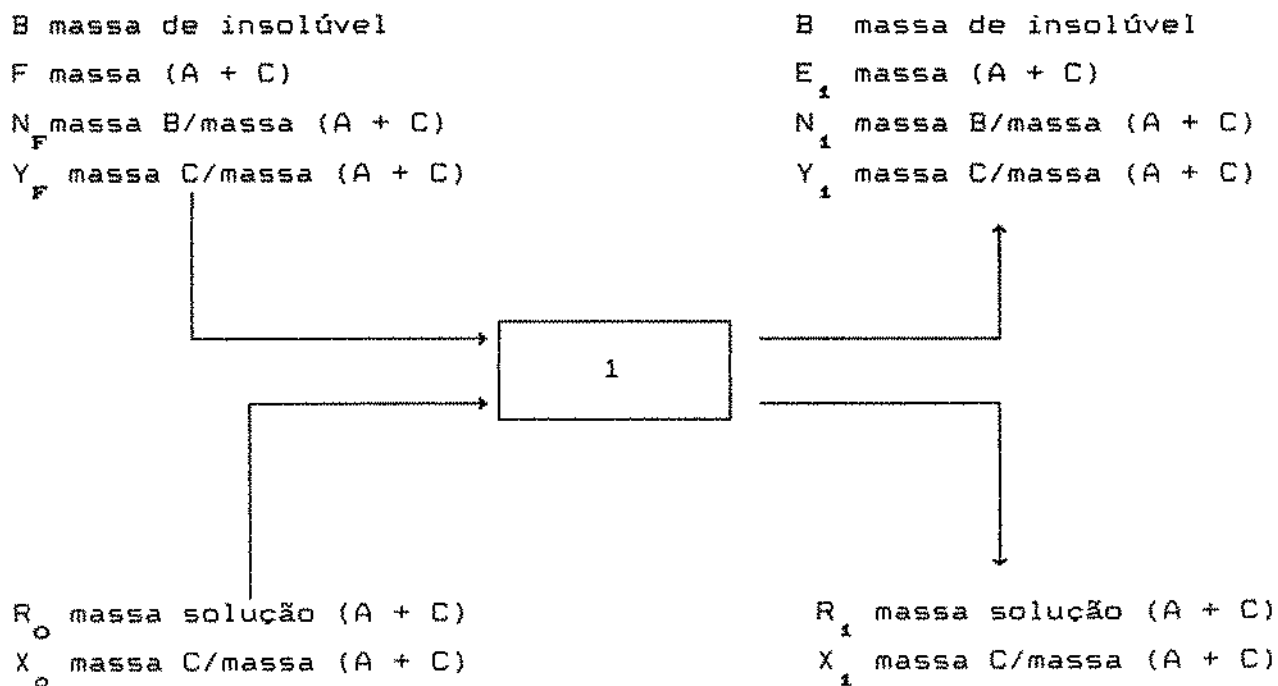
$C_t$  = concentração do soluto na solução extrato no tempo  $t$  ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )  
 $C_{\infty}$  = concentração do soluto na solução extrato no equilíbrio ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )  
 $R = S/L$  = massa do sólido/massa do solvente ( $\text{kg}/\text{kg}$ )

FIGURA 2a- CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CAFÉ COM HEXANO EM VÁRIAS TEMPERATURAS (DIBERT et alii, 1989b)



$C_1$  = concentração do soluto na solução extrato no tempo  $t$  ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )  
 $C_{1\alpha}$  = concentração do soluto na solução extrato no equilíbrio ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )  
 $R = S/L = \text{massa do sólido}/\text{massa do solvente}$  ( $\text{kg}/\text{kg}$ )

FIGURA 2b- CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CAFÉ COM HEXANO EM DIFERENTES PROPORÇÕES SÓLIDO/SOLVENTE (DIBERT et alii, 1989b)



onde,  $A$ - solvente  
 $B$ - insolúvel (ou inertes)  
 $C$ - soluto  
 $A + C$ - massa da solução

FIGURA 3- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA OPERAÇÃO DE SEPARAÇÃO EM UM ÚNICO ESTÁGIO (TREYBAL, 1980)

eficiência 100% (razão entre a concentração do soluto no extrato ou refinado em estágio real para o estágio ideal). Na prática isto é impossível de ocorrer, pois o soluto pode não estar completamente dissolvido, o tempo de contato ser insuficiente e a separação das fases ser incompleta, de modo que os sólidos inertes retém algum líquido com o soluto dissolvido, resultando em eficiência menor que 100%, e o equilíbrio atingido, levando em conta esta eficiência menor, é denominado "prático", TREYBAL (1980). Dessa forma podemos ter diferentes estados de equilíbrio "prático" para um dado sistema, que dependerão também da temperatura, pressão, razão entre as fases e concentração do soluto nas mesmas e de outras condições operacionais do processo, como por exemplo agitação e tipo de equipamento usado para separação. Neste caso a escolha do estado de equilíbrio "prático" dependerá de conveniências técnicas ou econômicas do projeto em questão. O equilíbrio verdadeiro é um estado único, atingido após um longo tempo de contato (onde as concentrações do soluto entre as fases atingem um valor constante), o qual depende apenas da temperatura, pressão, razão entre as fases e concentração do soluto nas mesmas.

Tratando-se de processo de extração aplicado a misturas complexas, como são os alimentos em geral, é difícil atingir o equilíbrio verdadeiro, pois nestes sistemas multicomponentes, a extração de um soluto de interesse pode afetar de forma indesejada outros constituintes; outrossim o solvente pode não ser seletivo e extrair outros solutos. Em ambos os casos necessita-se limitar o tempo de contato entre as fases, para obter um produto com características adequadas, e portanto utilizar dados experimentais de equilíbrio "prático" obtidos em condições idênticas àquelas que serão usadas no processo industrial.

### 3.3.2.1- Balanço de Massa

A FIGURA 3 mostra um sistema de extração sólido-líquido com 3 componentes: solvente puro (A) (no presente trabalho será



acetona), sólido inerte (B) representado pelos insolúveis da gema desidratada, e o soluto (C) que poderá ser considerado como extrato lipídico seco (para facilitar a descrição do sistema). A concentração de sólidos insolúveis (B) na mistura é representada por N (massa de B/massa (A+C)). A composição do soluto (C) é expressa por X (massa C/massa (A+C)) em base livre de B para a corrente líquida, e por Y (massa C/massa (A+C) em base livre de B para a corrente de sólidos, F representa a massa de sólidos solúveis e solvente presentes na alimentação de sólidos na entrada,  $R_0$  representa a massa de solvente e sólidos na alimentação líquida que entra sendo  $X_0$  a concentração de sólidos solúveis nesta corrente, em base livre de sólidos inertes. A separação das fases em contato produz a solução extrato  $R_1$  (massa de solvente mais sólidos solúveis) de concentração em sólidos solúveis  $X_1$  (em base livre de inertes).

A corrente superior (B,  $E_1$ ,  $Y_1$ ,  $N_1$ ) representa a fase de sólidos inertes contendo B e a solução aderida  $E_1$  (massa de solvente + massa de sólidos solúveis presentes na corrente de sólidos) cuja concentração de solúveis é  $Y_1$  (base livre de inertes)

Pela definição de N temos a seguinte equação:

$$B = F \cdot N_F = E_1 \cdot N_1 \quad (1)$$

Os balanços de massa podem ser escritos da seguinte forma:

- Balanço Global:

$$F + B + R_0 = B + E_1 + R_1 \quad (2)$$

- Balanço de sólidos solúveis:

$$F(Y_F) + R_0(X_0) = E_1(Y_1) + R_1(X_1) \quad (3)$$

- Balanço de solvente:

$$F(1-Y_F) + R_O(1-X_O) = E_1(1-Y_1) + R_1(1-X_1) \quad (4)$$

- Balanço para a solução(soluto + solvente)

$$F + R_O = E_1 + R_1 = M_1 \quad (5)$$

onde  $M_1$  representa a mistura global de soluto e solvente. Assim a razão de sólidos insolúveis por solução em  $M_1$  é dada por:

$$N_{M_1} = B / (F + R_O) = B / M_1 \quad (6)$$

$$Y_{M_1} = (Y_F \cdot F + R_O \cdot X_O) / (F + R_O) \quad (7)$$

onde  $Y_{M_1}$  representa a concentração de soluto em  $M_1$ .

Considerando que o solvente entra no sistema isento de sólidos solúveis, a concentração  $X_O$  é igual a zero. As concentrações  $X_1$  e  $Y_1$  (concentração do soluto na solução aderida ao inerte) devem ser determinadas experimentalmente. Estas relações podem ser mostradas em um sistema de coordenadas retangulares (FIGURA 4), constituindo o diagrama de solubilidade, DIBERT et alii (1989a). O ponto F representa os sólidos a serem lixiviados e  $R_O$  o solvente. O ponto  $M_1$  que representa a mistura total, deve estar na linha reta que liga os pontos F e  $R_O$ . Os pontos  $E_1$  e  $R_1$ , obtidos após longo tempo de contato das fases, representam as correntes efluentes; localizam-se nos extremos finais da linha de amarração que passa por  $M_1$  e suas composições podem ser lidas no diagrama. Se os dados de equilíbrio forem obtidos por um curto período de tempo estes pontos são representados por  $E'_1$  e  $R'_1$ .

A partir deste diagrama obtém-se a curva de distribuição (FIGURA 5), a qual expressa a fração mássica do soluto no refinado (base livre de inertes),  $Y$ , em função da fração mássica do soluto

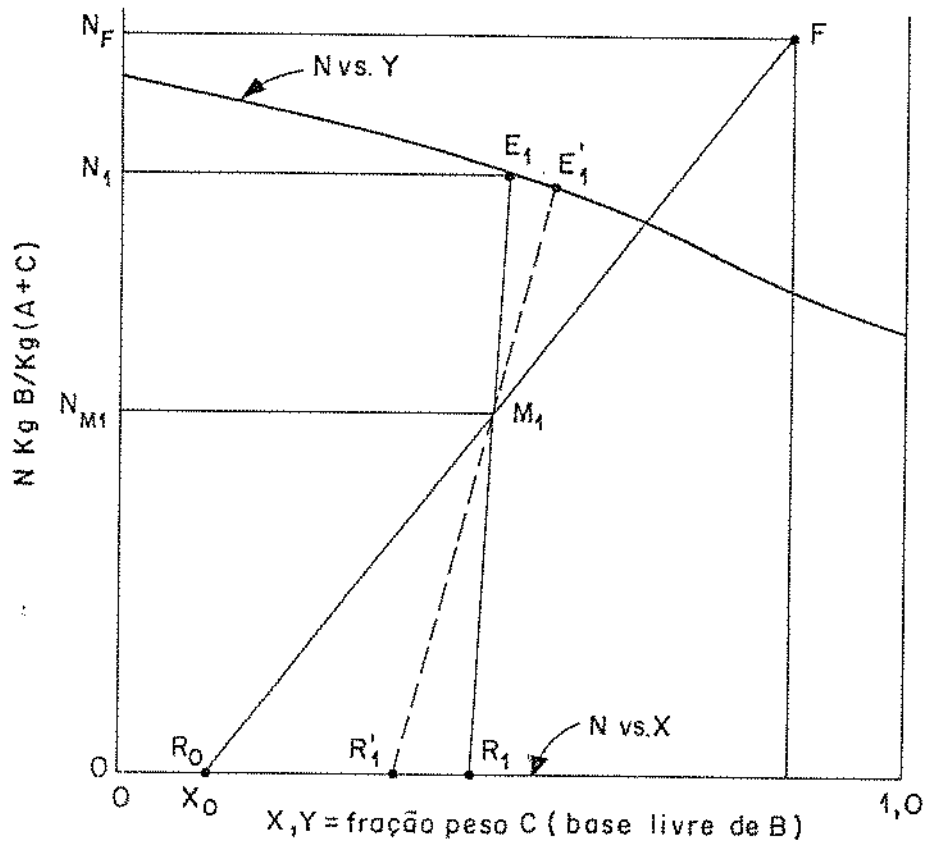


FIGURA 4- DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE (TREYBAL, 1980)

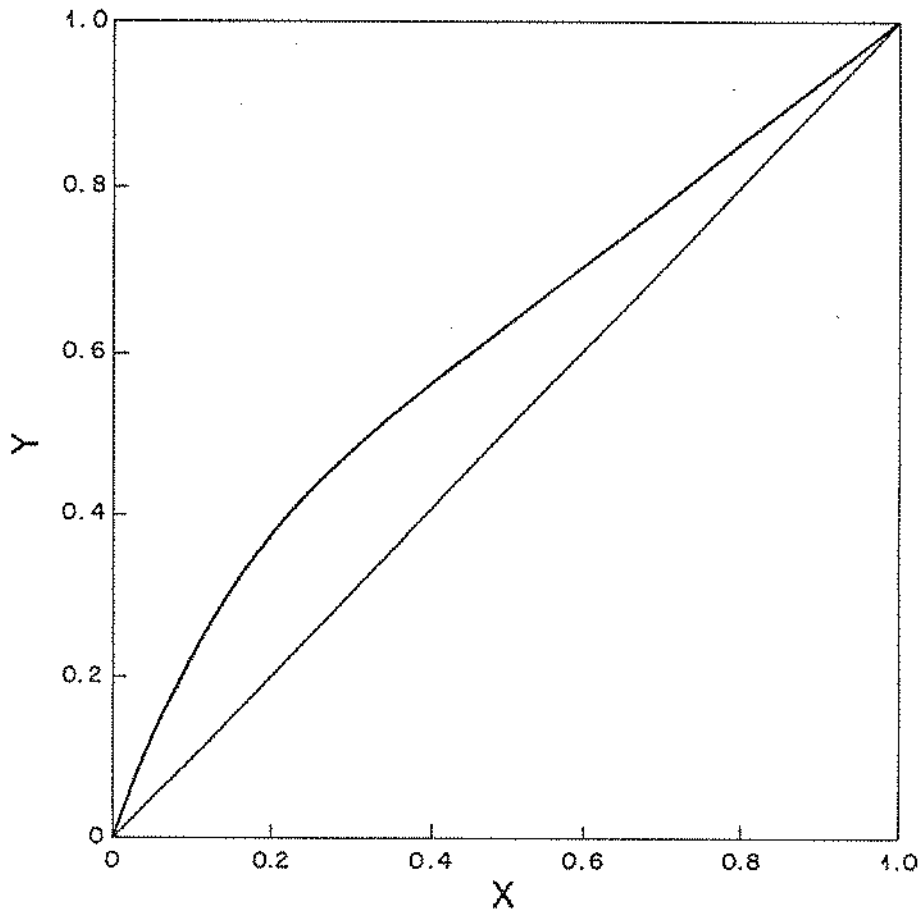


FIGURA 5- CURVA DE DISTRIBUIÇÃO (TREYBAL, 1980)

no extrato, X (base livre de inertes). A diagonal (inclinação de  $45^{\circ}$ ) representa a situação em que o coeficiente de distribuição  $K = Y/X$  é 1, ou seja, a solução aderida ao sólido tem a mesma concentração do extrato. Tendo em vista as condições reais de um sistema de extração, diferentes curvas de distribuição podem ser obtidas, TREYBAL(1980).

Neste exemplo, temos uma curva acima da diagonal, indicando que o refinado tem uma concentração de soluto mais alta que no extrato, isto devido à adsorção preferencial do soluto pela matriz sólida, DIBERT et alii (1989a).

### 3.3.3- Aplicação da extração sólido-líquido na remoção do colesterol

Os solventes (puros ou combinados) utilizados na extração dos lipídeos da gema tem sido hexana, etanol, álcool isopropílico (IPA), metanol, éter dietílico entre outros, para obter-se diferentes rendimentos e produtos.

LARSEN & FRONIN (1981) para separar da gema as frações de óleo, isolado protéico e componentes solúveis em água, utilizaram misturas de hexano-etanol e hexano-IPA na proporção de 77:23(p:p) variando as razões de alimentação, solvente, água e também o pH. Obtiveram melhores resultados usando a mistura hexano-IPA, alimentação, água na proporção de 1:1:1 e pH 6. O nível de colesterol presente na fração lipídica foi de 40 mg/g. A capacidade emulsificante destas frações foi menor do que a da gema líquida.

