

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
ENGENHARIA DE PROCESSOS

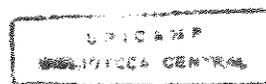
Otimização do processo de extração de colesterol do
óleo de manteiga utilizando extrato de
Quiluaia saponaria

Autora: Susicler Sarmiento Brunhara

Orientador : Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Julho/1997



UNIDADE	PC
N.º CHAMADA:	TUNICAMP
	B835o
V.	Ex
COMBO BC/	32341
PROC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/11/97
N.º CPD	

CM-00103575-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B835o

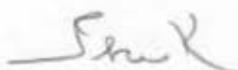
Brunhara, Susicler Sarmiento

Otimização do processo de extração de colesterol do óleo de manteiga utilizando extrato de *Quiluaia saponaria* / Susicler Sarmiento Brunhara.--Campinas, SP: [s.n.], 1997.

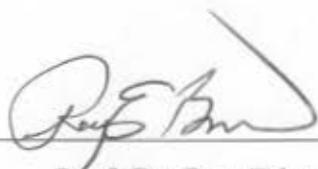
Orientador: Theo Guenter Kieckbusch
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Colesterol. 2. Colesterol - Extração. 3. Gordura do leite. I. Kieckbusch, Theo Guenter. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Dissertação defendida e aprovada, em 04 de julho de 1997, pela banca
examinadora constituída por:



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
Orientador



Prof. Dr. Roy Edward Bruns



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Esta versão corresponde à redação final da tese de Mestrado defendida pela Engenheira Química Susicler Sarmiento Brunhara e aprovada pela comissão julgadora em 04 de julho de 1997.

Orientador



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Dedico esta tese ao Rogélio,

meus pais e meu irmão.

“ E sede cumpridores da palavra, e não somente ouvintes, enganando-vos com falsos discursos.” - (Tiago, 1:22)

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pelo projeto temático nº 93/0622-6, da FAPESP.

Agradeço à Nestlé Industrial e Comercial Ltda pela doação do óleo de manteiga anidro utilizado neste trabalho.

Meu especial agradecimento ao Theo, por sua atenção, orientação e disponibilidade em me atender mesmo nos finais de semana.

Agradeço ao Esdras por me mostrar caminhos mais fáceis de conduzir o meu trabalho.

Aos amigos que souberam me ouvir em momentos de conquistas e de dificuldades, obrigada.

ÍNDICE

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1. Colesterol	3
2.2. Saponinas	13
2.3. Estado Atual da Tecnologia	22
2.4. Aplicação de Métodos de Planejamento Experimental na Otimização de Processos	24
3. Materiais e Métodos	28
3.1. Materiais e Equipamentos	28
3.2. Métodos	31
4. Resultados e Discussão	41
4.1. Análise Geral do Processo	41
4.2. Otimização do Processo de Remoção de Colesterol	43
4.3. Estudo do Equilíbrio Trifásico	58
5. Conclusões	67
6. Sugestões	68
7. Referências Bibliográficas	69
8. Apêndice	78

RESUMO

O presente projeto de pesquisa visou a otimização dos parâmetros tecnológicos no processo de redução do teor de colesterol do óleo de manteiga baseado na formação de agregados do colesterol com micelas de saponinas de *Quiluaia saponaria* em solução aquosa, seguida por uma etapa de adsorção dos complexos formados em terra diatomácea.

Óleo de manteiga anidro, contendo 2,5 mg colesterol / g óleo foi posto em contato com soluções de quilaia, por uma hora, em um banho com agitação orbital, a temperatura controlada. Adicionou-se então Celite®545, mantendo a agitação por mais uma hora. As fases foram separadas por decantação e o conteúdo de colesterol determinado cromatograficamente na fase oleosa resultante do processo.

Utilizou-se um Planejamento Experimental para avaliar a influência de quatro variáveis de processo na remoção de colesterol. A Temperatura de contato e a Quantidade de Terra Diatomácea não influenciaram significativamente o processo de extração de colesterol, enquanto a Concentração da Solução de Quilaia (CSQ) e o pH mostraram exercer grande influência no mesmo. Aumentos na CSQ resultaram em maiores extrações de colesterol; efeito oposto foi observado para o pH: seus valores mais baixos colaboraram para uma maior redução de colesterol do óleo de manteiga.

Através da Metodologia de Superfície de Resposta e de considerações técnico-econômicas, determinou-se que o ponto operacional mais favorável para a remoção de colesterol do óleo de manteiga é definido por pH = 3 e CSQ = 0,11 g quilaia / ml solução.

A construção e análise de curvas de partição do colesterol nas diferentes fases formadas no processo permitiu determinar a significativa participação da emulsão no processo de remoção de colesterol e forneceu dados que mostram a eficácia do uso de quilaia como agente solubilizante de colesterol.

Palavras-chave: Colesterol, Colesterol-Extração, Gordura do leite

ABSTRACT

This research considered the optimization of the technological parameters involved in the process of reduction of butteroil cholesterol content. It was based on the formation of aggregates of cholesterol with micelles of saponins of *Quilaja saponaria* in aqueous solution, followed by an adsorption step of the complex formed, in diatomaceous earth.

Anhydrous butteroil containing 2,5 mg cholesterol / g oil was in contact with various quilaia aqueous solutions at controlled temperature for one hour in a orbital water bath shaker. Celite®545 was then added and the agitation maintained for one more hour. The phases were separated by decantation and the cholesterol depletion in the oil phase was monitored through gas chromatography analysis.

Experimental planning evaluated the influence of four process variables. The Contact Temperature and the Amount of Diatomaceous Earth were found to have no significant influence on the process output, while the Quilaia Solution Concentration (QSC) and its pH did influence it. Increasing QSC promoted higher cholesterol extraction, and the opposite was observed with the solution pH: lower values produced a higher removal index.

Surface Response Methodology and technical-economical reasonings indicated the most favourable conditions for cholesterol removal as pH = 3,0 and QSC = 0,11 g quilaia / ml solution.

The construction and analysis of partition curves of the cholesterol between the different phases pointed to the significant contribution of emulsion phase on the cholesterol removal and confirmed the effective of the use of quilaia aqueous extract as a solubilization agent for cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

Pesquisa recente realizada pelo *International Lipid Information Bureau*, nos Estados Unidos, mostrou que o número de pessoas com alto índice de colesterol vem aumentando em toda América Latina, inclusive Brasil, desde o ano de 1986. Isso significa que há cada vez mais gente correndo risco de vida, pois a principal consequência da elevação do nível de colesterol na corrente sanguínea é a aterosclerose, ou seja, o entupimento de artérias do corpo, que pode resultar em um infarto fulminante. No Brasil, pesquisa da Sociedade Brasileira de Cardiologia revelou que mais de 30% da população economicamente ativa, ou seja, 45 milhões de habitantes com idade média de apenas 35 anos, está ameaçada pela aterosclerose: suas taxas de colesterol estão acima de 200 miligramas por decilitro de sangue, nível máximo recomendado (Shimma et al., 1996).

Consumidores preocupados com a relação existente entre conteúdo de gordura e colesterol ingeridos, e doenças coronárias e alguns tipos de câncer, têm forçado as indústrias alimentícias a investirem em alimentos que contenham um teor reduzido de colesterol, assim como de ácidos graxos saturados e gordura, e que sejam atrativos e saborosos (Bray,1991; Hettinga,1989).

Os resultados de estudos em diversos países indicaram que o colesterol da dieta é uma variável significativa na determinação de seus níveis na circulação. Brown et al. (1981) verificaram uma relação linear entre o colesterol da dieta e seus níveis na circulação e, teoricamente, o risco de doença coronária decresceu de 3% para cada 1% da redução do colesterol plasmático. Mattson et al. (1972) assinalaram que cada 100 mg de colesterol / 1000 kcal consumida resulta em um aumento de colesterol no plasma de aproximadamente 12 mg / 100 ml.

Pesquisa realizada pelo “Food Marketing Institute” em 1990 mostrou que 44% das pessoas entrevistadas estavam preocupadas com o colesterol dos alimentos e 29% com o teor de gordura (Barr,1990). Esta preocupação tem

refletido no consumo de leite fluido nos Estados Unidos. De 1965 a 1988 a venda de leite integral caiu de 86.3% para 43.5%, enquanto que a de leite desnatado e com baixo teor de gordura subiu de 11.3% para 51% (Muck,1991).