Pesquisas similares foram conduzidas por TORKASKA & CLANDINI (1985) com o objetivo de obter uma fonte lipídica adequada para formulações infantis. Os autores, usando a razão de alimentação/etanol/hexano/água de 1:2:1:1(p:v:v:v) e posterior lavagem com etanol, reduziram 80% da concentração do colesterol no óleo obtido.

Para obtenção da gema desidratada com baixo nível de

colesterol, WARREN et alii (1988) avaliaram o desempenho dos seguintes solventes: clorofórmio-metanol (2:1), hexano-IPA(2:1) e hexano. A relação da razão da alimentação para solvente foi de 1:3 e os resultados mostraram que o hexano removeu mais gordura e fosfolipídios (82 e 92%, respectivamente) e menos colesterol e pigmento (75 e 45%, respectivamente) do que os solventes mais polares e os pós obtidos mostraram melhor escoamento e reconstituição mais fácil que os demais.

A extração com  $\text{CO}_2$  no estado supercrítico também tem sido aplicada, com sucesso, para remoção do colesterol da gema desidratada, por vários pesquisadores, FRONING et alii(1990). Os resultados desta pesquisa por estes autores, mostraram que condições de  $45^\circ\text{C}$  de temperatura e 306 atm de pressão foram consideradas ótimas para uma extração eficiente de colesterol e obtenção de um produto com boas qualidades funcionais.

## 4-MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- MATÉRIA PRIMA

Ovos adquiridos no comércio local foram imersos em etanol 70% por 5 minutos para desinfecção. Após quebra da casca o albume foi separado da gema, e esta diluída com água até 30% de sólidos foi desidratada em secador por atomização com temperatura do ar de secagem de 160°C. O produto obtido foi acondicionado em embalagem de PVC e armazenado a 5°C para uso posterior.

### 4.2- EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para esta pesquisa foram:

- Agitador mecânico FISATOM
- Agitador para tubos de ensaio S/MARCA
- Balança analítica METTLER H10
- Balança semi-analítica MARTE AM5509
- Banho-maria FABBE
- Câmara à temperatura constante com agitador PSYCROTHERM
- Centrífuga Excels Baby FANEM
- Chapa de aquecimento FISATOM
- Espectrofotômetro MICRONAL B34211
- Estufa ventilada FANEM 320SE
- Mufla QUIMIS
- Vidrarias em geral

#### 4.3- REAGENTES

Os reagentes necessários para as análises químicas realizadas neste trabalho foram:

- Ácido acético glacial MERCK (100%)
- Ácido clorídrico concentrado MERCK (100%)
- Ácido p-toluenosulfônico POLYSCIENCE (PA)
- Ácido sulfúrico concentrado ECIBRA (98%)
- Anidrido acético ECIBRA (ACS)
- Água destilada
- Clorofórmio CHEMCO (PA ACS)
- Acetona MERCK (99,5%)
- Di-hidrogenofosfato de potássio VETEC (99%)
- Hidróxido de potássio SYNTH (PA)
- Metanol CHEMCO (PA)
- Molibdato de sódio ECIBRA (99,5%)
- Óxido de zinco SYNTH (PA)
- Sulfato anidro de sódio MERCK (99%)
- Sulfato de hidrazina VETEC (99%)
- Colesterol SIGMA (100%)

#### 4.4- ESQUEMAS DE EXTRAÇÃO

No estudo da otimização do processo de extração por análise de superfície de resposta e determinação do tempo de equilíbrio "prático" o procedimento utilizado foi baseado no trabalho de DIBERT et alii (1989a). Em erlenmeyer de 125 ml com tampa e previamente tarado foi colocada uma amostra de 10 g de gema desidratada e quantidade apropriada de acetona (conforme a razão g sólido/g solvente utilizada). O material foi submetido a agitação em ambiente de temperatura controlada. Após agitação, as fases foram separadas por filtração. O extrato foi coletado em



erlenmeyer previamente tarado (250 ml) e o solvente evaporado em banho-maria a 60°C. A massa de soluto (óleo) foi determinada por diferença de peso, e acondicionada em vidros lacrados e congelada para posteriores análises do colesterol.

Para o estudo de equilíbrio "prático" o procedimento foi análogo ao descrito no parágrafo anterior, incluindo a determinação da massa de solução (solvente + soluto) aderida ao sólido inerte. A massa de solvente, tanto do sólido que ficou retido no papel de filtro e no frasco erlenmeyer, foi determinada por diferença de peso após evaporação do solvente em estufa ventilada a 60°C por 4 h (peso constante). A massa do soluto restante foi determinada pela diferença entre a massa inicial e a extraída.

#### 4.5- PLANEJAMENTO PARA OTIMIZAÇÃO POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Consiste em um grupo de técnicas em que o mínimo de ensaios pode produzir um máximo de informação, tornando-se portanto, um valioso instrumento para economia de gastos e tempo com o projeto. Estas técnicas, segundo KHURI & CORNELL (1987) compreendem:

- a) montagem de um planejamento com as variáveis e respectivos níveis sob estudo e medida das respostas,
- b) determinação de um modelo matemático que melhor se ajusta aos dados experimentais, acompanhado por testes de hipóteses concernentes aos parâmetros do modelo,
- c) determinação dos níveis ótimos das variáveis que produzem o máximo ou mínimo valor na resposta.

A metodologia seguida foi a preconizada por BOX et alii (1978). O primeiro passo consistiu em um planejamento fatorial de  $2^n$  experimentos com triplicata no ponto central, onde n é o número de variáveis envolvidas, as quais foram analisadas em 2 níveis. O ponto central é necessário para o cálculo do desvio padrão, útil

na eliminação de variáveis, cujos valores dos efeitos sejam menores que o mesmo. Na presente pesquisa foram estudadas as seguintes variáveis: L/S (g de solvente/g de gema), temperatura (T), velocidade de agitação (N) e tempo de contato (t), totalizando 19 experimentos. (Ensaio 1-19). A resposta analisada foi o rendimento da extração do colesterol, definido como sendo a razão entre a massa extraída e a massa inicial e expresso em porcentagem (%).

Mediante análise do primeiro passo pelo PROGRAMA FATORIAL, de SCARMINIO & BRUNS (1989) e análises estatísticas, foi estabelecido para o segundo passo um delineamento central composto rotacional de segunda ordem, o qual incluiu dois níveis de variáveis axiais (+ $\alpha$  e - $\alpha$ ), cujos valores são definidos pela equação:

$$\alpha = \pm (2^k)^{1/4} \quad (8)$$

onde k é o número de variáveis em estudo; no caso presente foram consideradas as variáveis com efeitos estatisticamente significativos (L/S e T). Assim, o valor de  $\alpha$  utilizado foi  $\pm 1,414$ . Nestes ensaios (20-30) a velocidade de agitação e tempo de contato foram mantidos constantes nos valores mínimos (100 rpm e 2 minutos). Para análise da validade do modelo foram utilizados o PROGRAMA TREND, dos mesmos autores e o procedimento NLIN do programa SAS (1985).

Os valores reais e codificados atribuídos às variáveis estão representados nas TABELAS 4 (planejamento fatorial) e 5 (planejamento composto rotacional de segunda ordem). De posse desses valores foram construídas as TABELAS 6 e 7, representativas dos respectivos ensaios.

A codificação de variáveis (CV) é dada pela seguinte expressão:

$$CV = \frac{VR(+)-VR(PC)}{\Delta VR} \quad (9)$$

TABELA 4 - VALORES REAIS E CODIFICADOS ATRIBUÍDOS À VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Nível	L/S (g/g)	T (°C)	N (rpm)	t (min)
-1	2/1	25	100	2
+1	8/1	35	200	30
PC	5/1	30	150	16

TABELA 5 - VALORES REAIS E CODIFICADOS ATRIBUÍDOS À VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO ROTACIONAL DE SEGUNDA ORDEM

Nível	L/S (g / g )	T (°C)
-1	5/1	20
+1	11/1	30
PC	8/1	25
-1,414	3,74/1	18
+1,414	12,24/1	32

TABELA 6 - ESPECIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA PLANEJAMENTO FATORIAL

Ordem	Ensaio	$x_1$	L/S (g/g)	$x_2$	T (°C)	$x_3$	N (rpm)	$x_4$	t (min)
5	1	-1	2/1	-1	25	-1	100	-1	2
19	2	+1	8/1	-1	25	-1	100	-1	2
6	3	-1	2/1	+1	35	-1	100	-1	2
9	4	+1	8/1	+1	35	-1	100	-1	2
17	5	+1	2/1	-1	25	+1	200	-1	2
15	6	+1	8/1	-1	25	+1	200	-1	2
8	7	-1	2/1	+1	25	+1	200	-1	2
10	8	+1	8/1	+1	35	+1	200	-1	2
16	9	-1	2/1	-1	25	-1	100	+1	30
14	10	+1	8/1	-1	25	-1	100	+1	30
2	11	-1	2/1	+1	35	-1	100	+1	30
11	12	+1	8/1	+1	35	-1	100	+1	30
12	13	-1	2/1	+1	25	+1	200	+1	30
18	14	-1	8/1	-1	25	+1	200	+1	30
7	15	-1	2/1	+1	35	+1	200	+1	30
3	16	+1	8/1	+1	35	+1	200	+1	30
13	17	0	5/1	0	30	0	150	0	16
4	18	0	5/1	0	30	0	150	0	16
1	19	0	5/1	0	30	0	150	0	16

TABELA 7 - ESPECIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA PLANEJAMENTO COMPOSTO ROTACIONAL DE SEGUNDA ORDEM

Ordem	Ensaio	$x_1$	L/S (g/g)	$x_2$	T (°C)
23	20	-1	5/1	-1	20
24	21	+1	11/1	-1	20
20	22	-1	5/1	+1	30
21	23	+1	11/1	+1	30
28	24	0	8/1	0	25
29	25	0	8/1	0	25
26	26	-1,4	3,74/1	0	25
27	27	+1,4	12,24/1	0	25
22	28	0	8/1	+1,4	32
25	29	0	8/1	-1,4	18
30	30	0	8/1	0	25

onde VR - valor da variável real

$$\Delta VR = \frac{VR(+)-VR(-)}{2}$$

Assim, para a primeiro passo temos:

$$x_1 = \frac{L/S - 5/1}{3/1}$$

$$x_2 = \frac{T - 30}{5}$$

$$x_3 = \frac{N - 150}{50}$$

$$x_4 = \frac{t - 16}{14}$$

Para o segundo passo :

$$x_1 = \frac{L/S - 8/1}{3/1}$$

$$x_2 = \frac{T - 25}{5}$$

#### 4.6- ESTUDOS DE EQUILÍBRIO

Envolve a construção dos diagramas de solubilidade e curva de distribuição, feitos a partir de uma série de extrações (em triplicata) variando a razão de L/S (2/1, 4/1, 6/1, 8/1, 10/1, 12/1). A construção destes gráficos considera o sistema ternário (solvente, soluto e inertes). Como se trata na realidade de uma extração multicomponente (glicerídeos, colesterol, fosfolipídeos e outros lipídeos), o soluto considerado será o extrato lipídico, cuja pureza foi testada pelo método de BLIGH & DYER (1959).

Foi feito um estudo preliminar para determinar o tempo de equilíbrio prático, objetivando máxima extração do colesterol e manutenção da propriedade emulsificante. Para tal, utilizou-se de um planejamento fatorial completo, de 2 níveis e 2 variáveis independentes: L/S e tempo, com triplicata no ponto central, cujos

valores reais e codificados estão apresentados na TABELA 8. A temperatura utilizada foi 25<sup>o</sup>C e a velocidade de agitação 100 rpm, pois conforme indicou o modelo de superfície de resposta, estas condições permitem um rendimento satisfatório na extração do colesterol e além disso, reduzem os gastos para obtenção do produto. As respostas analisadas foram a massa do colesterol extraído e propriedade emulsificante.

TABELA 8 - ESPECIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO PRÁTICO

ORDEM	ENSAIO	$x_1$	L/S (g/g)	$x_2$	t (min)
3	1	-1	2/1	-1	15,0
7	2	+1	12/1	-1	15,0
2	3	-1	2/1	+1	300,0
6	4	+1	12/1	+1	300,0
5	5	0	7/1	0	157,5
1	6	0	7/1	0	157,5
4	7	0	7/1	0	157,5

#### 4.7- INFLUÊNCIA DA EXTRAÇÃO SOBRE AS RESPOSTAS: COLESTEROL E FOSFOLIPÍDEOS EXTRAÍDOS E PROPRIEDADE EMULSIFICANTE.

Utilizando os ensaios para o estudo de equilíbrio "prático", 3 níveis de L/S foram escolhidos para comparação com a amostra controle (gema desidratada), a fim de verificar a

influência da extração nestas respostas. Para tal utilizou-se o procedimento ANOVA do programa SAS (1985).

Este estudo também foi útil na determinação do nível ótimo de extração, o qual conjugou rendimento satisfatório na extração do colesterol e boa propriedade emulsificante para o produto obtido.

#### 4.8- ANÁLISES QUÍMICAS

As análises foram feitas em duplicata ou triplicata conforme a metodologia utilizada.

##### 4.8.1- Umidade

Método gravimétrico segundo normas da USDA, STADELMAN & COTTERILL (1986)

##### 4.8.2- Lipídeos totais

Método baseado na extração com clorofórmio, metanol e água, BLIGH & DYER (1959).

##### 4.8.3- Colesterol

Segundo o método colorimétrico de BAIR & MARION (1978), cuja curva de calibração se encontra no APÊNDICE A-1.

##### 4.8.4- Fosfolipídeos

O extrato lipídico adicionado de óxido de zinco foi reduzido a cinzas em mufla na presença de óxido de zinco, e o fósforo dosado por colorimetria, AOCS, Ca-12-55 (a curva de calibração se encontra no APÊNDICE A-2). O fator de conversão de fósforo inorgânico para fosfolipídeos foi calculado segundo o método de CHAPMAN (1980), utilizando a composição fosfolipídica apresentada por STADELMAN & COTTERILL (1986) e NAVARRO et alii



(1972).

#### 4.9- PROPRIEDADE EMULSIFICANTE

Foi avaliada nas condições de equilíbrio já especificadas, utilizando a metodologia conjugada de LIEU et alii (1978) e YANG & COTTERILL (1989). Baseia-se na determinação da estabilidade da emulsão de maionese, mantida 5 dias à temperatura ambiente, cujo resultado é expresso em g de óleo liberado/5 g de maionese.

#### 4.10- ANÁLISE SENSORIAL

Utilizou-se um teste de aceitação a nível laboratório conforme a metodologia descrita por STONE & SIDEL (1985). Este teste utilizou 30 consumidores não treinados para a prova da maionese, feita com gema desidratada com baixo teor de colesterol e uma maionese padrão (Hellmans). A aceitação destas maioneses foi avaliada por uma escala hedônica de 9 pontos para os seguintes parâmetros: aparência, sabor, aroma e textura. Os modelos de fichas estão apresentados nas FIGURAS 6 e 7. Os resultados foram avaliados por regressão linear (fontes de variação: provadores e amostras), utilizando o procedimento GLM do programa SAS (1985) e teste de TUKEY ( $p \leq 0,05$ ).

A preparação da gema desidratada com baixo teor de colesterol (13% nas condições de  $L/S = 12$ ,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 15$  min e  $N = 100$  rpm) consistiu na evaporação do solvente retido no produto em estufa ventilada a  $60^{\circ}\text{C}$  até peso constante, e reconstituição do mesmo na razão de 1:1,5 de gema e água, respectivamente. A homogeneização da gema foi feita em gral com pistilo, e com esta foi formulada uma maionese-teste empregando-se outros componentes: sal, solução ácido cítrico 1%, óleo e alguns condimentos.

ESCALA HEDÔNICA

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Avalie o aroma, sabor e textura das duas amostras codificadas de maionese e indique usando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou de cada uma delas. Por favor enxague a boca entre uma amostra e outra.

- 9- Gostei MUITÍSSIMO
- 8- Gostei Muito
- 7- Gostei Regularmente
- 6- Gostei Ligeiramente
- 5- Indiferente
- 4- Desgostei Ligeiramente
- 3- Desgostei Regularmente
- 2- Desgostei Muito
- 1- Desgostei MUITÍSSIMO

Amostra

Valor

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Indique o que você mais gostou, e o que você menos gostou em cada amostra.

Amostra

mais gostei

menos gostei

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

FIGURA 6-FICHA MODELO PARA ANÁLISE DA ACEITACÃO

## ESCALA HEDÔNICA

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Avalie a aparência das duas amostras codificadas de maionese e indique usando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou de cada uma delas.

- 9- Gostei MUITÍSSIMO
- 8- Gostei Muito
- 7- Gostei Regularmente
- 6- Gostei Ligeiramente
- 5- Indiferente
- 4- Desgostei Ligeiramente
- 3- Desgostei Regularmente
- 2- Desgostei Muito
- 1- Desgostei MUITÍSSIMO

Amostra

Valor

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Indique o que você mais gostou, e o que você menos gostou na aparência de cada amostra.

Amostra

mais gostei

menos gostei

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

FIGURA 7- FICHA MODELO PARA ANÁLISE DA ACEITAÇÃO

#### 4.11- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os critérios utilizados para julgamento da adequação do modelo aos dados experimentais foram de acordo com KHURI & CORNELL (1987):

- o teste de Fisher, ou  $F$ , que compara variância dos dados experimentais devido ao modelo e devido aos erros (erro puro e falta de ajuste do modelo) e permite afirmar estatisticamente se a variância devido ao modelo é significativa ou não, a um dado nível de probabilidade. Isto se faz comparando o valor de  $F$  calculado com o valor de  $F$  tabelado para um dado nível de probabilidade. Se o valor calculado for maior que o tabelado, rejeita-se a hipótese da nulidade, isto é, as variações nos valores dos resultados são devidas significativamente ao modelo. O valor de  $F$  é dado pela equação:

$$F = \frac{MSQR}{MSQE} = \frac{SQR/(P-1)}{SQE/(NE-P)} \quad (10)$$

onde,

MSQR = média da soma dos quadrados devido à regressão

MSQE = média da soma dos quadrados devido ao erro (ou desvio, ou resíduo)

SQR = soma dos quadrados devido à regressão

SQE = soma dos quadrados devido ao erro

(P-1) = graus de liberdade associado a SQR

(NE-P) = graus de liberdade associado a SQE

P = número de parâmetros do modelo

NE = número de experimentos realizados

- o valor do coeficiente de determinação  $R^2$ , avalia em termos quantitativos o quanto a variância dos dados experimentais (ou respostas) é explicada pelo modelo ajustado (ou regressão). Quanto mais próximo da unidade for este valor, melhor é o ajuste.

O valor de  $R^2$  é dado pela equação:

$$R^2 = SQR/SQT \quad (11)$$

onde SQT é a soma dos quadrados totais (SQR+SQE).

Para comparação de médias utilizou-se o teste de TUKEY, por ser o mais rigoroso dos testes, PIMENTEL GOMES (1987). Ele compara 2 médias entre si. Como as médias foram estimadas com o mesmo número de repetições, a diferença mínima significativa (DMS) é dada por:

$$MS = \Delta = q_{\alpha; P, NE-P}^{1/2} (MSQE/r) \quad (12)$$

onde,

$MSQE^{1/2}$  = estimativa do desvio padrão do erro (ou resíduo)

$r$  = número de repetições

$q_{\alpha; P, NE-P}$  = valor da amplitude total estudentizada, em um nível  $\alpha$  de probabilidade, obtido na tabela de TUKEY, em função do número de tratamentos ( $P$ ) e do número do grau de liberdade do erro ( $NE-P$ ).

Se a diferença entre as médias for maior que  $\Delta$  a diferença é significativa.

## 5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Componentes dosados da gema em pó

Os componentes dosados da gema estão apresentados na TABELA 9.

TABELA 9- COMPONENTES DA GEMA (% base seca)

Umidade	Lipídeos	Fosfolipídeos	Colesterol
2,70	61,12	14,04	2,60

O teor de lipídeos para gema desidratada varia de 60-64,4% segundo LIEU et alii (1978) e CHUNG & FERRIER (1991). Em relação aos fosfolipídeos, os valores encontrados na literatura, principalmente quando a técnica de dosagem é colorimétrica, são variáveis, pois os fatores de conversão do fósforo inorgânico para fosfolipídeos diferem. LIEU et alii (1978), utilizaram 2 fatores diferentes para exprimir o teor dos fosfolipídeos em termos de lecitina e cefalina para a gema em pó: 25,64 e 26,88, resultando valores de 13,13 e 13,64, respectivamente. O fator utilizado no presente trabalho foi de 22,127, um valor médio, cujo cálculo (APÊNDICE A-3) levou em consideração a quase totalidade dos fosfolipídeos presentes na gema. Tomando o valor calculado em relação aos lipídeos encontramos 23%, resultado este igual ao apresentado por STADELMAN & COTTERIL (1986).

Em relação ao colesterol, WARREN et alii (1988), utilizando o método de HPLC encontraram valores iguais a 2,95%. Considerando a gema líquida com 50% de umidade, o valor do colesterol encontrado é de 1300 mg/100g de gema, resultado que se encontra na faixa dos valores citados na literatura consultada

(1012-1890 mg/100g), HUBBARD et alii (1977), BAIR & MARION (1978), TORKASKA & CLANDINI (1985), e FRONING et alii. (1990).

## 5.2- Otimização do processo por Superfície de Resposta

### a) Planejamento Fatorial

Os resultados do rendimento da extração do colesterol são mostrados na TABELA 10 e, a estimativa dos efeitos das variáveis estudadas é apresentada na TABELA 11. O desvio padrão do experimento ( $\delta_{n-1}$ ) foi de 7,9037 e o erro padrão dos efeitos foi de 3,9519 (vide métodos de cálculos no APÊNDICE B-1). Se considerarmos este erro padrão, observamos que as variáveis significativas, cujos valores das estimativas dos efeitos são maiores que o mesmo, são a razão de solvente para sólido (L/S) e a temperatura do sistema (T). As interações significativas são: L/S versus T e velocidade de agitação (N) versus tempo de contato (t). Verifica-se também que L/S e T influenciam a extração de forma antagônica; enquanto L/S exerce efeito positivo sobre o rendimento, o aumento da temperatura diminui o rendimento. É óbvio que se estamos aumentando a quantidade de solvente para uma mesma massa de sólidos, estamos elevando o potencial de dissolução do soluto pelo aumento do gradiente de concentração entre as fases. Com relação à temperatura, esperava-se que com a elevação da mesma houvesse maior solubilidade do colesterol. Entretanto, os resultados contrários aos esperados, sugerem que a maior solubilização de outros constituintes de alguma forma interferem na extração do colesterol e, merece ser estudado para entendimento ou estabelecimento de mecanismos que controlem este processo.

Ao nível de 95% de confiança ( $t_{2;0,05} = 4,303$ ) o valor do erro padrão passa a ser 17,0048, e sob esta consideração, a única variável de efeito significativo é L/S.

Baseado na análise destes resultados, a razão de sólidos

TABELA 10- RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO COLESTEROL

ENSAIO	RENDIMENTO (%)
1	24,3764
2	66,6262
3	26,1701
4	47,2042
5	36,7889
6	62,6746
7	33,8065
8	59,8752
9	36,9615
10	69,6033
11	26,3211
12	50,0232
13	27,7428
14	64,3408
15	29,7954
16	51,0927
17	61,3320
18	46,2952
19	58,0360



TABELA 11- ESTIMATIVA DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL

PARÂMETRO	ESTIMATIVA DO EFEITO
Média	44,5877
L/S	28,6847
T	-8,1033
L/S x T	-5,6591
N	2,3539
L/S x N	-1,2223
T x N	3,8589
L/S x T x N	1,8797
t	-0,2052
L/S x t	-0,1249
T x t	-2,2507
L/S x T x t	-0,4010
N x t	-4,8382
L/S x N x t	1,6101
T x N x t	0,8973
L/S x T x N x t	-3,4700

para solvente (L/S) e temperatura (T) foram as variáveis escolhidas para a construção da superfície de resposta ou planejamento rotacional composto de segunda ordem, onde se manteve constante a agitação e tempo de contato nos valores otimizados: 100 rpm e 15 minutos, respectivamente.

#### b) Planejamento Composto Rotacional de Segunda Ordem

Os resultados desse planejamento para o rendimento da extração do colesterol são apresentados na TABELA 12.

Aplicando-se regressão linear múltipla para teste de um modelo de primeira ordem aos experimentos 20-25 e 30 (programa TREND de SCARMINIO & BRUNS, 1989), obtivemos a equação:

$$\hat{Y} = 76,63 \left( \pm 1,63 \right) + 13,60 \left( \pm 2,16 \right) x_1 - 2,17 \left( \pm 2,16 \right) x_2 \quad (13)$$

O método de cálculo dos valores dos desvios de cada termo da equação é ilustrado no APÊNDICE B-2.

A análise de variância para este modelo, apresentada na TABELA 13, é útil para se determinar a validade do mesmo.

O valor de  $F$  tabelado ( $F_{0,99;2;4}$ ) a 99% de confiança é 18 e valor  $F$  calculado para o modelo é 19,8896, portanto ligeiramente superior ao valor tabelado. Assim, o modelo de primeira ordem ajusta-se aos dados, explicando 90,86% da variância das respostas obtidas experimentalmente.

Conforme já discutido no planejamento fatorial, estes novos experimentos confirmam que o aumento da temperatura diminui o rendimento da extração do colesterol, mas seu efeito é bem inferior quando comparado ao da razão de solvente para sólido.

TABELA 12- RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO COLESTEROL

ENSAIO	RENDIMENTO (%)
20	64,2860
21	89,4625
22	57,9050
23	87,1457
24	79,6963
25	83,2672
26	57,1887
27	88,9377
28	84,1036
29	94,5386
30	74,5386

TABELA 13- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO LINEAR

FONTE DE VARIACÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
Regressão	759,2221	2	379,6111	19,8896*
Resíduos	76,3438	4	19,0859	
Falta de ajuste	38,9939	2	19,4970	1,0440 <sup>ns</sup>
Erro puro	37,3498	2	18,6749	
Total	835,5659	6		

Coefficiente de determinação ( $R^2$ ): 0,9086

\*- Significativo ao nível de 1% de significância

ns- Não significativo ao nível de 1% de probabilidade

Adicionando os experimentos 26-29, um modelo de segunda ordem foi obtido:

$$\hat{Y} = 79,21 \left( \begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix} 2,50 \right) + 12,43 \left( \begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix} 1,53 \right) x_1 - 2,93 \left( \begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix} 1,53 \right) x_2 \quad (14) \\ - 4,71 \left( \begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix} 1,82 \right) x_1^2 + 3,44 \left( \begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix} 1,82 \right) x_2^2 + 1,02 \left( \begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix} 2,12 \right) x_1 x_2$$

Pela análise de variância (TABELA 14) e aplicação do teste  $F$  ao nível de 1% de probabilidade, a regressão é significativa, portanto o modelo se ajusta aos dados ( $F$  tabelado: 10,97) e explica 92,01% da variância das respostas obtidas experimentalmente.

Como ambos os modelos se adequam aos dados, os critérios para escolha do melhor modelo, o qual deverá ser melhor ajustado, serão: coeficiente de correlação e a presença de termos importantes no processo de extração. Então observamos que o modelo quadrático (ou segunda ordem) apresentou um coeficiente de determinação de 0,92, ligeiramente superior ao modelo linear ( $R^2 = 0,91$ ) e incluiu entre seus termos, de forma significativa em relação ao desvio, a temperatura. Portanto, o modelo quadrático foi alvo do processo de ajuste da melhor forma possível, o qual consistiu na eliminação dos termos, cujos desvios foram maiores que o valor do coeficiente do termo. Após esta etapa aplicou-se uma nova análise de variância, com julgamentos de  $F$  e  $R^2$ .

Observou-se que o erro experimental para o termo  $x_1 x_2$  é maior do que o coeficiente que o multiplica, significando que a interação entre os fatores  $x_1$  e  $x_2$  é desprezível. Eliminando-se este termo um novo ajuste foi feito por regressão não linear (APÊNDICE B-3), utilizando o procedimento NLIN do programa SAS (1985). A respectiva análise de variância (TABELA 15) mostrou que o modelo melhorou o ajuste aos dados experimentais (mais alto valor de  $F$  e redução do quadrado médio do resíduo) e explica 99,88% da variância das respostas.

TABELA 14- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MODELO QUADRÁTICO

FONTE DE VARIACÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
Regressão	1576,8320	5	315,3664	11,5130*
Resíduos	136,9609	5	27,3922	
Falta de ajuste	99,6111	3	33,2037	1,7780 <sup>ns</sup>
Erro puro	37,348	2	18,6749	
Total	1713,7930	10		

Coefficiente de determinação ( $R^2$ ): 0,9201

\*- Significativo ao nível de 1% de probabilidade

ns- Não significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 15- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MODELO QUADRÁTICO CORRIGIDO

FONTE DE VARIACÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
Regressão	68987,1006	5	13797,4201	586,84*
Resíduos	141,0652	6	23,5114	
Total (não corrigido)	69128,1691	11		
Total corrigido	1713,7772	10		

Coeficiente de determinação ( $R^2$ ): 0,9988

\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade (F tabelado:8,75)

A equação resultante após o ajuste é apresentada abaixo:

$$\hat{Y} = 79,21 \begin{pmatrix} + \\ - \end{pmatrix} 2,80 + 12,43 \begin{pmatrix} + \\ - \end{pmatrix} 1,71 x_1 - 2,93 \begin{pmatrix} + \\ - \end{pmatrix} 1,71 x_2 - 4,71 \begin{pmatrix} + \\ - \end{pmatrix} 2,04 x_1^2 + 3,44 \begin{pmatrix} + \\ - \end{pmatrix} 2,04 x_2^2 \quad (15)$$

Substituindo os valores de  $x_1$  e  $x_2$  na equação (15), onde

$$x_1 = \frac{L/S - 8/1}{3/1} \quad e$$

$$x_2 = \frac{T - 25}{5}$$

obtivemos a seguinte equação para expressar o rendimento (%) da extração do colesterol ( $\eta$ ) em função das variáveis reais:

$$\eta = 113,1188 + 12,5148L/S - 7,4564T - 0,5232(L/S)^2 + 0,1374T^2 \quad (16)$$

As linhas de contorno e superfície de resposta geradas pela equação (16) são apresentadas nas FIGURAS 8a e 8b, mostrando que é possível obter um mesmo rendimento para diferentes condições de temperatura e L/S, cuja escolha dependerá, em última análise, de conveniências técnicas (altos rendimentos podem implicar perda de propriedades funcionais, redução no valor nutricional, etc.) e econômicas (custo de refrigeração, etc.) do processo. Observa-se que maiores rendimentos de extração do colesterol são obtidos pelo abaixamento da temperatura e elevação da razão de solvente para sólidos (L/S). Pela análise da superfície de resposta e do modelo em si, nota-se que o rendimento é bastante sensível às mudanças de L/S em comparação com a temperatura. Por esta razão e devido também às já mencionadas conveniências, a temperatura adequada para este processo foi a temperatura ambiente, no nosso caso, é