Esta tendência de mercado também é observável no Brasil e sua satisfação exigirá o progresso tecnológico do setor industrial.

Muitos processos têm sido desenvolvidos e implementados com o objetivo de reduzir o teor de colesterol em produtos lácteos, tais como: destilação por arraste de vapor, extração supercrítica, conversão enzimática de colesterol a esteróis não absorvíveis, formação de complexos e/ou adsorção. Devido ao variado estágio de desenvolvimento de cada processo, o potencial de cada um é limitado pelo compromisso entre custos e seletividade da operação, e todas estas tecnologias apresentam vantagens e desvantagens (Sperber,1989; Bradley,1991; Morris,1991).

O presente projeto de pesquisa visa a otimização da tecnologia para redução do teor de colesterol do óleo de manteiga baseada na formação de agregados do colesterol com saponinas de *Quiluaia Saponaria Molina* e na adsorção dos complexos formados em terra diatomácea. A viabilidade técnica deste processo já foi demonstrada por Sundfeld (1992) e esta tecnologia tem como vantagens potenciais a possibilidade de ser implementada com equipamentos convencionais já disponíveis na indústria de laticínios, com escala de produção flexível e custos operacionais baixos, sem alteração da qualidade e com altos rendimentos de produto final. Este conjunto de vantagens é que torna esta tecnologia potencialmente promissora, e particularmente adequada às condições brasileiras.

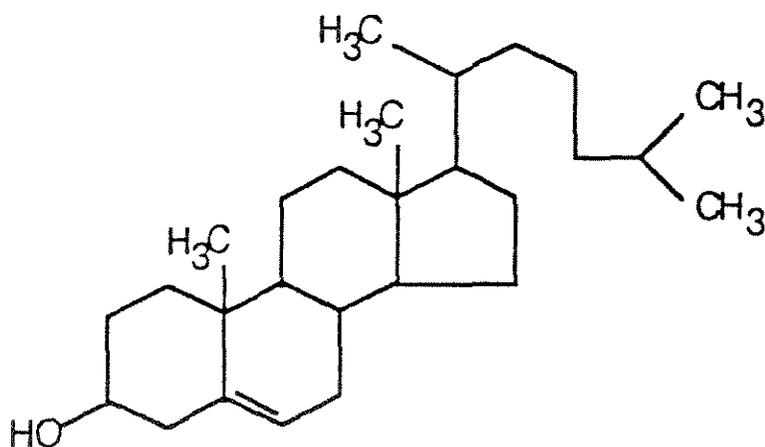
O objetivo deste trabalho é estabelecer condições que maximizem a redução de colesterol do óleo de manteiga utilizando a Metodologia de Planejamento Experimental por Análise de Superfície de Resposta, verificando como as variáveis temperatura, pH, concentração da solução aquosa de quiluaia e quantidade de terra diatomácea influenciam este processo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. COLESTEROL

Os esteróis são álcoois de alto peso molecular, pertencentes à família dos esteróides. Constituem o componente principal da fração insaponificável dos óleos e gorduras. Podem ser encontrados no estado livre ou esterificados com ácidos graxos de alto peso molecular.

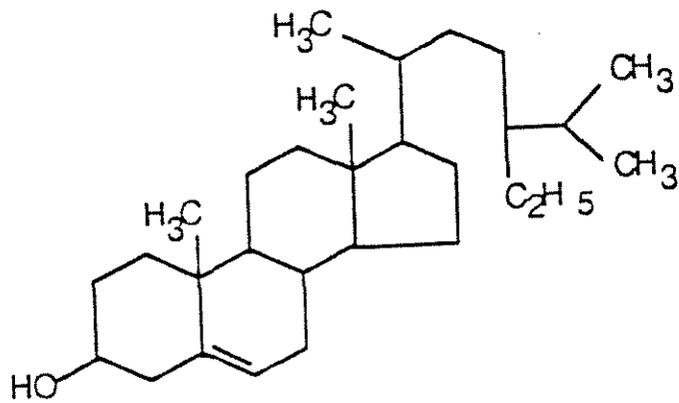
Os esteróis são classificados segundo a sua origem: zoosteróis (animal), fitosteróis (vegetal) e micosteróis (microrganismos). Entre os zoosteróis, o colesterol é o mais abundante. A Figura 2.1 apresenta a estrutura e algumas propriedades relevantes do colesterol.



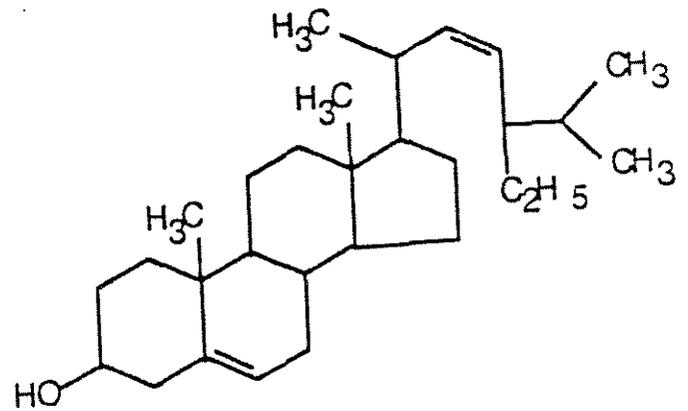
Fórmula:	$C_{27}H_{45}OH$
Peso Molecular:	386.87 g/mol
Ponto de Fusão:	148.5°C
Densidade:	1.067 g/cm ³
Solubilidade:	insolúvel - água ligeiramente solúvel - álcool solúvel - acetona, clorofórmio, éter, hexano, óleos vegetais

Figura 2.1: Estrutura e propriedades do colesterol.

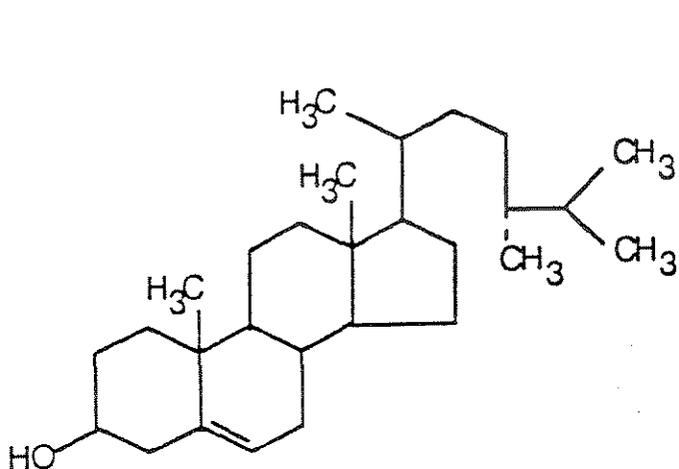
Plantas contêm quantidades insignificantes de colesterol, mas contêm outros esteróis similares como o sitosterol, estigmasterol e campesterol. O esterol mais importante produzido por fungos é o ergosterol, precursor da vitamina D₂.



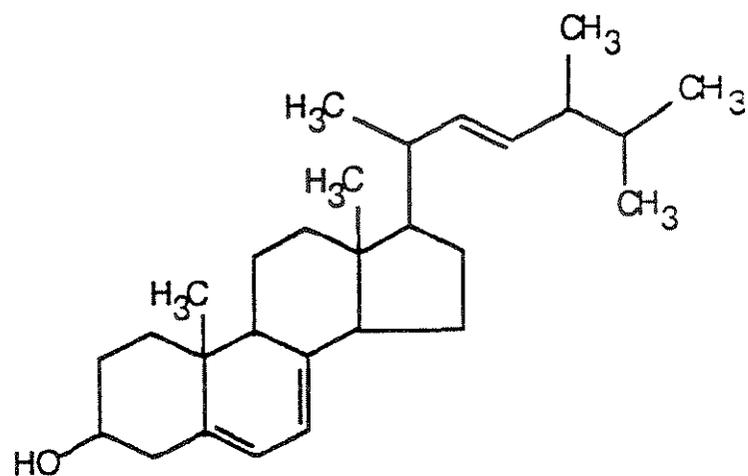
Sitosterol



Estigmasterol



Campesterol



Ergosterol

Figura 2.2: Estrutura de esteróis selecionados.

O colesterol é uma substância essencial para manter a vida e as funções normais do corpo. Ele participa da produção de hormônios que regulam desde a reprodução até o sistema imunológico. Uma de suas funções mais importantes é a de participar da síntese da vitamina D₃. Está presente nas paredes de todas as células do organismo, especialmente nas do tecido nervoso.