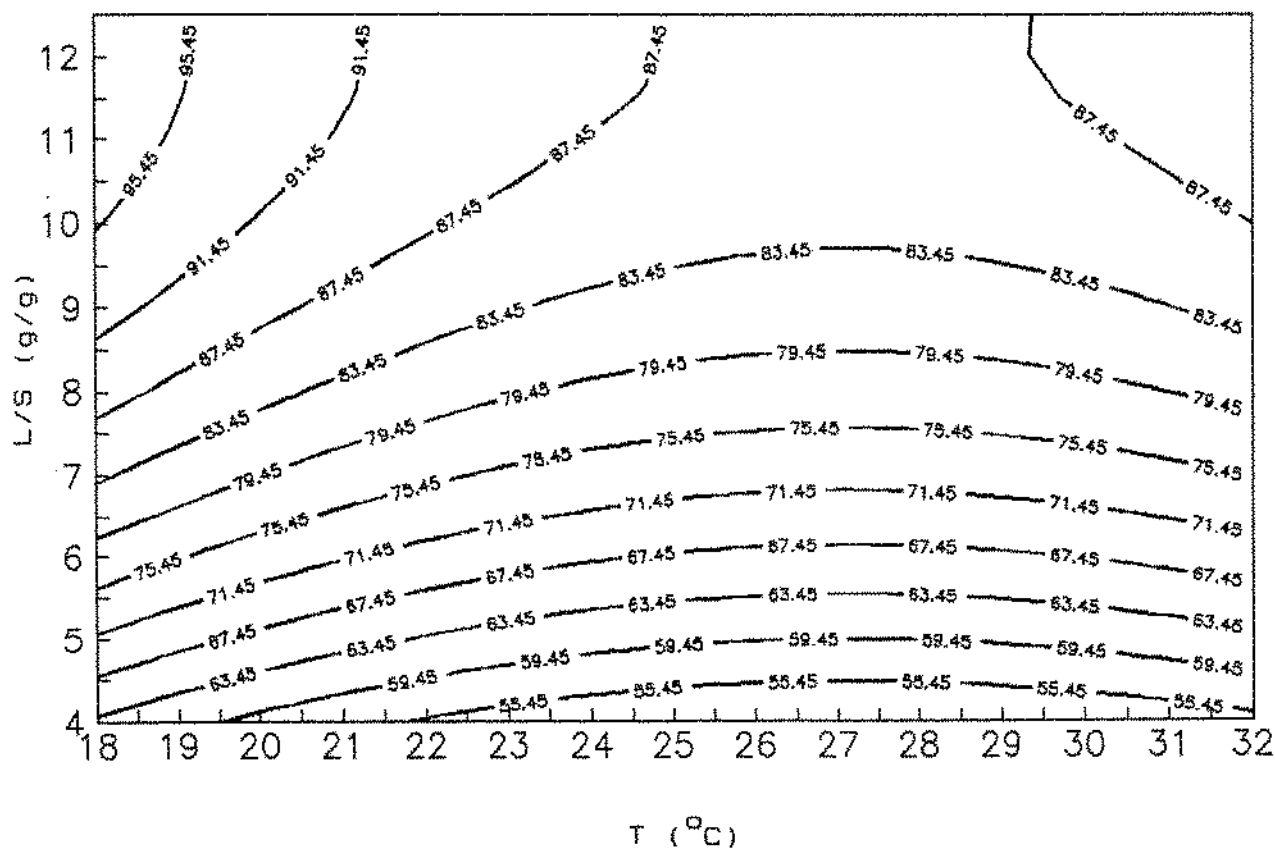


FIGURA 8a- LINHAS DE CONTORNO REPRESENTANDO O RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO COLESTEROL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E L/S

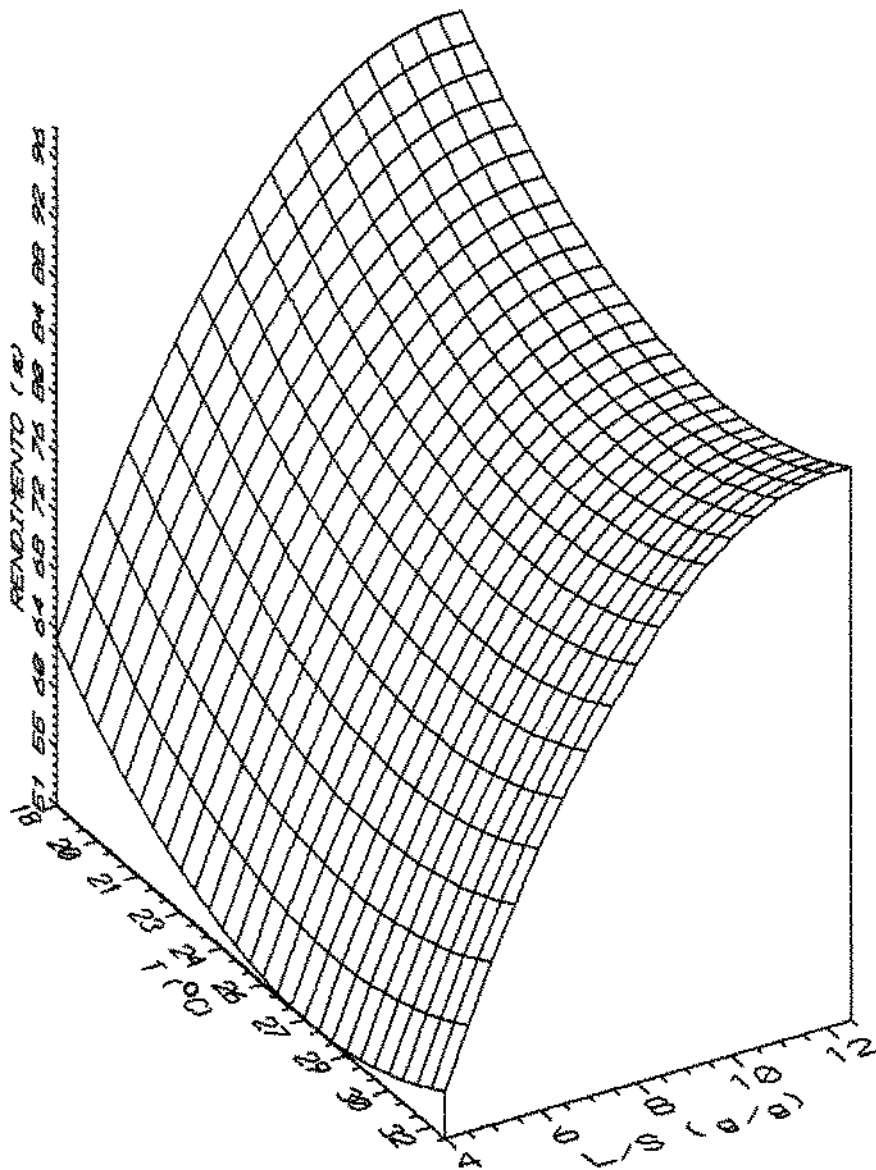


FIGURA 8b- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA REPRESENTANDO O RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO COLESTEROL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E L/S

25°C, e o rendimento máximo obtido dentro da faixa de variação de L/S foi de 87,32%.

Comparando este rendimento com os encontrados por WARREN et alii, (1988) usando hexano (66,27%) e FRONING et alii, 1990, usando CO<sub>2</sub> no estado supercrítico (65,76%), verificou-se que a utilização da acetona como solvente torna o processo de extração do colesterol altamente promissor, devido ao alto rendimento que pode ser obtido nestas condições.

### 5.3- Determinação do tempo de equilíbrio "prático"

A TABELA 16 mostra os resultados para as respostas: massa de colesterol extraído e propriedade emulsificante (ou estabilidade da emulsão), e a TABELA 17 mostra os valores dos efeitos para ambas as respostas. Para a quantidade de colesterol extraído o desvio padrão dos efeitos foi de 16,9975, indicando que o tempo de contato não teve efeito significativo, apenas a sua interação com L/S. No intervalo de confiança de 95% o erro padrão aumenta para 73,14 e a interação não tem mais efeito significativo. Análise similar para a propriedade emulsificante, cujo erro padrão do efeito foi de 0,1308 e 0,5628 no mesmo intervalo de confiança, mostrou que considerando o último erro padrão, ambos os efeitos não são significativos.

### 5.4- Equilíbrio "prático"

Os dados experimentais para o equilíbrio "prático" com tempo de contato de 15 minutos, 25°C e 100 rpm, estão resumidos no APÊNDICE C-1.

O óleo foi o soluto considerado para construção do diagrama de solubilidade e curva de distribuição, com pureza de

TABELA 16- MASSA DE COLESTEROL EXTRAÍDO E ESTABILIDADE DA EMULSÃO NA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO "PRÁTICO"

ENSAIO	COLESTEROL (mg/10g gema)	ESTABILIDADE DA EMULSÃO (g óleo/5g emulsão)
1	82,0464	0,7298
2	165,6223	0,4157
3	69,1200	0,8520
4	209,0686	0,4141
5	189,2930	0,6013
6	177,6434	0,5965
7	192,6420	0,3724

TABELA 17- ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA MASSA DE COLESTEROL EXTRAÍDO E ESTABILIDADE DA EMULSÃO

EFEITO	VALOR DA ESTIMATIVA	
	COLESTEROL	ESTABILIDADE DA EMULSÃO
Média	131,4643	0,6029
L/S	111,7623	-0,3760
t	15,2600	0,0603
L/S x t	28,1864	-0,0619

99,966%, segundo o teste de BLIGH & DYER (1959).

A FIGURA 9 mostra o diagrama de solubilidade para o sistema gema-acetona. Nota-se que a razão da massa de inertes pela solução retida (N) é constante em função da concentração desta solução. Como a massa de inertes não varia durante o processo, isto implica que a massa de solução retida será constante. Segundo ABRAHAM et alii (1988), solventes polares que solubilizam parcialmente o óleo facilitam a drenagem com o aumento da concentração deste (aumenta o valor de N), pois a polaridade, que é responsável pela adsorção do solvente ao sólido, é diminuída com a sua incorporação. Neste caso pode-se dizer que a polaridade não foi afetada pela faixa de concentração deste estudo e por isso o valor N permaneceu constante. A análise de variância e teste de TUKEY para N em função do valor  $Y_n$  se encontra no APÊNDICE C-2.

A FIGURA 10 mostra a curva de distribuição para o referido sistema, a qual se situa acima da diagonal, significando que a concentração do soluto no refinado ( $Y_n$ ) é maior que no extrato ( $X_n$ ), pois há adsorção preferencial do soluto pela matriz sólida. A relação de  $Y_n$  em função de  $X_n$  é dada pela equação:

$$Y_n = 0.6074 X_n^{0.4666} \quad (16)$$

O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9968 e a análise de variância para o modelo é apresentada na TABELA 18. O procedimento NLIN do programa SAS (1985) utilizado para obtenção da regressão está no APÊNDICE C-3

### 5.5-Simulação de um sistema de extração contracorrente

O sistema de extração contracorrente, ilustrado na FIGURA 11, compreende uma série de contadores e separadores,

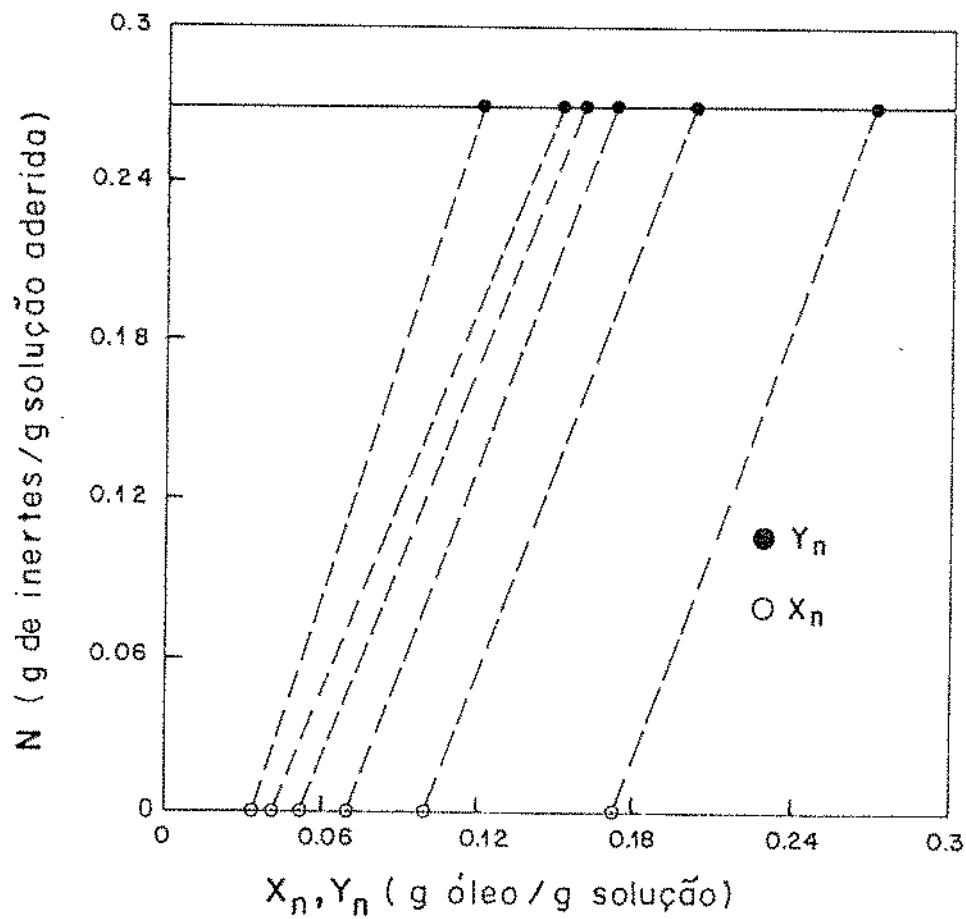
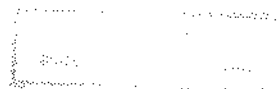


FIGURA 9- DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE PARA GEMA-ACETONA



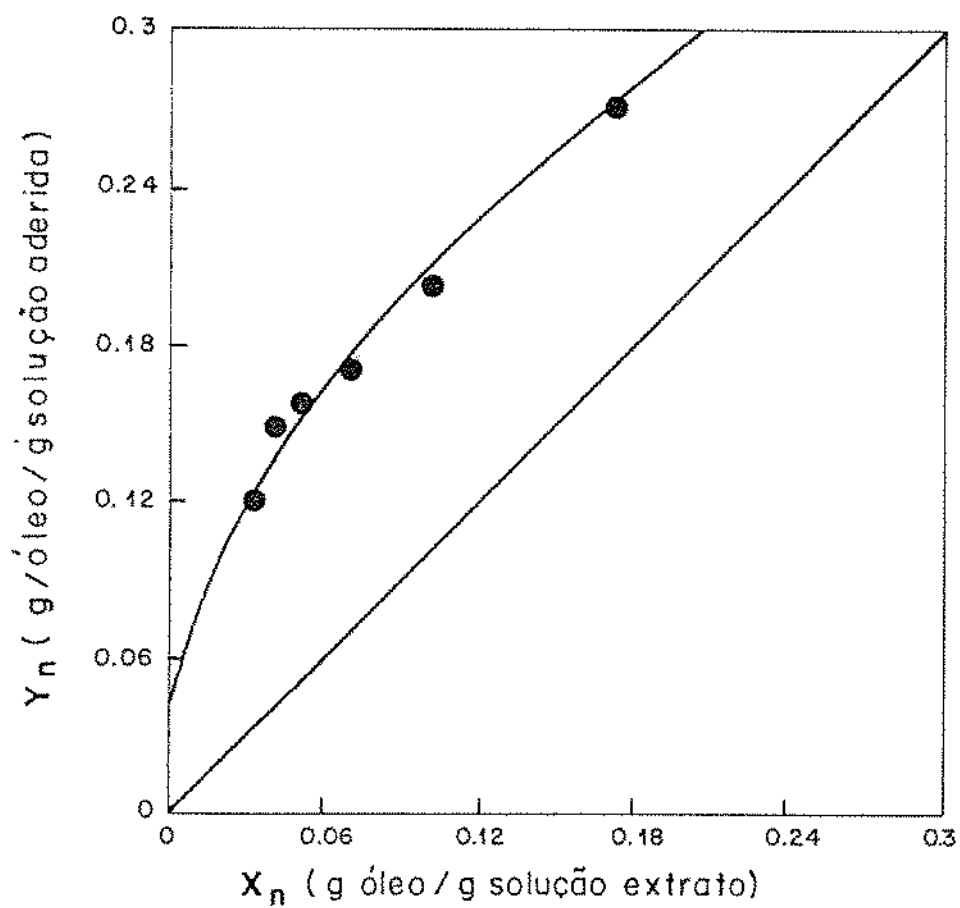


FIGURA 10- CURVA DE DISTRIBUIÇÃO PARA GEMA-ACETONA

TABELA 18- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA CURVA DE DISTRIBUIÇÃO

FONTE DE VARIACÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
Regressão	0,2036	2	0,1018	623,47*
Resíduos	0,0006	4	0,0002	
Total (não corrigido)	0,2043	6		
Total corrigido	0,0135	5		

\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

$$F_{0,99;2;4} = 18,0$$



SÓLIDOS A SEREM

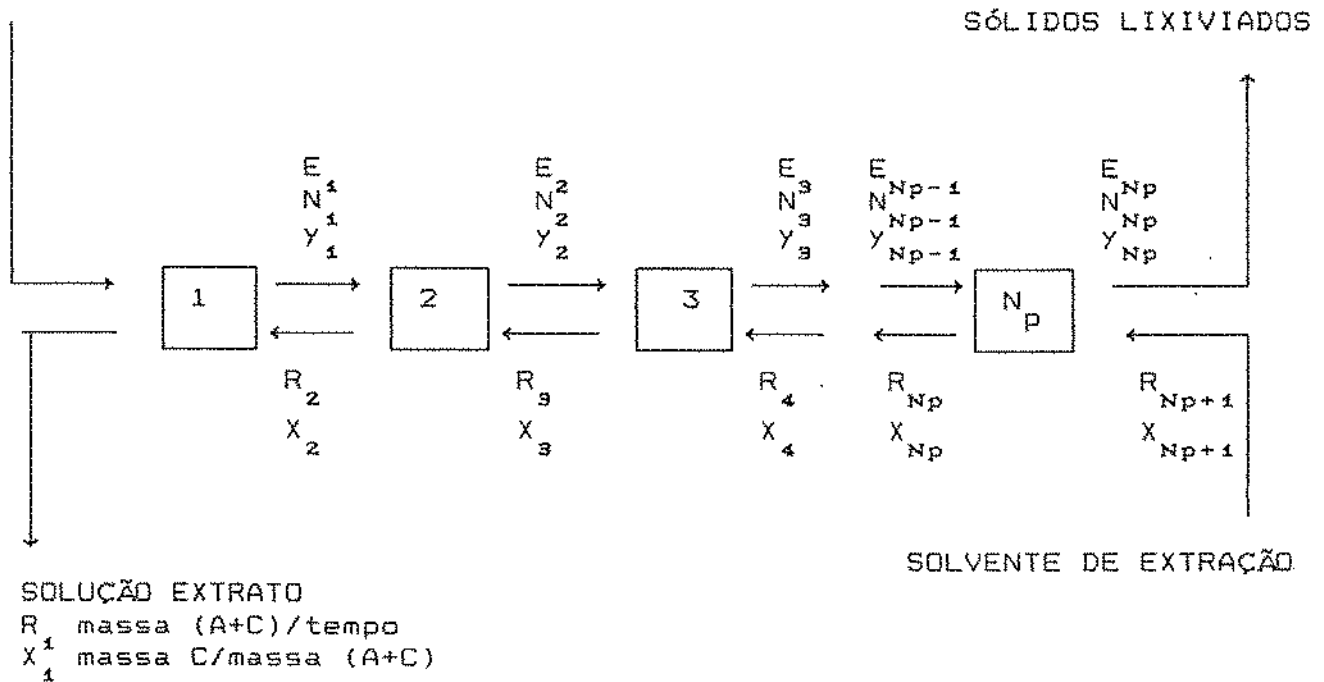
LIXIVIADOS

B massa de insolúvel/tempo

F massa (A+C)/tempo

N massa B/massa (A+C)

$Y_F$  massa C/massa (A+C)



onde A- solvente, B- insolúvel (ou inertes) e C- soluto

FIGURA 11- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM SISTEMA DE EXTRAÇÃO CONTRACORRENTE (TREYBAL, 1980)

operando continuamente e em regime permanente. O escoamento das correntes (superior e inferior) em contracorrente permite controlar o gradiente de concentração de modo que a extração pode continuar até mesmo quando a concentração do soluto é baixa. Isto facilita a recuperação mais completa do soluto (maiores rendimentos) quando comparada com a que é atingida por sistema único ou multiestágio cocorrente, BRENAN et alii (1976).

Com a utilização dos dados de equilíbrio, conhecendo a quantidade de alimentação (F+B) e sua concentração em inertes e solúveis, e aplicação do balanço de massa global e nos estágios, é possível estimar o número de estágios teóricos necessários para alcançar um dado rendimento para determinada quantidade de solvente utilizada. Neste caso, como os dados de equilíbrio se referem ao total de soluto extraído, e o rendimento de interesse é o da massa de colesterol, é necessária uma correlação entre a fração mássica (base livre de inertes) do colesterol no refinado ( $Y_c$ ) e a fração mássica dos solutos restantes ( $Y_{sr}$ ). Esta relação é apresentada na FIGURA 12. O procedimento NLIN do programa SAS (1985) e análise de variância para o modelo estão apresentados no APÊNDICE C-4.

Utilizando estes dados, um programa em BASIC (APÊNDICE D) foi elaborado para estimar o número de estágios teóricos (NET), a massa de extrato final ( $R_1$ ) e a concentração ( $X_1$ ), para 1 kg de alimentação. Os parâmetros variáveis foram: rendimento e massa de solvente. O programa também permite a utilização dos parâmetros  $R_1$  ou  $X_1$  para a determinação da quantidade de solvente e do valor NET. Os resultados das simulações são apresentados nas FIGURAS 13, 14, 15 e 16.

A FIGURA 13 mostra que o número de estágios teóricos diminui com o aumento da quantidade de solvente, e mais acentuadamente para altos rendimentos. Para um rendimento próximo a 91 %, 4 estágios são necessários utilizando no mínimo a proporção de 4,5 kg de solvente/1 kg de alimentação. Utilizando-se de 3 estágios e um mínimo de aproximadamente 3,5 kg de solvente/kg de alimentação é possível conseguir um rendimento de extração de

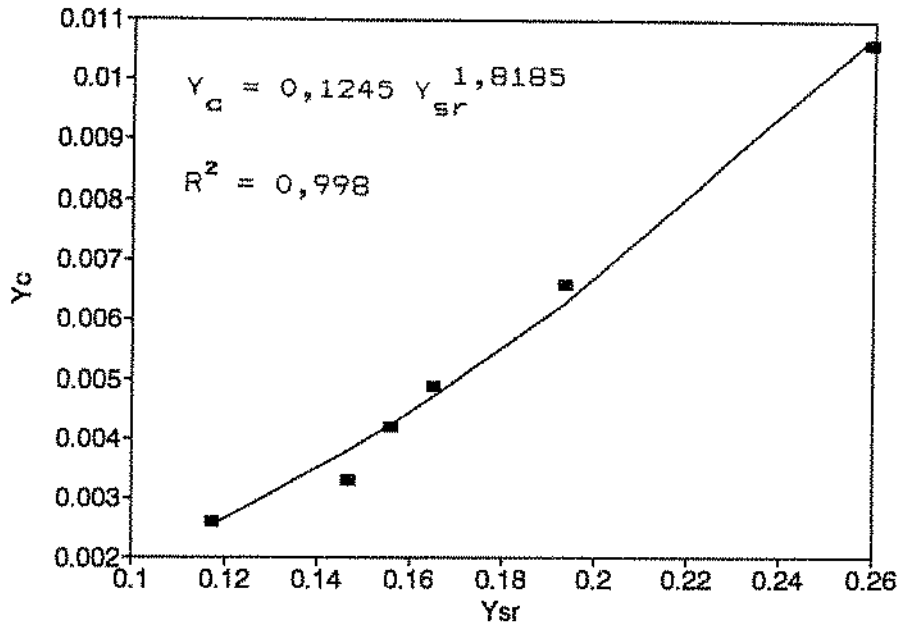


FIGURA 12- RELAÇÃO ENTRE  $Y_c$  e  $Y_{sr}$

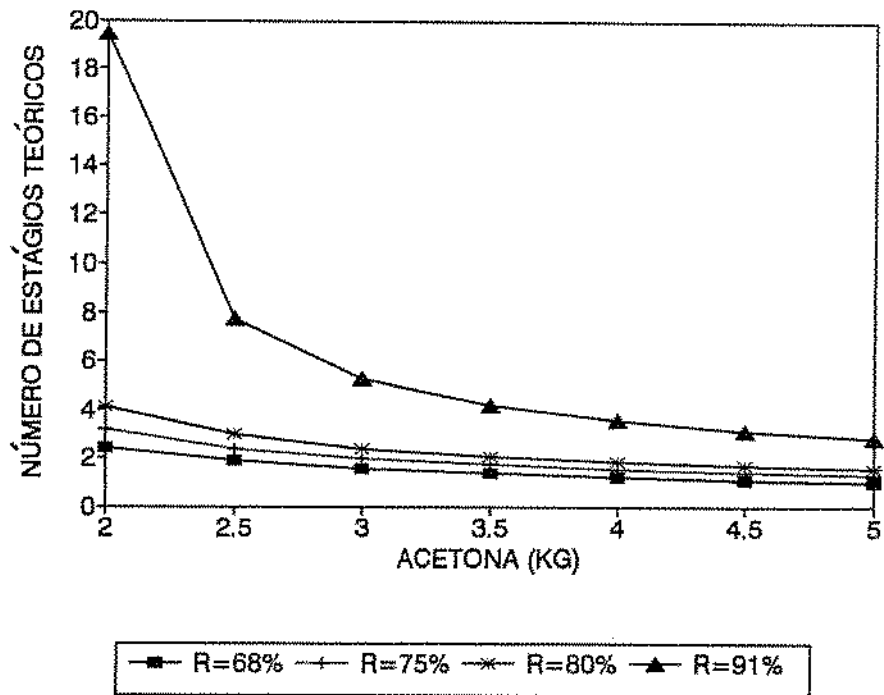


FIGURA 13- SIMULAÇÃO DO NÚMERO DE ESTÁGIOS TEÓRICOS PARA SISTEMA CONTRA CORRENTE DE GEMA-ACETONA

colesterol de 80%. Este tipo de análise permite a seleção das melhores condições operacionais para um sistema de extração.

A FIGURA 14 mostra uma relação linear entre a quantidade de extrato em função da quantidade de solvente utilizada, independente do rendimento obtido. Isto é devido ao fato da solução retida nos sólidos inertes ser constante.

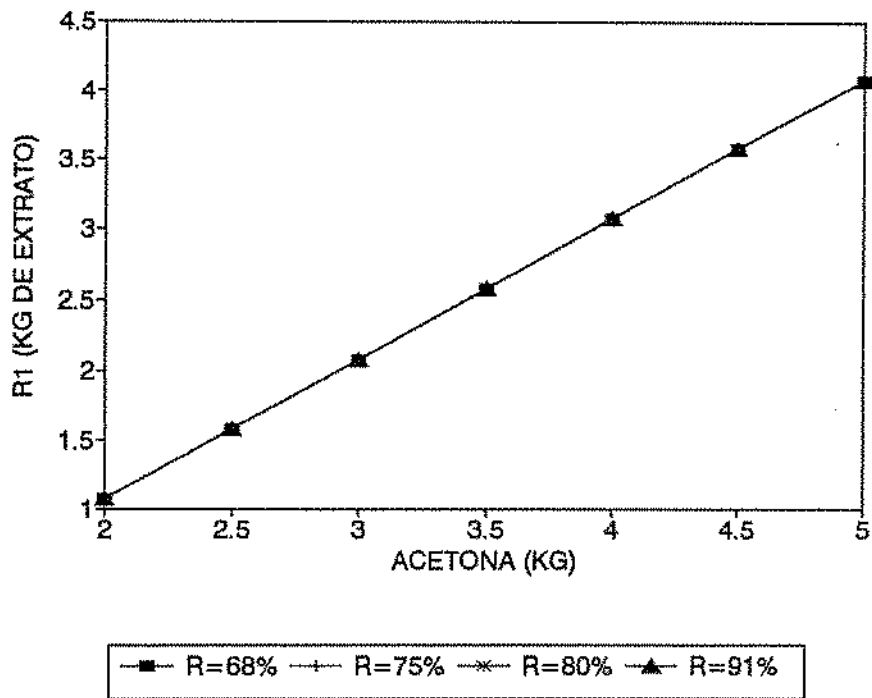


FIGURA 14- SIMULAÇÃO DA QUANTIDADE DE EXTRATO PARA SISTEMA CONTRACORRENTE DE GEMA-ACETONA

A FIGURA 15 mostra a variação da concentração de soluto do extrato em função da quantidade de solvente utilizada para diferentes rendimentos. Observa-se, para qualquer rendimento, o efeito da diluição do extrato com o aumento da quantidade de solvente. Para uma dada quantidade de solvente, o aumento do rendimento promove um aumento de concentração no extrato; para uma certa concentração de extrato, diferentes rendimentos podem ser obtidos por variação da quantidade de solvente.

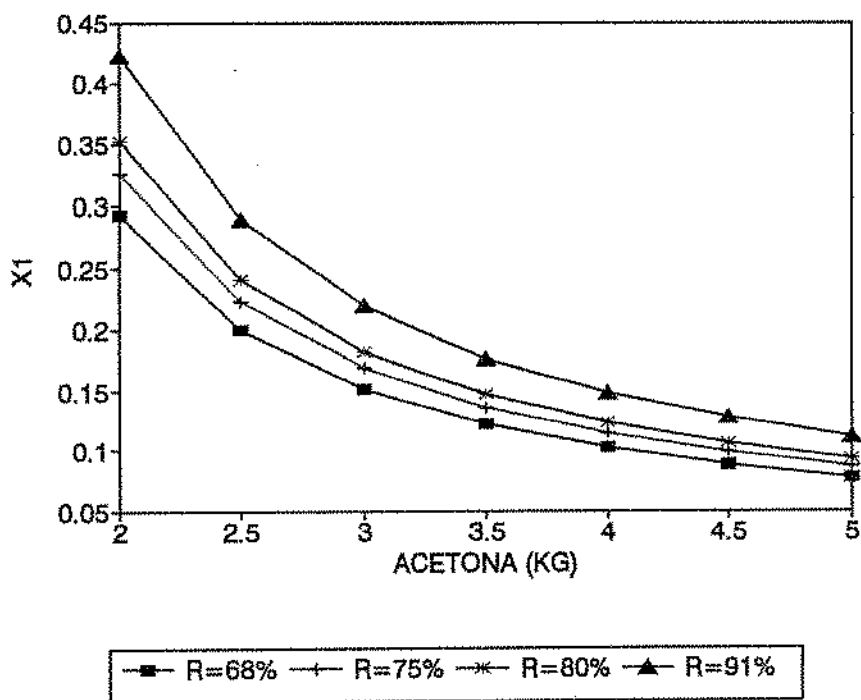


FIGURA 15- SIMULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁSSICA DO EXTRATO FINAL EM UM SISTEMA CONTRACORRENTE DE GEMA-ACETONA

A FIGURA 16 representa a variação da concentração (base livre de inertes) do extrato ( $X_n$ ) e do refinado ( $Y_n$ ), para um rendimento de extração de colesterol de 91%, usando 3kg solvente/1kg de alimentação. Essa figura ilustra bem o que acontece em um sistema de extração contracorrente: o refinado sai exaurido em soluto (estágio 6), e o extrato concentrado (estágio 1).