Aproximadamente dois terços do colesterol encontrado no organismo humano são sintetizados endogenamente, um terço é fornecido pela ingestão de produtos de origem animal (Nawar,1985).

Quando a alimentação é rica em colesterol, ocorre um bloqueio de sua síntese endógena. Por outro lado, a redução muito acentuada de colesterol alimentar pode aumentar sua fabricação biológica (Brown et al.,1981; Harper et al. 1977).

A principal via de degradação do colesterol é a conversão a ácidos biliares no fígado e a principal via de excreção do colesterol é a intestinal, onde o coprostanol (principal esteroide das fezes) é formado através da ação microbiana. Uma fração menor do colesterol é convertido em hormônios esteróides, sofrendo eliminação urinária.

O colesterol e a aterosclerose

Muitos pesquisadores demonstraram uma correlação entre os níveis elevados de lipídeos séricos e a incidência de aterosclerose. Dos lipídeos séricos, o colesterol tem sido um dos mais frequentemente apontados como envolvido na correlação (Harper et al.,1977).

A aterosclerose é uma doença caracterizada pela infiltração de colesterol na membrana interna das artérias, formando uma placa gordurosa, chamada de placa de ateroma, que pode ser fatal. É o que costuma ocorrer quando o vaso afetado é a coronária. Neste caso, privado do fluxo de sangue, o coração pode sofrer um infarto que, não raro, mata. Se o entupimento ocorrer na artéria da perna, há risco de

gangrena. E se afetar as artérias cerebrais, pode causar um derrame, com sequelas como a paralisia (Shimma, 1996).

Mas a formação da placa de ateroma não depende apenas da quantidade total de colesterol presente no sangue, mas do equilíbrio entre as frações em que se diferenciam essa substância. Há dois tipos de colesterol, chamados popularmente de bom e mau colesterol. Na realidade, trata-se da mesma substância, só que ligada a diferentes lipoproteínas, partículas de proteína e gordura que servem para transportá-la pelo organismo. Dependendo da lipoproteína ao qual se acopla, o colesterol passa a desempenhar um papel diferente. Quando se liga à apo-lipoproteína A, forma o HDL (*High Density Lipoprotein* ou lipoproteína de alta densidade), que é o colesterol bom; quando se liga à apo-lipoproteína B, origina o LDL (*Low Density Lipoprotein* ou lipoproteína de baixa densidade), que é o colesterol mau.

A apo-lipoproteína A retira o colesterol em excesso das artérias, impedindo sua deposição na parede das artérias, e por isso o HDL é bom. Já a apo-lipoproteína B faz o contrário: transporta o colesterol para os tecidos, provocando a aterosclerose e suas consequências.

Além do LDL e do HDL, outros tipos de partículas participam da captação e transporte do colesterol. Entre elas, a que mais tem chamado a atenção dos pesquisadores é a lipoproteína(a) ou Lp(a), que já está sendo considerada mais perigosa do que o LDL. Sua estrutura é semelhante ao LDL e estudos indicam que também pode se acumular nas artérias. A Lp(a) se parece com o plasminogênio, uma proteína envolvida com processo de dissolução de coágulos, que liga-se a determinados receptores para dissolver coágulos. Quando a Lp(a) toma seu lugar, acaba atrapalhando esse processo de dissolução. Por isso, quem tem Lp(a) aumentada corre maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares decorrentes de entupimento coronário.

Estudos comprovam que pessoas que têm níveis de colesterol acima da média no sangue, em cinco ou dez anos desenvolvem doenças ateroscleróticas. Assim, a doença atinge especialmente homens com mais de 45 anos de idade e mulheres após

a menopausa, pois antes, a mulher ainda tem a proteção do hormônio estrogênio, que mantém o HDL alto e, conseqüentemente, o LDL sob controle.

Dos fatores que reduzem o nível de colesterol do sangue, os mais recomendados têm sido a redução da ingestão de alimentos muito ricos em colesterol e a substituição de ácidos graxos saturados da dieta por ácidos graxos insaturados de origem vegetal. Os polinsaturados podem ser encontrados em quase todos os óleos vegetais, como soja, milho e girassol. Eles têm a propriedade de diminuir o colesterol total e também as frações de HDL e LDL. Os monoinsaturados são ainda mais saudáveis: diminuem o LDL e ainda aumentam a fração do HDL, o bom colesterol. Suas principais fontes são óleo de oliva, óleo de canola, azeitona, abacate e oleoginosas, como castanhas, nozes e amêndoas.

Teor de colesterol em produtos lácteos

O leite é uma mistura complexa de lipídeos, carboidratos, proteínas e muitos outros compostos orgânicos e sais inorgânicos dissolvidos ou dispersos em água (Meyer,1975).

Os leites humanos e bovinos contém aproximadamente 3 a 5% de lipídeos totais. Aproximadamente 98% ou mais dos lipídeos são compostos por triglicerídeos, mas pequenas quantidades de hidrocarbonetos, esteróis, mono e diglicerídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos também estão presentes. Os esteróis representam 0.2 a 0.5%. O colesterol é o esterol presente em maior quantidade (Jensen et al.,1990; Swaisgood,1985).

Colesterol é encontrado na fração lipídica em três formas: livre na gordura, ligado às lipoproteínas dos glóbulos de gordura e como éster de colesterol. Pelo menos 95% do colesterol em produtos de laticíneos encontram-se nas duas primeiras formas (Lacroix et al.,1973).

Mc Carthy et al. (1964) examinaram os destilados moleculares de óleo de manteiga e reportaram que 95% do teor total de esteróis era colesterol.

Feeley et al. (1972) observou que grupos de produtos lácteos com baixo teor de gordura têm mais colesterol em relação ao seu conteúdo de gordura do que aqueles produtos com teores mais altos de gordura; eles verificaram que enquanto o leite integral tinha ao redor de 4 mg colesterol/g gordura, o leite desnatado líquido tinha aproximadamente 30 mg colesterol/g gordura. Russel & Gray (1979) determinaram o teor de colesterol de produtos lácteos fabricados à partir de um mesmo lote de leite e reportaram que o leite integral e produtos com alto teor de gordura (leite integral em pó, manteiga e queijo) tinham um teor de colesterol ao redor de 3,0 mg/g gordura, enquanto que em produtos com baixo conteúdo de gordura (leite desnatado, sôro e concentrados de sôro) o teor de colesterol variava de 8 a 50 mg/g gordura. Eles explicaram que, após a remoção do creme, a gordura remanescente no leite desnatado consistia de uma parte dos glóbulos de gordura menores presentes no leite integral, mais a gordura oriunda de material das membranas. Já que há evidência de que o colesterol se concentra nas membranas dos glóbulos de gordura do leite, o teor relativamente alto na gordura do leite desnatado e produtos correlatos deveria ser esperada.

A faixa de valores para o teor de colesterol reportados na literatura, para um determinado produto, é usualmente larga. Esta amplitude da faixa de valores é devida não somente à variabilidade intrínseca das amostras, mas também resultado dos diferentes métodos usados na determinação de colesterol.

Os seguintes teores de colesterol em produtos lácteos, em mg/g gordura foram reportados por Lacroix et al. (1973):

- Leite integral: 3.68 - 4.49
- Manteiga: 2.60 - 3.09
- Requeijão: 2.94 - 3.38
- Leite desnatado: 9.16 - 15.16

Sweeney & Weihrauch (1976) encontraram 2.45 mg colesterol /g gordura no óleo de manteiga.

Shimma (1996) apresenta os seguintes teores típicos de colesterol para alguns alimentos:

Tabela 2.1: Teor de colesterol em alguns alimentos.

Produto	Teor de colesterol (mg/100g de produto)
Peito de frango com pele	296
Peito de frango sem pele	79
Gema de ovo	274
Bacon	198
Camarão	196
Requeijão cremoso	15
Iogurte	12

Métodos empregados para determinação do colesterol

Para determinar colesterol, geralmente utilizam-se três etapas: extração dos lipídeos, separação do colesterol dos outros lipídeos e compostos interferentes e determinação do colesterol isolado.