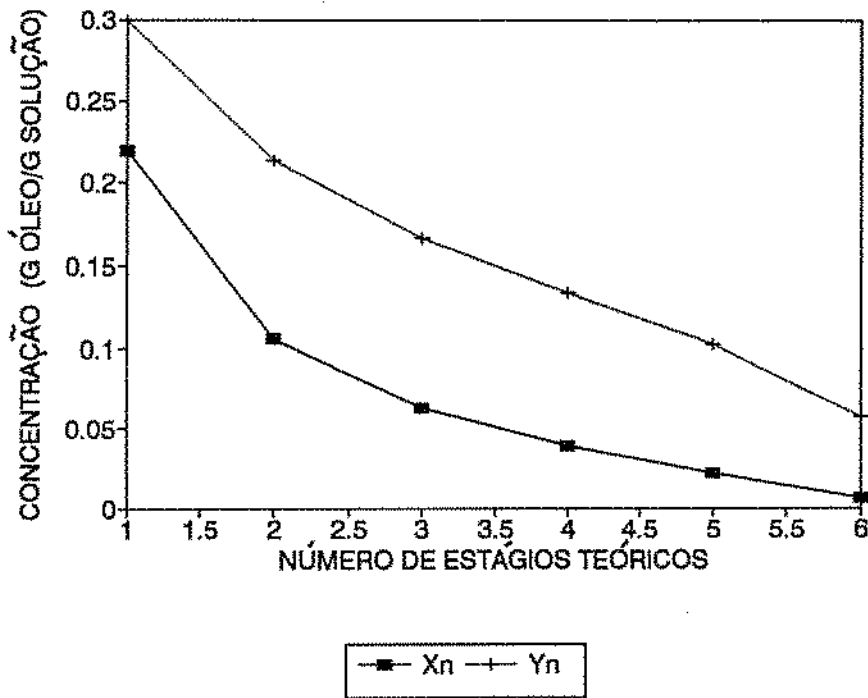


FIGURA 16- SIMULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁSSICA DE ÓLEO NO REFINADO ( $Y_n$ ) E NO EXTRATO ( $X_n$ ) PARA UM SISTEMA DE EXTRAÇÃO DE 6 ESTÁGIOS E RENDIMENTO DE 91% DE EXTRAÇÃO DO COLESTEROL

### 5.3- Efeito da razão L/F sobre colesterol e fosfolípidos extraídos e a estabilidade da emulsão no "equilíbrio prático"

O resultado estatístico se encontra resumido na TABELA 19, e os programas SAS (1985) utilizados estão no APÊNDICE E. De acordo com os resultados, a propriedade emulsificante das amostras de gema com teores mais baixos de colesterol e fosfolípidos permaneceu inalterada em relação à amostra controle (amostra que não sofreu extração). Apesar da razão de L/S afetar significativamente a quantidade de fosfolípidos extraída, seu rendimento máximo na faixa testada foi de 5%, bem inferior ao do colesterol extraído (superior a 80% conforme L/S), pois os fosfolípidos são pouco solúveis no solvente utilizado. Provavelmente este fato possa justificar a manutenção da capacidade emulsificante da gema com baixo teor de colesterol.

Observa-se certa tendência de aumento da propriedade emulsificante com maior extração dos lipídeos, o que indiretamente aumenta a concentração dos fosfolípidos na gema e favorece a formação de emulsões mais estáveis. Estes aspectos deveriam ser aprofundados em pesquisas posteriores, porque poderão ser utilizados na otimização e controle do processo.

### 5.5- Análise Sensorial

De acordo com os resultados do item anterior e do equilíbrio "prático", a maionese foi elaborada utilizando-se gema com 13% de colesterol, obtida com L/S igual a 12.

Os resultados do teste de aceitação para aparência e sabor, aroma e textura da formulação e da amostra padrão são apresentados na TABELA 20. Foram analisados usando o procedimento GLM, do SAS, apresentado no APÊNDICE F. As médias da formulação e do padrão para ambos parâmetros diferem significativamente

TABELA 19- TESTE DE TUKEY PARA COLESTEROL, FOSFOLIPÍDEOS E ESTABILIDADE DA EMULSÃO

L/S	COLESTEROL (g)	FOSFOLIPÍDEOS (g)	ES* (g óleo/5g maionese)
2/1	0,08667a	0,01000c	0,825a
6/1	0,17667b	0,04000b	0,722ab
12/1	0,20000c	0,07000a	0,449b
Controle	0,00000d	0,00000c	0,778ab

Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

ES- Estabilidade da emulsão

TABELA 20- VALORES MÉDIOS DE ACEITAÇÃO DA AMOSTRA DE MAIONESE PARA OS ATRIBUTOS DE APARÊNCIA E SABOR, AROMA E TEXTURA (1 = DESGOSTEI MUITÍSSIMO, 9 = GOSTEI MUITÍSSIMO)

AMOSTRA	APARÊNCIA	PREFERÊNCIA
Formulação	5,467a	5,667a
Padrão	7,690b	7,567b

Valores contendo letras em comum não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade (teste de TUKEY).



entre si ao nível de 5% de probabilidade, sendo os valores mais elevados para o padrão.

Os resultados do teste de aceitação para a aparência na forma de histograma são apresentados através da FIGURA 17. Observa-se que enquanto aproximadamente 25% dos provadores gostaram ligeiramente da aparência da maionese formulada com a gema com baixo teor de colesterol, 65% dos provadores gostaram muito da aparência do padrão. A principal razão da baixa aceitação da formulação proposta, segundo a descrição dos provadores, deve-se à não homogeneização da mesma. A homogeneização está relacionada com a reconstituição da gema, que por sua vez está ligada à quantidade de água utilizada e aos meios mecânicos para cominuição das partículas e dispersão das mesmas no meio. Devido à pouca quantidade processada, homogeneizadores disponíveis não puderam ser utilizados e a aparência ficou comprometida.

Quanto à preferência, levando-se em conta o efeito do aroma, sabor e textura do produto, os resultados são mostrados na FIGURA 18. Observa-se nitidamente que o padrão teve uma melhor aceitação do que a formulação, pois cerca de 50% gostaram muito do padrão, principalmente do seu sabor; 20% dos provadores desgostaram ligeiramente da formulação, mas cerca de 16% gostaram entre muito e ligeiramente da mesma. O fator que mais contribuiu positivamente para a aceitação do produto foi a textura da maionese (47%) e no sentido negativo foi o sabor oleoso (90%).

De modo geral, a aceitação da maionese foi regular, podendo ser melhorada com a alteração da formulação e uso de homogeneizador.

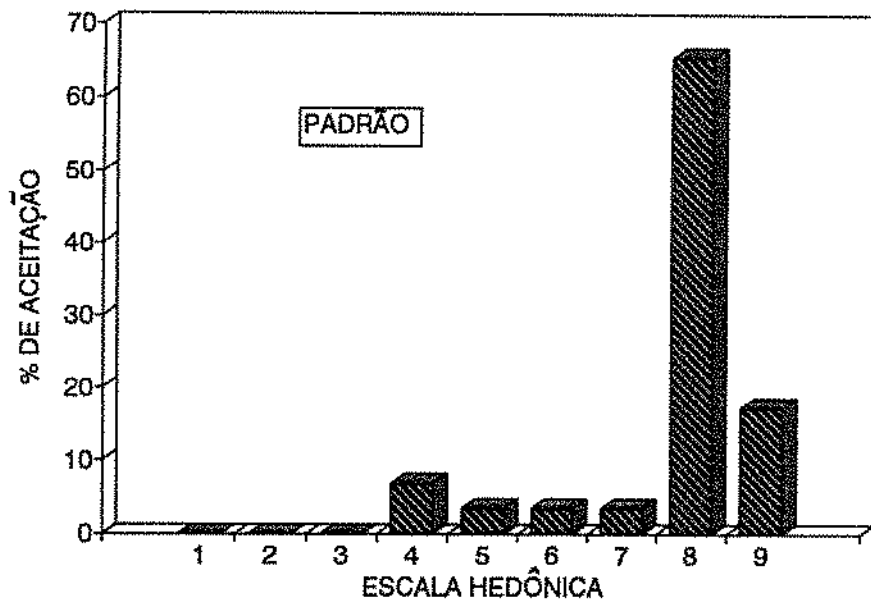
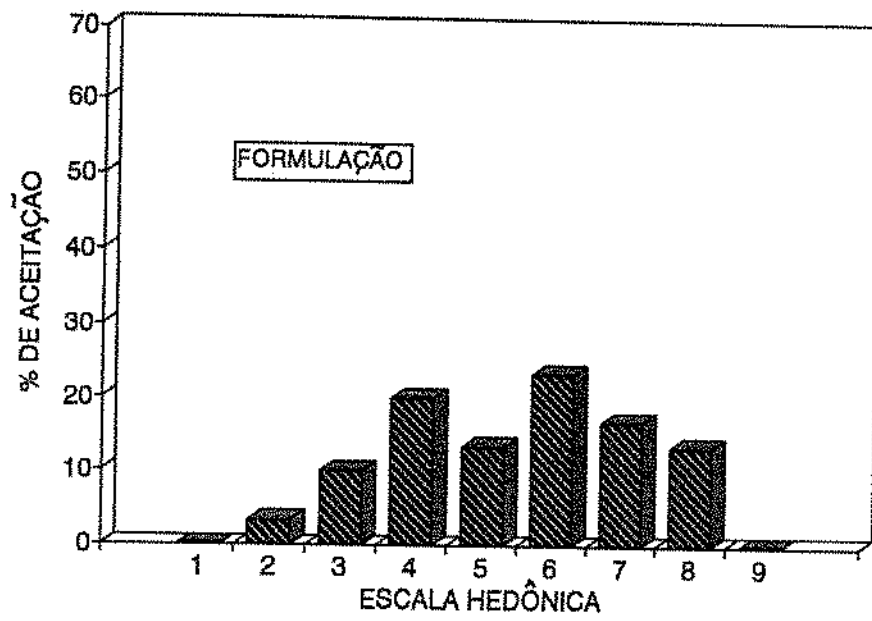


FIGURA 17- ACEITAÇÃO DA APARÊNCIA

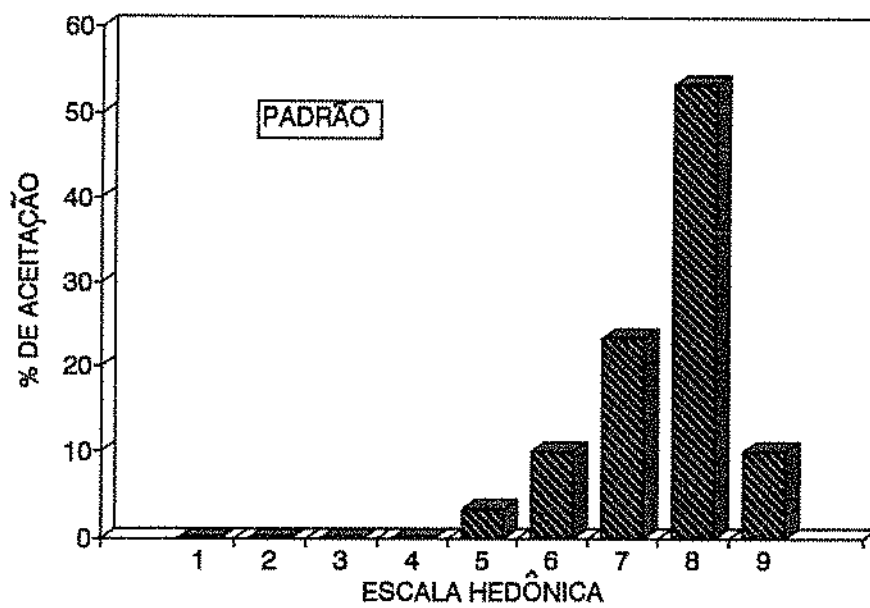
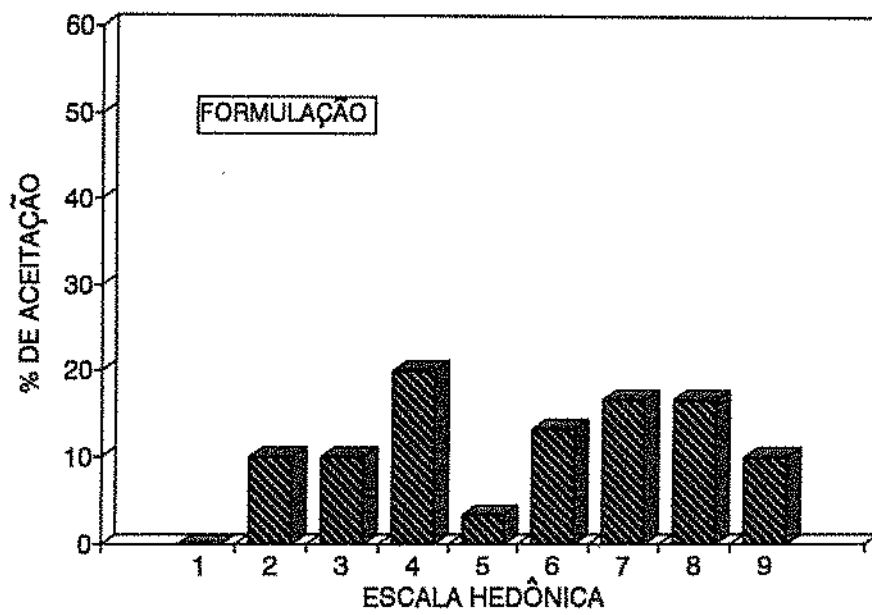


FIGURA 18- ACEITAÇÃO DA PREFERÊNCIA

## 6-CONCLUSÕES

1- As variáveis que exerceram maior influência sobre o rendimento da extração do colesterol da gema desidratada foram: a razão de solvente para alimentação (L/S) e a temperatura (T).

2- O modelo quadrático usado para medir as influências de L/S e T sobre o rendimento de colesterol, mediante construção de superfície de resposta, ajustou-se muito bem aos dados experimentais, explicando 99,80% da variância dos mesmos.

3- O tempo de equilíbrio "prático" de 15 minutos, indicou tratar-se de um processo de extração muito rápido; o óleo ou o colesterol é facilmente acessível ao solvente devido ao reduzido tamanho da partícula e à natureza permeável das partículas da gema em pó.

4- A extração do colesterol e fosfolípidos da gema desidratada nas condições de equilíbrio avaliadas, não afetou de forma significativa a estabilidade das emulsões de maionese em relação à emulsão produzida com gema controle (desidratada/ sem extração).

5- A maionese produzida com a utilização de gema com baixo teor de colesterol (3,3 mg/g sólidos secos) obteve uma aceitação inferior tanto na aparência como em relação ao aroma, sabor e textura, ainda que tenha sido considerada aceitável por cerca de 55% dos consumidores.

6- Os resultados dessa pesquisa inicial indicam que o processo de extração do colesterol utilizando acetona como solvente, pode ser altamente viável do ponto de vista alimentício e, constituem também um ponto de partida para pesquisas mais aprofundadas, que visem tornar o processo industrial altamente rentável para as indústrias que têm a intenção de comercializá-lo ou usá-lo em suas

formulações, dada a crescente demanda por produtos dietéticos em detrimento da preservação das boas condições de saúde.

## 7- SUGESTÕES

De acordo com as conclusões obtidas, esta linha de pesquisa poderá ser explorada para uma visão globalizada do processo, visando a otimização do mesmo em escala de laboratório e posterior implantação de uma unidade piloto e, neste sentido são apresentadas algumas sugestões:

1- Utilizar planejamento fatorial fracionado para conduzir um estudo similar ao realizado neste trabalho para construção de superfície de resposta, modificando os valores das variáveis envolvidas e analisando em conjunto com o rendimento, outras respostas igualmente importantes para chegar à otimização do processo (cor, estabilidade da emulsão, volume do bolo, etc.).

2- Utilizar métodos mais sofisticados (HPLC ou cromatografia em fase gasosa) para a dosagem do colesterol, para melhorar a precisão dos resultados e dessa forma construir novas curvas de equilíbrio para o sistema gema-acetona.

3- Verificar a influência dos métodos de eliminação do solvente (ou secagem) nas propriedades físicas e químicas do produto obtido e características sensoriais de maionese (ou outro produto que tenha sua utilização) produzida com o mesmo.

4- Conduzir a análise sensorial de maionese (ou outros produtos) mais elaborada, a fim de avaliar a influência das propriedades físicas e químicas na otimização da formulação do produto.

5- Estudar a relação da solubilidade protéica e estabilidade de emulsão em função dos níveis de colesterol e fosfolipídeos extraídos, no acompanhamento do comportamento protéico a nível molecular e estabelecimento das condições ótimas de extração.

6- Montagem e avaliação do desempenho de uma bateria de extratores e separadores em escala piloto, para produção de gema com baixo teor de colesterol.