Lipídeos são geralmente extraídos de material biológico com solvente orgânico ou mistura de solventes. A amostra é algumas vezes saponificada antes da extração. Múltiplas extrações com mistura de solvente polar e não polar são mais eficientes para extrair colesterol de produtos lácteos, nos quais o colesterol pode estar ligado à proteína ou na membrana do glóbulo de gordura (Sundfeld,1992).

Os solventes mais comumente empregados para extrair lipídeos de produtos lácteos são: ácido salicílico-ácido sulfúrico, éter-metanol e clorofórmio-metanol

(2:1), sendo o último conhecido por recuperar maior quantidade de lipídeos em vários alimentos (Hubbard et al., 1977).

Colesterol e outros esteróis podem ser isolados através de precipitação. Digitonina precipita o colesterol livre, mas para se determinar o conteúdo de colesterol total é necessário saponificar a amostra, convertendo ésteres de colesterol em colesterol livre (Kabara, 1961).

A saponificação dos lipídeos e a extração do material insaponificável com solventes tem sido utilizada como uma alternativa eficiente para a separação do colesterol de outros lipídeos e impurezas (AOAC 28.092, 1984; AOAC 43.289, 1984).

Os métodos mais empregados para a determinação do colesterol podem ser divididos em três grupos: colorimétricos, enzimáticos e cromatográficos.

O método colorimétrico consiste na reação do colesterol com um reagente, produzindo uma cor característica.

Este método foi introduzido por Grigaut, em 1910, para a quantificação do colesterol em soro, utilizando a reação de Liebermann-Burchard (L-B), desenvolvida entre 1885 e 1890. A clássica reação de L-B consiste na reação do núcleo esterol com ácidos fortes, contudo outros esteróis que não o colesterol e outros materiais interferentes podem reagir produzindo cores semelhantes à do colesterol, comprometendo assim, a eficiência do método (Kabara, 1961; LaCroix et al., 1973).

O procedimento enzimático foi desenvolvido utilizando colesterol oxidase. Porém, a enzima ataca o núcleo comum do esterol, acusando todo esterol como colesterol (Bragagnolo, 1992).

Os métodos cromatográficos têm sido muito utilizados para determinação de colesterol nos alimentos. Os principais são: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gas-líquida (CGL). A cromatografia em camada delgada é somente usada para a separação e identificação de esteróis e outros lipídeos antes de sua determinação quantitativa.

Teoricamente, todo procedimento para determinação de colesterol através de cromatografia, deveria envolver, após o isolamento do colesterol, uma etapa de derivatização para formar éter de trimetilsilil (TMS) e então ser determinado cromatograficamente (AOAC 43.283, 1984).

Com o objetivo de tornar as análises de colesterol mais econômicas em termos de solventes, mais rápidas com a diminuição de etapas, e menos perigosas com a redução da quantidade de reagentes químicos, muitos pesquisadores desenvolveram procedimentos que eliminam ou a etapa de extração de lipídeos ou a derivatização do colesterol, quando não, as duas.

Penton (1990) utilizou cromatografia gasosa para identificar colesterol e alguns triglicerídeos na manteiga e em ovos, sem efetuar a derivatização. Os lipídeos foram extraídos utilizando o método de Folch (clorofórmio-metanol, 2:1) e diluídos em *n*-nonano. As amostras foram analisadas num cromatógrafo gasoso Varian, com injetor SPI e detetor FID, utilizando uma coluna capilar com fase estacionária 50:50 metilfenil silicone.

Fenton et al. (1990) verificou que para determinação de colesterol em gema de ovo, tanto o procedimento que utiliza a extração dos lipídeos através do método de Folch, quanto a saponificação direta utilizando solução alcóolica de KOH e posterior extração do material insaponificável com hexano, apresentaram o mesmo resultado, concluindo não ser necessário a etapa de extração dos lipídeos e nem derivatização.

Ulberth et al. (1992) utilizou saponificação direta com solução de KOH em etanol para produtos derivados de leite e repetidas extrações com ciclohexano para retirar o material insaponificável. O extrato contendo o colesterol foi injetado num cromatógrafo gasoso em solução de hexano, sem derivatização. O resultado obtido foi comparado com o procedimento que envolve extração dos lipídeos e derivatização, não apresentando diferenças significativas.

Os métodos de CGL e CLAE são qualitativos e quantitativos, muito específicos e precisos, sendo capazes em condições ótimas de determinar colesterol mesmo em amostras contendo outros esteróis e compostos interferentes, através de

seu tempo de retenção . A CLAE foi utilizada com sucesso para determinação de colesterol em leite, óleo de manteiga e produtos de cacau, mas a CGL tem sido o método preferido para quantificar o teor de colesterol em produtos lácteos.

Tecnologias para remoção de colesterol de produtos lácteos

A redução do teor de colesterol da gordura do leite tem sido investigada através de vários métodos, estabelecidos ou em desenvolvimento, tais como: destilação por arraste de vapor, extração com CO₂ supercrítico, formação de complexos e/ou adsorção, conversão enzimática, etc (Sperber,1989; Morris,1991; Bradley,1991; Dehal et al. 1991).

A destilação por arraste de vapor é o processo mais utilizado nas indústrias alimentícias. Consiste de um processo onde o produto passa em contracorrente com um vapor à 300°C. Sob esta temperatura e abaixo da pressão atmosférica, o colesterol é extraído por flasheamento. A Omega Source Corporation de Burnsville utiliza este processo obtendo remoção de 95% de colesterol do óleo de manteiga com 95% de rendimento. É um processo convencional que tem como desvantagem a perda de alguns componentes do aroma e sabor característicos do produto durante o processamento (Morris,1991; Sperber,1989).

A extração com CO₂ supercrítico é um processo que ocorre à altas pressões (centenas de atm) e relativamente baixas temperaturas (aproximadamente 38°C). Nestas condições o CO₂ é levado ao estado supercrítico e quando colocado em contato com o óleo de manteiga, extrai o colesterol (Sperber,1989). O nível de remoção de colesterol do óleo de manteiga alcançado foi de 98%, com 90% de rendimento de produto final. Este processo tem como vantagens o fato do CO₂ ser atóxico, barato, não deixa resíduos químicos e a gordura do leite obtida mantém o sabor e cor originais. Como desvantagens são os altos investimentos de capital e custos operacionais (Bradley,1991; Sperber,1989).

Ciclodextrina, um oligossacarídeo cíclico com sete grupos de glicose, foi utilizada para remoção de colesterol do leite, manteiga e gordura do leite. O complexo de inclusão do colesterol na ciclodextrina é insolúvel em solução aquosa, o qual pode ser removido por centrifugação. Este processo remove até 90% de colesterol da gordura do leite (Oakenfull & Sidhu, 1991).

A conversão do colesterol a coprostanol, esterol pouco absorvido por seres humanos, pela enzima colesterol-redutase, é a base deste método. Esta enzima pode ser obtida por síntese microbiana ou extraída de várias plantas verdes. Nas pesquisas realizadas até o momento, índices extremamente baixos de conversão foram obtidos em alimentos (incluindo produtos lácteos), comparativamente aos outros métodos (Dehal et al., 1991; Morris, 1991).

A utilização de carvão ativado para adsorção de até 95% do colesterol do óleo de manteiga foi reportada (Sundfeld, 1997). Entretanto, o processo apresenta problemas, pois promove também a remoção da cor, aroma e sabor característico do produto.

2.2. SAPONINAS

Saponinas são glicosídeos que ocorrem principalmente, mas não exclusivamente, em plantas. Suas presenças foram detectadas em pelo menos 400 plantas pertencentes a 100 famílias diferentes. Algumas destas plantas tais como espinafre, beterraba, soja e aspargos fazem parte da dieta humana enquanto outras são utilizadas na alimentação de animais (George, 1965).

Saponinas podem ocorrer em qualquer parte da planta. Elas têm sido encontradas nas raízes, caule, frutas, folhas e em alguns casos, na planta inteira. O conteúdo de saponina varia nas diferentes plantas, geralmente de 0.1 a 5%, mas na casca da quilaia ela chega a atingir 10% e na raiz da gypsófila 20% (Price et al., 1987).

Quando agitadas em água elas formam espuma e é esta característica que dá o nome ao grupo. Outras propriedades geralmente atribuídas às saponinas, como por exemplo, atividade hemolítica, propriedade de formar complexo com o colesterol e sabor amargo, não são compartilhadas por todos os membros do grupo. A ocorrência dos vários efeitos biológicos atribuídos às saponinas e as consequências fisiológicas e nutricionais de sua presença em alimentos e rações (interação com membranas celulares, efeito hipocolesterolêmico, toxicidade, etc.) dependem tanto da sua concentração quanto das estruturas químicas particulares presentes (Price et al.,1987).

Todas as saponinas são glicosídeos de esteróis ou triterpenóides com atividade de interface (tensoativos). Estes compostos anfífilicos (hidrofílico - hidrofóbico) são compostos por uma aglicona (um esterol ou triterpenóide, denominado sapogenina) ligada à uma ou mais cadeias de açúcares. Saponinas triterpênicas predominam em plantas alimentares (Price et al.,1987).

Devido à sua habilidade de formar espuma em solução aquosa mesmo à concentrações tão baixas quanto 0,01%, as saponinas têm sido largamente empregadas no preparo de bebidas, doces, shampoos, sabões e extintores de incêndio. Por causa de sua capacidade de diminuir tensão superficial e irritar as membranas da mucosa, várias preparações de saponinas tem sido usadas como antihelmínticos, como ajudante na absorção de outros remédios e como expectorantes no tratamento de bronquites crônicas (George,1965).

Determinação quantitativa de saponinas

Os métodos de análise qualitativa e quantitativa de saponinas são muito variados, tanto em natureza como em confiabilidade. Eles incluem tanto a medida de uma simples propriedade física das saponinas, tal como suas habilidades de formar espuma em água, e propriedades biológicas, tal como seu efeito hemolítico e

antifúngica, até o uso de técnicas modernas utilizando métodos cromatográficos e espectrofotométricos. O método a ser utilizado na análise de saponinas depende, principalmente, do tipo de informação desejada.

Os métodos espectrofotométricos têm sido usados para estimar tanto as saponinas triterpenoidais como as esteroidais, contudo, outros componentes têm mostrado interferência (Price et al.,1987). O teste de Lieberman-Burchard tem sido empregado para detectar a presença de saponinas, diferenciando as esteroidais das triterpenoidais (Chandel e Rastogi, 1980). Gestetner et al.(1966) utilizou o método de Lieberman-Burchard modificado para determinar o conteúdo de saponina e sapogenina em extratos de soja.

Para a determinação de espécies químicas individuais, assim como do teor total de saponinas, técnicas cromatográficas foram desenvolvidas. A cromatografia em camada delgada tem sido largamente utilizada para analisar saponinas intactas. Cromatografia gasosa (CG) geralmente requer a hidrólise das saponinas e subsequente extração e derivatização dos sapogenóis liberados assim como seus derivados. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido utilizada para quantificar e identificar as saponinas intactas, saponinas derivatizadas e sapogenóis liberados (Kaizuka e Takahashi,1983). A medição do teor total de saponinas tem sido feito com sucesso através da determinação das sapogeninas pelo método de CLAE ou CG. Os métodos envolvem a hidrólise ácida das saponinas para liberação das sapogeninas, que são extraídas do hidrolizado com solventes orgânicos e purificadas por cromatografia em coluna. As sapogeninas purificadas são quantificadas diretamente por CLAE, ou derivatizadas e quantificadas por CG (Sundfeld,1992 citando Brawn et al.,1981 e Ireland e Dziedzic,1985).

Consequências fisiológicas e nutricionais das saponinas nos alimentos

Muitos são os efeitos biológicos das saponinas e as consequências fisiológicas e nutricionais devido à sua presença em alimentos e rações (Price et al.,1987). Suas interações com membranas celulares, sua toxicidade e seu efeito hipocolesterolêmico são os mais relevantes para o presente trabalho.

Um dos efeitos biológicos mais conhecidos das saponinas é a sua capacidade de romper eritrócitos e de interagir com membranas de lipossomos. Devido as suas propriedades surfactantes, as saponinas a concentrações mais altas, podem destruir completamente as membranas através da solubilização de seus componentes.

A toxicidade das saponinas tem sido estudada por vários autores (George,1965; Price et al.,1987). Há variação de toxicidade em saponinas de diferentes espécies. Apesar da alta toxicidade de algumas saponinas quando injetadas intravenosamente em alguns animais, seus efeitos tóxicos são muito menores quando administrada oralmente (George,1965).

Embora com alguma controvérsia, há muita evidência de que saponinas presentes na dieta causam a diminuição da concentração de colesterol no sangue em várias espécies de animais e no homem. Alguns autores chegaram a propor que a ingestão de alimentos contendo saponinas poderia ser útil para reduzir o risco de ataques cardíacos em pacientes com altos teores de colesterol no sangue.

Os mecanismos propostos para o efeito hipocolesterolêmico incluem a formação pelas saponinas, no trato gastrointestinal, de micelas ou complexos com 1) o colesterol da dieta, evitando sua absorção, ou 2) os ácidos biliares, tornando-os indisponíveis para reabsorção e aumentando sua eliminação pelas fezes, uma perda compensada pelo aumento da síntese à partir do colesterol endógeno, resultando numa redução nos níveis de colesterol no sangue e fígado (Sidhu e Oakenfull,1986).

Saponinas de *Quilaia saponaria*

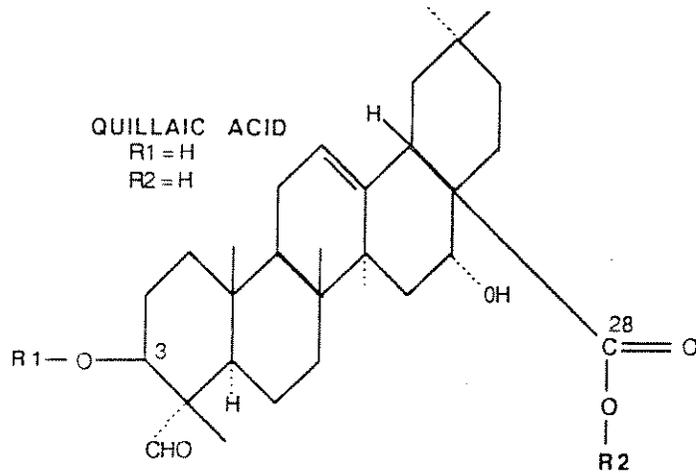
Quilaia é o nome comercial de uma série de produtos obtidos das cascas de quilaia saponaria, uma árvore nativa do Chile e Peru e cultivada no sul da Califórnia.

A casca da árvore de quilaia contém aproximadamente 10% de saponina que é usada como fonte de saponina comercial, além de taninos, oxalato de cálcio, açúcares, amido e outros componentes.

A quilaia é utilizada nas indústrias alimentícias no preparo de doces, produtos de confeitaria, gelatinas e como agente espumante em bebidas.

As propriedades espumantes e emulsificantes das saponinas de quilaia são uma consequência direta de suas estruturas químicas. Elas são compostos anfífilos, com uma aglicona hidrofóbica (sapogenina) determinada após a hidrólise ácida, como sendo um triterpenóide: ácido quilaico ou ácido gipsogênico (Price et al.,1987). As partes hidrofílicas são duas cadeias complexas de açúcares ligadas aos carbonos C₃ e C₂₈ da sapogenina; estes açúcares foram identificados como ácido glucurônico, galactose, glicose, arabinose, xilose, fucose, ramnose e apiose. O número de espécies moleculares individuais presentes em um extrato de quilaia é enorme como resultado das diferentes combinações possíveis da aglicona e dos açúcares (Sundfeld,1992 citando Labriola e Delofeu,1969 ; Karting e Ri,1973; Higuch et al.,1987 e Kensil et al.,1991). A Figura 2.3 apresenta uma das espécies químicas de saponinas encontradas na quilaia.

Pelo fato das saponinas de quilaia serem largamente utilizadas como aditivos em alimentos, elas têm sido submetidas à testes toxicológicos. Nenhum efeito tóxico significativo foi observado em estudos de curta duração de alimentação de ratos, ou de camundongos aos quais foram administradas dietas com níveis de saponinas de 1.5% por prolongado período de tempo (Price et al.,1987).



R1	R2
xyl — glr — gal	fuc api — xyl — rham glc

Figura 2.3: Saponina de Quilaia saponaria.

Oakenfull (1986) tem demonstrado que saponinas purificadas obtidas da Quilaia saponaria formam agregados micelares com ácidos biliares, reduzindo sua absorção. Com isso ocorre a síntese de ácidos biliares a partir do colesterol, diminuindo seu conteúdo no organismo. Estudos realizados descrevem um significativo efeito hipocolesterolêmico da quilaia em ratos alimentados com uma dieta baixa de colesterol, o que também sugere uma redução na absorção de ácidos biliares (Rao e Kendall, 1986).