## B-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABRAHAM, G.; HRON, R. J. & KOLTUN, S.P. Modeling the solvent extraction of oilseeds. *JAOCS*, 65(1):129-35, 1988.
- 2- ANDERSON, J. T.; GRANDE, F. & KEYS, A. Independence of the effects of cholesterol and degree of saturation of the fat in the diet on serum cholesterol in man. *The American J. of Clinical Nutrition*, 29:1184, 1976.
- 3- AOCS Official and Tentative Methods of the American Oil Chemist's Society. 3. ed. 1979. v.1-2.
- 4- BAIR, C. W. & MARION, W. W. Yolk cholesterol from various species. *Poultry Science*, 57:1260-5, 1978.
- 5- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. *Canadian Journal Biochemistry Physiol.*, 37:911, 1959.
- 6- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. & HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters*. 1. ed. New York, John Wiley & Sons, 1978. 653p.
- 7- BRENNAN, J. C.; BUTTERS, J. R.; COWELL, N. D. & LILLI, A. E. V. *Food Engineering Operations*. 2.ed. London, Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 175-200.
- 8- CHAPMAN, G. W. A conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. *JAOCS*, 299-302, 1980.
- 9- CHIEN, J. T.; HOFF, J.E.; LEE, M. J.; LIN, H. M.; CHEN, Y. J. & CHEN, L.F. Oil extraction of dried ground corn with ethanol. *The Chemical Engineering Journal*, 43:B103-B113, 1990.
- 10- CHUNG, S. L. & FERRIER, L. K. Partial lipid extraction of egg yolk powder: effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. *Journal of Food Science*, 56(5): 1255-1258, 1991.



- 11- CODEX ALIMENTARIUS Organizacion de las naciones unidas para la agricultura y la alimentacion. s.ed. s.l. 1985.
- 12- COTTERILL, O. J.; GLAUERT, J. & BASSETT, H. J. Emulsifying properties of salted yolk after pasteurization and storage. *Poultry Science*, 55:544-8, 1976.
- 13- COULSON, J. M. & RICHARDSON, J. E. *Chemical Engineering*. 2.ed. Oxford, Pergamon Press, 1976. v.2, p. 278-314.
- 14- DEUEL, H. J. *The lipids- their chemistry and biochemistry*. New York, Interscience Publishers, Inc., 1951. v.1, 982p.
- 15- DIBERT, K.; CROS, E. & ANDRIEU, J. Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part I- Equilibrium data. *Journal of Food Engineering*, 10:1-11, 1989a.
- 16- DIBERT, K.; CROS, E. & ANDRIEU, J. Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, 10:199-214, 1989b.
- 17- FRONING, G. W.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L., PIERCE, M. M.; NIEMANN, L. & SIEKMANK, D. K. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Science*, 55(1):95-98, 1990
- 18- HARGIS, P. S. Modifying egg yolk cholesterol in the domestic fowl- a review. *Worlds Poultry Science Journal*, 44:17, 1988.
- 19- HUBBARD, W. D.; SHEPPARD, A.J.; NEWKIRK, D.R.; PROSSER, A.R. & OSGOOD, T. Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterols from food products. *JAOCS*, 54(2):81-83, 1977.
- 20- KHURI, A. I. & CORNELL, J. A. *Response surfaces: designs and analyses*. New York, Marcel Dekker, 1987. 405p.

- 21- LARSEN, J. E. & FRONIN, G. W. Extraction and processing of various components from egg yolk. *Poultry Science*, 60:160-7, 1981.
- 22- LIEU, E. H; FRONING, G. W. & DAM, R. Effect of storage on lipid composition and functional properties of dried egg products. *Poultry Science*, 57:912-23, 1978.
- 23- LONG, V. D. Aqueous extraction of black leaf tea- I- Leaf insolubility. *Journal of Food Technology*, 12(5):459-452, 1977.
- 24- MASTERS, K. *Spray drying: An introduction to principles, operation, practice and applications*. Londres, Leonard Hill Brooks, 1972.
- 25- McNAMARA, D. J. The role of cholesterol and fat. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 64(12):1565-74, 1987.
- 26- METZLER, D. E. *Biochemistry- The chemical reactions of living cells*. London, Academic Press, 1977. p.727-35.
- 27- NAVARRO, J. G.; SAAVEDRA, J. C.; BORIE, F. B. & CAIOZZI, M. Influence of dietary fish meal on egg fat acid composition. *Journal of Food Agriculture*, 23:1287-92, 1972.
- 28- NCEP (National Cholesterol Education Program) Report of the NCEP expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *Archives of International Medicine*, 148:36, 1988.
- 29- PERRY, R. H. & CHILTON, C. H. *Manual da Engenharia Química*. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1980.
- 30- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 12.ed. Piracicaba, Nobel, 1987. 467p.
- 31- REISER, R. Oversimplification of diet: coronary heart disease relationship and exaggerated diet recommendation. *The American J. of Clinical Nutrition*, 31:865, 1978.
- 32- SABINE, J. R. *Cholesterol*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1977. 489 p.

- 33- SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R. E. An adaptation of ARTHUR for micro computer. *Trends Analytical Chemistry*, 8:326-327, 1989.
- 34- SCHWARTZBERG, H. G. Continuous counter-current extraction in the food industry. *AICHE*, (4):67-85, 1980.
- 35- SCHWARTZBERG, H.G. Leaching- organic materials. In: ROSSEAU, R. *Handbook of Separation Process Technology*. New York, John Wiley Sons, Inc., 1987. 1010p.
- 36- STADELMAN, W. J. & COTTERILL, D.J. *Egg science and Technology*. 3.ed. Westport, AVI Publishers Company, 1986. 449p.
- 37- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). *SAS user's guide: Statistics*. 5.ed. Cary, Nc: SAS Institute Inc., 1985. 956p.
- 38- STONE, H. & SIDEL, J. L. *Sensory evaluation practices*. Orlando, Academic, 1985. 311p.
- 39- SWEENEY, J. P. & WEIHRAUCH, J. L. Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31-59, 1976.
- 40- TORKASKA, B. & CLANDINI, M. T. Extraction of egg yolk oil of reduced cholesterol content. *Canadian Institute Food Science Journal*, 18(3): 256-8, 1985.
- 41- TORNERBERG, E. & HERMANSSON, M. Functional characterization of protein stabilized emulsions: effect of processing. *Journal of Food Science*, 42(2):468-72, 1977.
- 42- TREYBAL, R. E. *Mass transfer operations*. 3.ed. Toquio, McGraw-Hill International Book Co., 1980. p. 717-65.
- 43- TURKAY, S.; SATIROGLU, K. N.; SASMAZ, D. A. & GULBARAN, E. Sunflowerseed Extraction with a new type of extractor. *JAOCs*, 62(12):1663-1665, 1985.
- 44- VOILLEY, A. & CLO, G. Diffusion of soluble substances during brewing of coffee. *Journal of Food Process and Preservation*, 5:127-137, 1981.

- 45- WARREN, M. W., BROWN, H. G. & DAVIS, D.R. Solvent extraction of lipid components from egg yolk solids. *JAOCS*, 65(7):1136-9, 1988.
- 46- YANG, S. S. & COTTERILL, O. J. Physical and functional properties of 10% salted egg yolk in mayonnaise. *Journal of Food Science*, 54(1):210-13, 1989.

APÊNDICE A

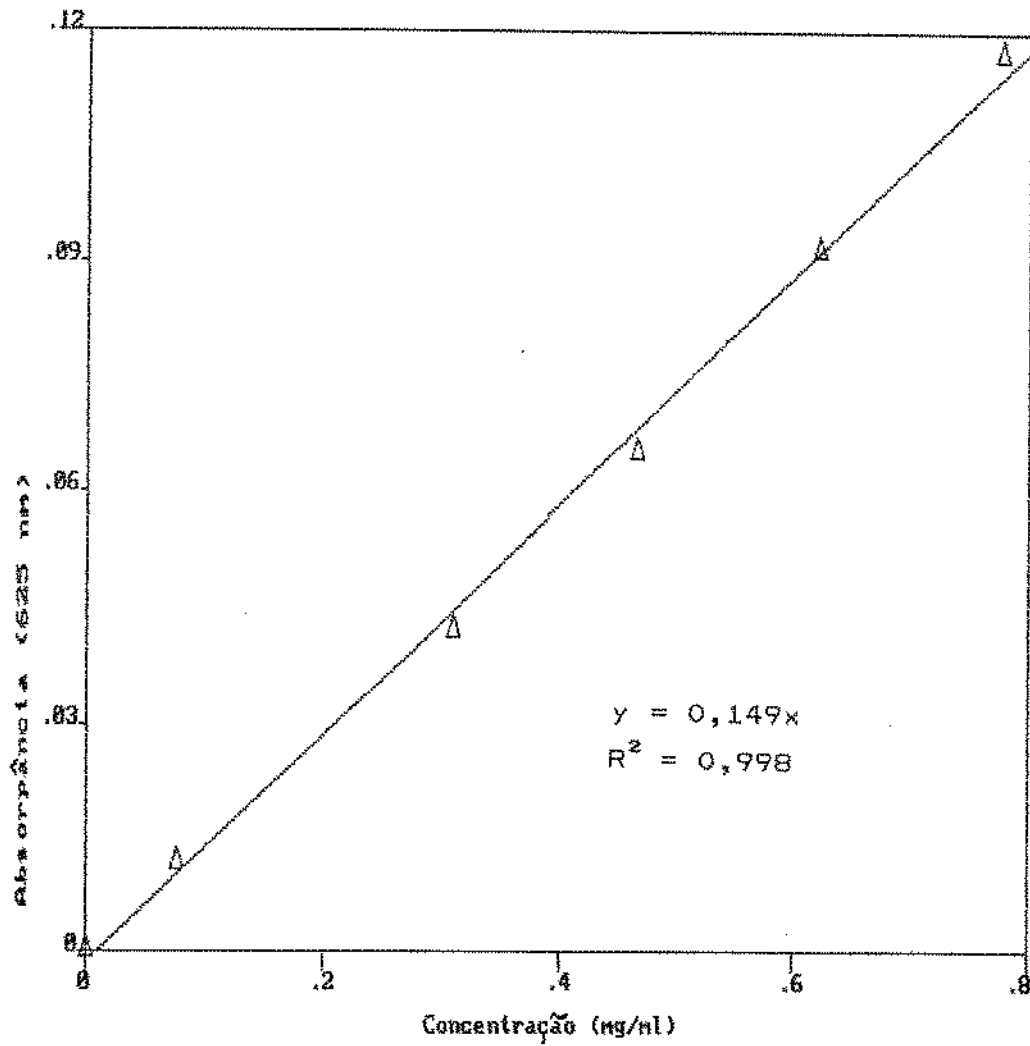


FIGURA A.1- CURVA PADRÃO DO COLESTEROL

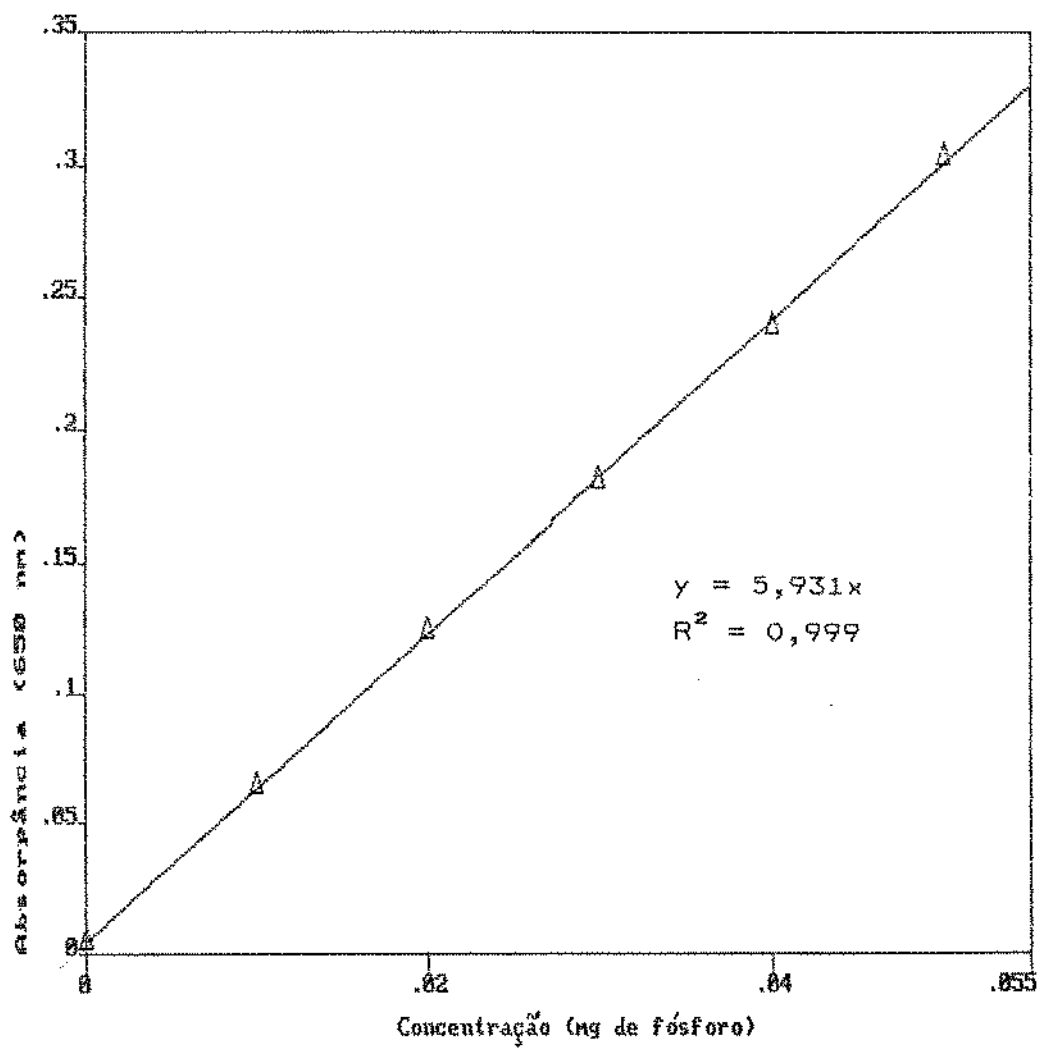


FIGURA A-2- CURVA PADRÃO DOS FOSFOLIPÍDEOS

### A.3- Cálculo do fator do fósforo

A conversão do fósforo inorgânico (P) para fosfolipídeos (PL) é expresso pela seguinte relação:

$$\% \text{ PL} = \frac{\% \text{ P} \times \text{PM (PL)}}{\text{PM (P)}}$$

onde PM é peso molecular .

O peso molecular do fósforo é 30,97 e o PM do PL é obtido levando em consideração a porcentagem de cada PL, apresentado na TABELA 1 e também a % de ácidos graxos em cada um deles, apresentados na TABELA 3. Para estes cálculos foram considerados apenas os fosfolipídios presentes em maior %: fosfaditilcolina (PC), fosfaditiletanolamina (PE) e lisofosfaditilcolina (LPC). Seus pesos moleculares são respectivamente: 223,2, 181,13 e 240,19. A TABELA A-3 foi construída para facilitar o cálculo.

TABELA A-3- CONTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS ( PM . % )

ÁCIDO GRAXO	PC		PE		LPC
	a	b	a	b	a
16:0	71,263	94,506	115,706	55,128	52,575
16:1	-	1,520	11,657	-	-
18:0	21,828	35,151	38,553	92,130	18,426
18:1	102,170	88,378	79,372	48,693	83,312
18:2	60,360	33,533	11,457	19,561	84,672
18:3	18,003	2,774	2,497	5,549	8,872
20:4	-	8,221	5,481	31,056	29,839
22:5	-	2,644	-	9,915	-
22:5	-	6,898	-	21,024	-
<b>SOMA</b>	<b>273,654</b>	<b>273,625</b>	<b>264,723</b>	<b>283,046</b>	<b>277,696</b>

Peso molecular do PL considerando valores de a:

$$PC = [(273,654 \cdot 2) + 223,2] \cdot 0,73 = 562,471$$

$$PE = [(264,723 \cdot 2) + 181,13] \cdot 0,15 = 106,586$$

$$LPC = [(277,696 \cdot 1) + 240,19] \cdot 0,058 = 30,037$$

$$\Sigma = 699,04 \quad \text{fator} = 1 \cdot 699,04 / 30,97 = 22,573$$

Analogamente utilizando os valores de b , o valor de f obtido foi de 21,78. O resultado será considerado a média desses valores, 22,177.