Formação de complexos como um processo de extração

A formação de complexos entre algumas saponinas e esteróis livres (como o colesterol) é um fenômeno conhecido há muito tempo. Digitonina formando complexos insolúveis com o colesterol tem sido reportado por diversos autores.

Schwartz et al. (1967) desenvolveram um procedimento quantitativo para remoção de colesterol do óleo de manteiga, baseado na passagem do óleo de manteiga solubilizado em hexano, por uma coluna de Celite®545 impregnada com uma solução aquosa de digitonina. Os esteróis são eluídos da coluna com sulfóxido dimetila, que dissolve o complexo colesterol-digitonina, sendo o colesterol então recuperado por extração com uma mistura hexano-benzeno (1:1).

Micich (1990) reportou que a digitonina ligada a polímeros complexou colesterol a partir de soluções de colesterol e de óleo de manteiga em vários solventes (hexano, etanol 84%, água saturada com acetato de etila e benzeno). Os níveis de complexação de colesterol se mostraram dependentes do solvente: a complexação à partir do hexano foi máxima.

Sundfeld (1992) estudando um processo para remoção de colesterol de óleo de manteiga denominado por ele de “Reação”, onde o óleo de manteiga era misturado com uma solução aquosa de quilaia, não verificou a formação de um complexo insolúvel, como era esperado, para justificar os níveis de remoção de colesterol observados. O precipitado formado continha quantidades desprezíveis de colesterol, sendo composto pela fração da quilaia insolúvel em meio aquoso. Considerando este resultado, Sundfeld (1992) e Sundfeld et al. (1993a,1993b) propuseram um mecanismo básico envolvido na separação de colesterol: um fenômeno de partição do colesterol à partir da fase oleosa numa dispersão coloidal das saponinas, com solubilização do colesterol nas micelas das saponinas presentes em solução aquosa.

Formação de micelas e solubilização do colesterol

As moléculas individuais ou monômeros que podem tomar parte no processo de formação de micela são caracterizados por possuírem duas regiões em sua estrutura química. Uma é a região hidrofóbica, e a outra é um grupo ionizado ou solúvel em água, conhecido como a região hidrofílica da molécula. Esta natureza dupla é responsável pelas propriedades de formação de micela, atividade de superfície e solubilização (Elworthy et al., 1968; Everett, 1989).

A concentração limite do tensoativo na qual começa um extensivo processo de formação de micelas em solução é conhecida como Concentração Crítica de Micela (CCM).

Dada a natureza anfifílica das moléculas de surfactantes, as micelas se formam em solução aquosa como uma alternativa à acumulação em superfícies ou interfaces. Quando uma fase não polar está presente, o surfactante então se acumula na interface e reduz sua tensão. Se a disponibilidade de interfaces é nula ou insuficiente, e a concentração de surfactante na água é aumentada, as micelas se formam. Portanto, a formação de micelas é uma alternativa à acumulação em interfaces (Sundfeld, 1994).

Em sistemas onde estão presentes interfaces ar-água e óleo-água assim como um adsorvente sólido, a formação de micelas em solução é um processo que compete com qualquer dos outros processos possíveis (por exemplo: acumulação nas interfaces, adsorção no sólido, formação de estruturas organizadas que não as micelas como filmes e bicamadas) em que os monômeros participam (Mittal & Mukerjee, 1976).

Muitas informações da literatura demonstram que soluções de surfactantes acima da CCM são capazes de dissolver quantidades substanciais de solutos insolúveis em água, e portanto o aumento de solubilidade tem sido correlacionado com propriedades coloidais.

Fatores importantes a observar nas determinações dos níveis de solubilização são o controle preciso de temperatura (já que as propriedades de solubilização são sensíveis à temperatura) e a garantia de que o equilíbrio tenha sido atingido (o tempo para atingimento do equilíbrio pode variar desde horas até meses, dependendo da estrutura química e estado físico do solubilizado, concentração do agente tensoativo, temperatura, nível de agitação, entre outros fatores).

A capacidade de solubilização das micelas para um certo soluto depende em grande parte, da natureza do soluto e do surfactante. Surfactantes não-iônicos geralmente apresentam menores valores para CCM do que os surfactantes iônicos porque as micelas formadas por surfactantes não-iônicos não são influenciadas por forças de repulsões eletrostáticas, o que interfere fortemente nas micelas iônicas (Dunn et al., 1985).

Praticamente insolúvel em água, o colesterol é facilmente solubilizado em soluções contendo compostos anfifílicos. A solubilização de colesterol em soluções aquosas micelares tem sido estudada numa variedade de sistemas distintos, particularmente objetivando o entendimento de suas funções estruturais e funcionais em sistemas biológicos.

É reconhecida a importância de micelas e micelas mistas no transporte e adsorção de lipídeos e como solubilizadores de colesterol em sistemas fisiológicos. Os sais biliares (tensoativos formadores de micelas) em particular foram muito estudados pela sua ação nos processos de absorção de gorduras (Florence, 1976).

Um número imenso de compostos distintos tem sido sintetizado ou identificado para uso como agentes tensoativos, entre eles as saponinas de quilaia. Estes colóides de associação são uma mistura complexa de diferentes espécies químicas que podem ter como região solúvel em água um grupo não iônico (como um carboidrato) ou um ânion (tal como a carboxila do ácido glucurônico); a região hidrofóbica é um triterpenóide (Oakenfull, 1981; Price et al., 1987).

2.3. ESTADO ATUAL DA TECNOLOGIA

Sundfeld et al. (1993a,b) estudaram a viabilidade de remover colesterol do óleo de manteiga colocando-o em contato com uma solução aquosa de saponinas de *Quiluaia saponaria* e separando o complexo formado pela saponina com o colesterol. Três processos foram estudados: 1) Reação (R): o óleo de manteiga foi misturado com uma solução aquosa de saponinas; 2) Reação + Adsorção (R+A): adicionou-se terra diatomácea à mistura formada na etapa de reação; 3) Reação + Lavagem (R+L): a fase aquosa resultante da reação (1) foi descartada e água pura foi adicionada à fase gordura resultante.

Dos três, o processo R+A foi o que produziu uma maior remoção de colesterol do óleo de manteiga, nas condições estudadas.

Sundfeld et al. (1993a,b) estudaram os efeitos de parâmetros de processo (pH, temperatura (T), concentração da solução de quilaia (CSQ), quantidade de terra diatomácea (QTD), tempo de contato e agitação) na remoção de colesterol do óleo de manteiga nos processos mencionados. Observaram que para o processo R+A, um aumento na CSQ e na QTD levaram a um aumento dos níveis de remoção de colesterol. Tendência oposta foi verificada para o pH e temperatura, isto é, suas reduções levaram a um aumento dos níveis de remoção de colesterol do óleo de manteiga. Já a agitação e o tempo de reação, não apresentaram efeitos significantes na redução do teor de colesterol, nos níveis investigados.

Num trabalho posterior, Sundfeld et al. (1994a) estudando os efeitos de parâmetros de processo (pH, T, CSQ, QTD) na separação de colesterol do óleo de manteiga utilizando quilaia e terra diatomácea, observaram que, na faixa estudada, a temperatura não teve um efeito significativo na remoção de colesterol, o que está em desacordo com os resultados preliminares de Sundfeld et al. (1993a,b). Um outro ponto observado foi que, apesar dos procedimentos experimentais serem análogos, os níveis de remoção de colesterol encontrados foram sensivelmente menores que os obtidos por Sundfeld et al. (1993a,b). Como a quilaia utilizada foi obtida de fontes

distintas nos dois trabalhos, foi sugerido como uma possível explicação que, os menores níveis de remoção de colesterol seriam devidos ao emprego de uma quilaia menos efetiva, e uma eventual significância do efeito da temperatura no processo poderia não ter sido detectado. Esta suposição foi verificada por Sundfeld et al. (1994 c) num estudo comparativo das duas quilaias. Uma explicação provável foi obtida por Sundfeld (1997) que encontrou teores diferentes de saponinas nas duas quilaias, confirmando que a quilaia utilizada no trabalho onde a remoção de colesterol foi maior possuía quase três vezes mais saponinas do que a de menor remoção.