## APÊNDICE B

B-1- Método de cálculo para o desvio padrão e erro padrão do efeito para o experimento fatorial.

Com os valores da variável dependente no ponto central, calcula-se:

$$S_1^2 = \frac{(Y_1 - \bar{Y})}{N - 1} \qquad \delta = (S_p^2)^{1/2}$$

$S_1^2$  = variância da variável em cada replicata

$Y_1$  = valor da variável em cada replicata

$\bar{Y}$  = valor médio das replicatas

$S_p^2$  = média das variâncias

$\delta$  = desvio padrão ( ou erro experimental)

$N$  = número de replicatas

O erro padrão do efeito é dado pela relação:

$$V (ef) = V ( \bar{R}_+ - \bar{R}_- ) = V ( \bar{R}_+ ) + V ( \bar{R}_- ) = S_p^2 / n + S_p^2 / n$$

$$V (ef) = 2S_p^2 / n \qquad \delta_{ef} = V (ef)^{1/2}$$

$V (ef)$  = média da variância

$V ( \bar{R}_+ )$  = variância dos valores +

$V ( \bar{R}_- )$  = variância dos valores -

$n$  = número total dos valores + e -

$\delta_{ef}$  = desvio ou erro padrão do efeito

No presente caso temos  $n = 8$  e então  $\delta_{ef} = \delta/2$

B-2- Método de cálculo do erro padrão do efeito para cada termo da equação de ajuste para contorno e superfície de resposta.

Utilizando programa Regerr de SCARMINIO & BRUNS (1989), obteve-se a matriz dos fatores de propagação do erro. O valor do erro experimental dos parâmetros é obtido pela raiz quadrada da multiplicação da variância (calculada conforme mostra o APÊNDICE B-1) pela matriz dos fatores de propagação.

A título de ilustração os resultados para a determinação do erro experimental para o modelo quadrático são mostrados abaixo:

Erro experimental nos parâmetros      Matriz dos fat. de propagação      Variância      Raiz quadrada

$$\begin{bmatrix} \delta_{b_0} \\ \delta_{b_1} \\ \delta_{b_2} \\ \delta_{b_{11}} \\ \delta_{b_{22}} \\ \delta_{b_{12}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,3333 \\ 0,1250 \\ 0,1250 \\ 0,1772 \\ 0,1772 \\ 0,2500 \end{bmatrix} \times 18,674 = \begin{bmatrix} 2,4949 \\ 1,5279 \\ 1,5279 \\ 1,8191 \\ 1,8191 \\ 2,1607 \end{bmatrix}$$

B-3- Programa SAS de regressão não linear para ajuste da equação para construção do contorno e superfície de resposta.

```
:00001 DATA EXEMPLO;
:00002 INPUT x1 x2 y;
:00003 CARDS;
:00004 -1 -1 64.2860
:00005 +1 -1 89.4625
:00006 -1 +1 57.9050
:00007 +1 +1 87.1457
:00008 0 0 79.6963
:00009 0 0 83.2672
:00010 -1.414 0 57.1287
:00011 +1.414 0 88.9377
:00012 0 -1.414 94.5386
:00013 0 +1.414 84.1036
:00014 0 0 74.6665
:00015 ;
:00016 PROC NLIN DATA=EXEMPLO METHOD=DUJ;
:00017 PARS a=79.0 b=12.0 c=-2.8 d=-4.0 e=3.0;
:00018 MODEL y=a+b*x1+c*x2+d*x1**2+e*x2**2;
:00019 RUN;
```

APÊNDICE C

C-1- Dados experimentais de equilíbrio "prático" a 25°C, 15 min e 100 rpm.

TABELA C-1- VALORES MÉDIOS DOS DADOS DE EQUILÍBRIO

L/S	$X_n$	$Y_n$	N	$Y_c$	$Y_{sr}$
2/1	0,1700	0,2700	0,2600	0,0106	0,2594
4/1	0,1000	0,2000	0,2700	0,0066	0,1934
6/1	0,0700	0,1700	0,2600	0,0049	0,1651
8/1	0,0500	0,1600	0,2800	0,0042	0,1558
10/1	0,0420	0,1500	0,2700	0,0033	0,1467
12/1	0,0370	0,1200	0,2600	0,0026	0,1174

C-2- Programa SAS de análise de variância e teste TUKEY para  $N \times y_n$  e resultados.

```

:00001 DATA EXEMPLO;
:00002 INPUT TR NY;
:00003 CARDS;
:00004 1 0.26
:00005 1 0.26
:00006 1 0.26
:00007 2 0.27
:00008 2 0.25
:00009 2 0.26
:00010 3 0.28
:00011 3 0.27
:00012 3 0.26
:00013 ;
:00014 PROC ANOVA;
:00015 CLASSES TR;
:00016 MODEL NY=TR;
:00017 MEANS TR/TUKEY;
:00018 RUN;

```

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: NY

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than RESNO.

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 0.000067

Critical Value of Studentized Range= 4.339

Minimum Significant Difference= 0.0205

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TR
A	0.27000	3	3
A	0.26000	3	2
A	0.26000	3	1

C-3- Programa SAS de regressão linear para  $x_n \times y_n$

```

:000001 DATA EXEMPLO;
:000002 INPUT XN YN N;
:000003 CARDS;
:000004 0.17 0.27 1
:000005 0.10 0.20 2
:000006 0.07 0.17 3
:000007 0.05 0.16 4
:000008 0.042 0.15 5
:000009 0.037 0.12 6
:000010 ;
:000011 PROC NLIN PLOT METHOD=DUD;
:000012 PARMs A=0.59732 B=0.45975;
:000013 MODEL YN=A*(XN**B);
:000014 RUN;

```

C-4- Programa SAS de regressão não linear para  $y_c \times y_{sr}$  e resultados

```

:00001 DATA EXEMPLO;
:00002 INPUT YC YO N;
:00003 CARDS;
:00004 0.0106 0.2594 1
:00005 0.0066 0.1934 2
:00006 0.0049 0.1651 3
:00007 0.0042 0.1558 4
:00008 0.0033 0.1467 5
:00009 0.0026 0.1174 6
:00010 ;
:00011 PROC NLIN PLOT METHOD=DUD;
:00012 PARS A=0.13135 B=1.85225;
:00013 MODEL YC=A*(YO**B);
:00014 RUN;

```

Non-Linear Least Squares Summary Statistics      Dependent Variable YC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	0.00021481412	0.00010740706
Residual	4	0.00000040598	0.00000010147
Uncorrected Total	6	0.00021522000	
(Corrected Total)	5	0.00004241333	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
A	0.124497030	0.01780082330	0.0750746901	0.1739193701
B	1.818473563	0.09093111244	1.5660117366	2.0709353887

## APÊNDICE D

### Programa Basic para simulação de sistema de extração contracorrente

```

10 REM ESTE PROGRAMA SERVE PARA CALCULAR A QUANTIDADE DO EXTRATO FINAL
20 REM (R1), SUA CONCENTRAÇÃO (X1) E O NÚMERO DE ESTÁGIOS TEÓRICOS (I)
30 REM NECESSÁRIOS PARA ALCANÇAR UM DADO RENDIMENTO NA EXTRAÇÃO DO
40 REM COLESTEROL DA GEMA DESIDRATADA, A 25°C
50 REM NOMENCLATURA DAS VARIÁVEIS USADAS NESTE PROGRAMA
60 REM S= QUANTIDADE DE GEMA DESIDRATADA (KG)
70 REM C= QUANTIDADE DE COLESTEROL NA GEMA(KG)
80 REM B= QUANTIDADE DE INERTES (OU INSOLUVEIS) NA GEMA (KG)
90 REM F= QUANTIDADE DE SOLUTO (OLEO) EM S (KG)
100 REM NNP= MASSA DE INERTES/MASSA DE SOLUÇÃO ADERIDA (KG/KG)
110 REM YC= MASSA DE COLESTEROL/MASSA DE SOLUÇÃO ADERIDA
120 REM YD= MASSA DE OUTROS SOLUTOS/MASSA DE SOLUÇÃO ADERIDA
130 REM YNP= MASSA DE SOLUTO TOTAL/MASSA DE SOLUÇÃO ADERIDA NO ÚLTIMO
140 REM ESTÁGIO
150 REM ENP= MASSA DA SOLUÇÃO ADERIDA (KG)
160 REM RNP1= QUANTIDADE DE SOLVENTE QUE ENTRA NO ÚLTIMO ESTÁGIO (KG)
170 REM X(I)= CONCENTRAÇÃO DO SOLUTO NO EXTRATO
180 REM Y(I)= MASSA DE SOLUTO TOTAL/MASSA DE SOLUÇÃO ADERIDA (REFINADO)
190 REM YF= MASSA DE SOLUTO EM S/MASSA DE SOLUÇÃO
200 REM DELTA= DIFERENÇA (EM MASSA) ENTRE A CORRENTE QUE ENTRA E SAI DE
210 REM DE UM ESTÁGIO
220 REM R(I)= QUANTIDADE DE EXTRATO QUE SAI DO ESTÁGIO I
230 REM REND= RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO COLESTEROL
240 REM MCR= MASSA DE COLESTEROL RESTANTE DE ACORDO COM RENDIMENTO (KG)
241 REM MCE= MASSA DE COLESTEROL NO EXTRATO
242 DIM R(100), X(100), Y(100)
250 S=1
260 F=.5911
270 B=.4089
280 C=.0253
290 YF=1
300 NNP=.27
310 INPUT "RENDIMENTO="; REND
320 MCR=((S*C)*(100-REND))/100
330 YC=(MCR/B)*NNP
340 YD=(YC/.1245)^(.5479)
350 YNP=YC+YD
360 ENP=B/NNP
361 DELTA=ENP*YNP
362 INPUT "SE VOCE CONHECE A CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (X(1)) DIGITE 1"; Z
363 IF Z=1 GOTO 640
364 INPUT "SE VOCE CONHECE A QUANTIDADE DE EXTRATO (R(1)) DIGITE 2"; E
365 IF E=2 GOTO 685
370 INPUT "QUANTIDADE DE SOLVENTE(KG)"; RNP1

```

```

390 R(I)=F+RNP1-ENP
391 PRINT "r(1)="; R(I)
400 X(I)=(F*YF-DELTA)/R(I)
401 PRINT "x(1)="; X(I)
410 Y(I)=(X(I)^.4666)*.6074
411 LPRINT "y(1)="; Y(I)
420 I=1
421 I=I+1
423 LPRINT "i="; I
430 R(I)=RNP1
431 PRINT "r(i)="; R(I)
440 X(I)=(ENP*Y(I-1)-DELTA)/R(I)
441 LPRINT "x(i)="; X(I)
450 Y(I)=(X(I)^.4666)*.6074
451 LPRINT "y(i)="; Y(I)
460 IF Y(I)<=YNP THEN 475
470 GOTO 421
475 K=(YNP-Y(I-1))/(Y(I)-Y(I-1))
476 PRINT "k="; K
480 LPRINT "RENDIMENTO="; REND; "RNP1=";RNP1
490 LPRINT "R(1)=";R(1); "X(1)="; X(1)
500 NE=(I-1)*K
505 LPRINT "N="; NE
600 INPUT "DESEJA PROSSEGUIR (SIM J=0)"; J
610 IF J=0 GOTO 310
620 STOP
630 END
640 INPUT "CONCENTRACAO DO EXTRATO"; X(1)
650 R(1)=(F*YF-DELTA)/X(1)
661 PRINT "r(1)="; R(1)
670 RNP1=R(1)+ENP-F
671 PRINT "RNP1="; RNP1
680 GOTO 410
685 INPUT "QUANTIDADE DE EXTRATO(KG)"; R(1)
690 RNP1=R(1)+ENP-F
691 PRINT "RNP1=";RNP1
700 GOTO 400

```



APÊNDICE E

Programa SAS para avaliação das respostas: colesterol e fosfolípidos extraídos e estabilidade da emulsão.

:00001 DATA EXEMPLO;		:00001 DATA EXEMPLO;	
:00002 INPUT TR C;		:00002 INPUT TR E;	
:00003 CARDS;		:00003 CARDS;	
:00004 1 0.09		:00004 1 0.6924	
:00005 1 0.08		:00005 1 0.8519	
:00006 1 0.09		:00006 1 0.9302	
:00007 2 0.19	Colesterol	:00007 2 0.8231	Estabilidade da
:00008 2 0.17		:00008 2 0.6460	
:00009 2 0.17		:00009 2 0.6960	
:00010 3 0.21		:00010 3 0.4316	Emulsão
:00011 3 0.19		:00011 3 0.4940	
:00012 3 0.20		:00012 3 0.4225	
:00013 4 0.0000		:00013 4 0.9096	
:00014 4 0.0000		:00014 4 0.8927	
:00015 4 0.0000		:00015 4 0.5307	
:00016 ;		:00016 ;	
:00017 PROC ANOVA;		:00017 PROC ANOVA;	
:00018 CLASSES TR;		:00018 CLASSES TR;	
:00019 MODEL C= TR;		:00019 MODEL E= TR;	
:00020 MEANS TR/TUKEY;		:00020 MEANS TR/TUKEY;	
:00021 RUN;		:00021 RUN;	
:00001 DATA EXEMPLO;			
:00002 INPUT TR F;			
:00003 CARDS;			
:00004 1 0.0100			
:00005 1 0.0100			
:00006 1 0.0100			
:00007 2 0.0500			
:00008 2 0.0500			
:00009 2 0.0400			
:00010 3 0.0800	Fosfolípidos		
:00011 3 0.0700			
:00012 3 0.0700			
:00013 4 0.0000			
:00014 4 0.0000			
:00015 4 0.0000			
:00016 ;			
:00017 PROC ANOVA;			
:00018 CLASSES TR;			
:00019 MODEL F= TR;			
:00020 MEANS TR/TUKEY;			
:00021 RUN;			

APÊNDICE F

Programa SAS para análise de variância e teste de TUKEY dos resultados da análise sensorial

```

:00001 DATA PROJ;
:00002 INPUT AM PROV AP PREF;
:00003 CARDS;
:00004 1 1 8 7
:00005 1 2 8 8
:00006 1 3 7 5
:00007 1 4 9 8
:00008 1 5 4 8
:00009 1 6 6
:00010 1 7 8 6
:00011 1 8 8 6
:00012 1 9 8 7
:00013 1 10 4 8
:00014 1 11 5 7
:00015 1 12 9 9
:00016 1 13 9 9
:00017 1 14 8 8
:00018 1 15 8 8
:00019 1 16 8 8
:00020 1 17 8 8
:00021 1 18 8 8
:00022 1 19 8 8
:00023 1 20 6 7
:00024 1 21 8 7
:00025 1 22 8 9
:00026 1 23 9 8
:00027 1 24 8 8
:00028 1 25 8 8
:00029 1 26 8 8
:00030 1 27 8 8
:00031 1 28 8 7
:00032 1 29 8 8
:00033 1 30 9 7
:00034 2 1 6 8
:00035 2 2 7 7
:00036 2 3 4 6
:00037 2 4 4 7
:00038 2 5 7 2
:00039 2 6 3 4
:00040 2 7 4 8
:00041 2 8 6 9
:00042 2 9 6 4
:00043 2 10 8 6
:00044 2 11 6 4
:00045 2 12 8 8
:00046 2 13 8 9
:00047 2 14 5 4
:00048 2 15 5 3
:00049 2 16 7 7
:00050 2 17 6 4
:00051 2 18 7 5
:00052 2 19 3 2
:00053 2 20 5 8
:00054 2 21 4 3
:00055 2 22 4 7
:00056 2 23 8 9
:00057 2 24 5 4
:00058 2 25 7 7
:00059 2 26 6 6
:00060 2 27 3 3
:00061 2 28 2 2
:00062 2 29 4 6
:00063 2 30 6 8
:00064 PROC GLM;
:00065 CLASSES AM PROV;
:00066 MODEL AP PREF=AM PROV;
:00067 MEANS AM/TUKEY;
:00068 RUN;

```