Sundfeld (1997) utilizou soluções de colesterol em decano, como substitutivo do óleo de manteiga para tentar uma melhor caracterização da solução aquosa de quilaia, buscando evidências que comprovassem que o mecanismo de extração de colesterol do óleo de manteiga, fosse realmente, a solubilização do mesmo em micelas de saponinas. Os resultados mostraram que as condições que promovem a formação de micelas (redução da CCM) resultaram em maiores níveis de colesterol solubilizado na fase aquosa. Também não se observou qualquer alteração no teor de colesterol na fase decano em contato com soluções de quilaia abaixo da CCM e, aumentando-se a concentração de quilaia em solução acima da CCM, aumentaram-se os níveis de colesterol solubilizado na fase aquosa. Estes resultados contribuem para a validação da hipótese de que o mecanismo de solubilização de colesterol em micelas seja o preponderante no processo.

A otimização do processo desenvolvido por Sundfeld (1992) fornecerá subsídios que contribuirão para a compreensão, domínio e desenvolvimento desta moderna tecnologia usada para reduzir o teor de colesterol em produtos lácteos.

2.4. APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

Os processos químicos geralmente envolvem muitas variáveis. Quando o número destas é grande, torna-se praticamente inviável realizar todos os experimentos necessários para estudar a influência de todas as variáveis no processo pelos métodos tradicionais. Entretanto, escolhendo um método de planejamento adequado (por exemplo, o fatorial fracionário), é possível programar os experimentos para estudar um grande número de variáveis de maneira compactada e então selecionar aquelas que realmente são importantes para estudos mais detalhados.

A decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis, possibilita o planejamento e execução de forma organizada de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Permite ainda a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, através de programas estatísticos de regressão (Box et al.,1978).

É importante ressaltar que, por mais sofisticadas que sejam as teorias matemáticas ou estatísticas envolvidas num método de planejamento experimental, estas não podem substituir medidas experimentais precisas e exatas, o bom senso e o conhecimento sobre o problema em estudo.

Os métodos de planejamento experimental mais conhecidos são o Simplex, o Planejamento Fatorial e o Método de Análise por Superfície de Resposta. O método Simplex e suas derivações são mais adequados para ensaios rápidos, já que a especificação das condições nas quais deve ser realizado o ensaio seguinte depende da resposta do ensaio anterior (Barros et al.,1995).

A Metodologia de Superfície de Resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por G.E.P. Box na década de 50, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (Barros et al.,1995). Consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como rendimento, produtividade, viscosidade, etc.) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (como tempo, temperatura, concentração, pH, etc.). Estas técnicas são usadas para resolver principalmente as seguintes questões:

- Como uma resposta particular é afetada sobre uma região de interesse por um dado conjunto de variáveis de entrada;
- Quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão num produto dentro das especificações desejadas;
- Quais os valores das variáveis de entrada que levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto (Box et al.,1978).

Para realizar um estudo pelo método de análise de superfície de resposta, inicia-se programando os ensaios que devem ser feitos através de um planejamento fatorial, que consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como se deseja reduzir o número de ensaios ao mínimo possível, um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável é especificamente eficiente. Se “n” variáveis estão envolvidas no estudo de um determinado sistema, o número de experimentos que devem ser realizados para investigar todas as combinações possíveis é portanto 2^n . Acrescentam-se ainda ensaios em triplicata realizados nas condições correspondentes às intermediárias entre as dos 2 níveis atribuídos a cada variável (nível 0 ou ponto central do planejamento) com o objetivo de estimar o erro experimental associado aos ensaios (Barros et al.,1995).

Neste ponto, pode-se considerar encerrado o método de planejamento fatorial. Com os dados obtidos após a execução dos ensaios é possível calcular os efeitos individuais e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado, e até ajustar um modelo de 1ª ordem para correlacionar variáveis e respostas (Barros et al., 1995).

Caso se deseje explorar outras condições experimentais não previstas pelo planejamento fatorial ou se o modelo de 1ª ordem proposto não estiver bem correlacionado com os dados experimentais, é necessário recorrer ao Método de Análise de Superfície de Resposta (Barros et al., 1995).

Para avaliar se os modelos empíricos obtidos através de regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, Barros et al. (1995) sugerem que seja feita uma análise estatística, utilizando como parâmetros o coeficiente de correlação da regressão e principalmente, o valor estimado para o teste F.

A avaliação da qualidade de um modelo estatístico deve ser rigorosa e seguir os seguintes critérios:

- a.1) Os resíduos (diferença entre os valores previstos pelo modelo e os obtidos experimentalmente) deixados pelo modelo devem ser pequenos. Um modelo ideal não deixaria resíduo algum: todas as suas previsões coincidiriam com os resultados observados.
- a.2) O valor de R^2 deve ser o mais próximo de um.
- a.3) Teste F para a regressão. O valor de F estimado pelo modelo deve ser maior do que o F tabelado (pelo menos de 4 a 5 vezes, segundo Box e Wetz, 1973).
- a.4) Teste F para a falta de ajuste. O valor de F estimado pelo modelo para a falta de ajuste deve ser menor do que o F tabelado
- a.5) Análise gráfica dos resíduos em função das respostas previstas pelo modelo.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais. Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais é perfeita. Quando este valor é zero, não existe correlação. A análise dos valores intermediários não pode ser expressa de forma tão simples, mas em termos qualitativos, quanto mais próximo da unidade estiver o valor do coeficiente de correlação, melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o valor estimado para F a partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas e com isso analisar se os dados experimentais são representados pelo modelo proposto com alto nível de confiança.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Óleo de Manteiga

Todos os ensaios foram realizados com o mesmo lote de óleo de manteiga anidro, produzido na Nova Zelândia e doado pela Nestlé Industrial e Comercial Ltda, de São José do Rio Pardo. O óleo foi mantido a -20° C até ser utilizado nos experimentos. O conteúdo inicial de colesterol neste óleo foi avaliado em 2,521 mg/g (Ver Seção 3.3.3.1).

A composição em ácidos graxos foi determinada pelo Laboratório de Óleos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, usando cromatografia gasosa. O resultado está apresentado na Tabela 3.1. Observa-se o predomínio do ácido oléico, conferindo a esse produto, uma certa fluidez a temperatura ambiente.

Tabela 3.1: Composição em ácidos graxos do óleo de manteiga.

Ácidos graxos	Composição	Porcentagem
Butírico	4:0	4,86
Capróico	6:0	1,99
Caprílico	8:0	1,12
Cáprico	10:0	1,99
1 decílico 1 decanóico	11:0	0,25
Láurico	12:0	2,37
Mirístico	14:0	9,22
Penta decanóico	15:0	2,49
Palmitico	16:0	25,28
Esteárico	18:0	11,33
Palmitoleico	16:1	2,49
Oleico	18:1	30,76
Linoleico	18:2	2,74
Linolênico	18:3	3,11

3.1.2. Extratos de Quilaia

Em todos os experimentos foi utilizado um mesmo lote (93H0061) de saponinas de quilaia, adquiridas da Sigma Chemical CO., U.S.A.

A composição química fornecida pelo fabricante a respeito do lote utilizado é:

13,7% Sapogeninas	3,19% K	0,46% S
44,3% C	1,54% Ca	0,22% P
14,6% Cinzas	1,08% Mg	0,16% Na

Uma análise centesimal de seus principais constituintes foi feita, a pedido, pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas, e indicou:

23,40% Açúcar total	6,91% Umidade	0,70% Fibras
19,67% Açúcar redutor	6,23% Tanino	
11,22% Cinzas	1,40% Proteínas	

3.1.3. Terra Diatomácea

Um mesmo lote (1083) de Celite®545, da Nuclear, São Paulo, foi usado em todos os experimentos. O Celite®545 é uma terra diatomácea calcinada, um pó branco, sem odor, com tamanho médio de partícula de 36,2 microns. Algumas características fornecidas pelo fabricante são:

pH =10	0,6% MgO
89,6% SiO ₂	0,5% CaO
4,0% Al ₂ O ₃	0,2% P ₂ O ₅
3,3% Na ₂ O+K ₂ O	0,2% TiO ₂
1,3% Fe ₂ O ₃	0,1% de umidade

3.1.4. Reagentes e outros materiais

- Hidróxido de sódio 1N , Merck S.A Indústrias Químicas.
- Ácido Clorídrico 1N , Merck S.A Indústrias Químicas.
- Colesterol 96% de pureza, para cromatografia, Sigma Chemical CO.
- Hidróxido de potássio em lentilhas P.A., 85% de pureza, Merck S.A Indústrias Químicas.
- Etanol Absoluto P.A., 99,8% de pureza, Merck S.A Indústrias Químicas.
- Hexano P.A., Merck S.A Indústrias Químicas.
- Acetona P.A., Synth.
- Clorofórmio P.A., Merck S.A Indústrias Químicas.
- Metanol grau gradiente para cromatografia, Merck S.A Indústrias Químicas.
- Papel de filtro #1, 125mm diâmetro, Whatman International Ltda.

3.2. EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos de ensaio, Phoenix, modelo AP56.
- Balança Analítica, Ohaus, modelo Plus
- Banho com agitação e temperatura controlados, Lab-Line.
- Banho com temperatura controlada, Haake, modelo K.
- Banho de ultra-som, Thornton, modelo T14.
- Centrífuga refrigerada, Hitachi, modelo CF15D, rotação 15000 rpm.
- Estufa à vácuo Fanem, modelo 099EV.
- pHmetro WTW, modelo pH 320.
- Placa com aquecimento e agitação Fisatom.



- Cromatógrafo gasoso Varian Star 3400 CX com amostrador automático 8200 CX.

Coluna: DURABOND-5, 30m x 0,25mm , espessura da fase estacionária 0,1 μm , faixa de temperatura 60° a 325° / 350° C, J&W Scientific, Folsom , CA. Temperatura inicial 150° C, aumentando para 325° C a uma taxa de 20° C / min e então mantendo por 5 minutos.

Pré-coluna: J&W Scientific , 1m x 0,32mm , sem fase estacionária.

Injetor: SPI com insersor empacotado. Temperatura inicial 150° C , aumentando para 335° C a uma taxa de 115° C /min mantendo por 10 minutos.

Detector: FID , temperatura 340° C , atenuação 16 , range 12.

Gás de arraste: Hidrogênio puríssimo

Amostragem: Modo padrão, 0,5 μL .

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Otimização do processo de remoção de colesterol

- *Planejamento dos experimentos*

Para otimizar o processo de remoção de colesterol do óleo de manteiga utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta (Bruns et al.,1995). Conforme determina esta técnica, deve-se iniciar o estudo através de um Planejamento Fatorial, onde o número de experimentos é 2^n (n é o número de variáveis) e mais uma triplicata no ponto central para determinação do erro experimental.

A partir das informações obtidas de trabalhos anteriores (Sundfeld et al.,1993), foram identificadas 4 variáveis para serem avaliadas:

- Concentração da solução de quilaia (CSQ)
- Quantidade de terra diatomácea adicionada (QTD)
- Temperatura (T)
- pH

Portanto, foram necessários $2^4 = 16$ experimentos para o planejamento fatorial inicial (Ensaio 1 a 16) e mais 3 experimentos no ponto central (Ensaio 17, 18 e 19).

Para o planejamento composto central (configuração “estrela”) foram realizados $2n = 8$ ensaios (Ensaio 20 a 27) e mais uma duplicata no ponto central (Ensaio 28 e 29).

Após atribuir valores para todos os níveis de cada variável (Tabela 3.2), um quadro representando todos os ensaios de otimização realizados com as respectivas condições experimentais pôde ser construído e está apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.2- Valores reais e codificados atribuídos às variáveis

Nível	CSQ (g/ml)	QTD (g/g)	T (°C)	pH
-2	0,02	0,08	35,0	3
-1	0,065	0,16	43,75	4
0	0,11	0,24	52,5	5
+1	0,155	0,32	61,25	6
+2	0,20	0,40	70,0	7

Codificação das variáveis:

$$VC = \frac{VR - VR(PC)}{\Delta VR} \quad \text{onde,}$$

VC - Variável codificada

VR - Variável real

VR (PC) - Valor da variável no ponto central

$$\Delta VR = \frac{VR(+1) - VR(-1)}{2}$$

Assim,

$$X_1 = \frac{CSQ - 0,11}{0,045} \quad X_2 = \frac{QTD - 0,24}{0,08} \quad X_3 = \frac{T - 52,5}{8,75} \quad X_4 = \frac{pH - 5}{1}$$

Tabela 3.3- Especificação das condições experimentais de todos os ensaios executados para o Planejamento Experimental.

Ensaio	X ₁	CSQ (g/ml)	X ₂	QTD (g/g óleo)	X ₃	T(°C)	X ₄	pH
1	-1	0,065	-1	0,16	-1	43,75	-1	4
2	+1	0,155	-1	0,16	-1	43,75	-1	4
3	-1	0,065	+1	0,32	-1	43,75	-1	4
4	+1	0,155	+1	0,32	-1	43,75	-1	4
5	-1	0,065	-1	0,16	+1	61,25	-1	4
6	+1	0,155	-1	0,16	+1	61,25	-1	4
7	-1	0,065	+1	0,32	+1	61,25	-1	4
8	+1	0,155	+1	0,32	+1	61,25	-1	4
9	-1	0,065	-1	0,16	-1	43,75	+1	6
10	+1	0,155	-1	0,16	-1	43,75	+1	6
11	-1	0,065	+1	0,32	-1	43,75	+1	6
12	+1	0,155	+1	0,32	-1	43,75	+1	6
13	-1	0,065	-1	0,16	+1	61,25	+1	6
14	+1	0,155	-1	0,16	+1	61,25	+1	6
15	-1	0,065	+1	0,32	+1	61,25	+1	6
16	+1	0,155	+1	0,32	+1	61,25	+1	6
17	0	0,11	0	0,24	0	52,5	0	5
18	0	0,11	0	0,24	0	52,5	0	5
19	0	0,11	0	0,24	0	52,5	0	5
20	-2	0,02	0	0,24	0	52,5	0	5
21	+2	0,20	0	0,24	0	52,5	0	5
22	0	0,11	-2	0,08	0	52,5	0	5
23	0	0,11	+2	0,40	0	52,5	0	5
24	0	0,11	0	0,24	-2	35,0	0	5
25	0	0,11	0	0,24	+2	70,0	0	5
26	0	0,11	0	0,24	0	52,5	-2	3
27	0	0,11	0	0,24	0	52,5	+2	7
28	0	0,11	0	0,24	0	52,5	0	5
29	0	0,11	0	0,24	0	52,5	0	5

- ***Preparação da solução de quilaia***

As soluções de quilaia foram preparadas com concentrações e pHs conforme definidos no planejamento experimental. As soluções eram preparadas diariamente de acordo com a necessidade de realização dos experimentos.

Adicionou-se água destilada a uma quantidade determinada de quilaia e misturou-se dentro de um béquer colocado sobre uma placa com agitação. O pH era corrigido utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N, até atingir o valor requerido (ácido ou básico) medido pelo pHmetro. O pH da solução aquosa de quilaia sem correção era aproximadamente 4,98. A solução era então transferida para um balão volumétrico e completava-se o volume com água destilada .

- ***Realização dos ensaios***

Todos os ensaios foram realizados aleatoriamente, seguindo as condições especificadas pelo planejamento experimental.

- a) 30 gramas de óleo de manteiga eram colocados dentro de erlenmeyers de 250ml , e trazidos à temperatura ambiente. Duas esferas de vidro (diâmetro=12mm) eram colocadas em cada frasco com o objetivo de ajudar na agitação .
- b) 50ml da solução aquosa de quilaia, com concentração e pH definidos, eram adicionados aos erlenmeyers.
- c) Os frascos eram colocados dentro do banho com temperatura sob condições especificadas e agitação de 150 rpm, durante uma hora.
- d) Decorrido o tempo de contato líquido-líquido, a quantidade de Celite®545 pré-estabelecida era então adicionada diretamente dentro dos frascos e o processo continuava por mais uma hora, a fim de estabelecer o equilíbrio sólido-líquido-líquido, mantendo-se as condições de temperatura e agitação.

e) Interrompia-se então a agitação, retiravam-se as esferas de vidro e transferia-se o sistema trifásico para um frasco plástico, que permanecia imerso por vinte e quatro horas dentro do banho com controle de temperatura, na mesma condição em que foi realizado o experimento, a fim de separar as fases por decantação. O tempo de 24 horas foi determinado ser suficiente para que o sistema (três fases) atingisse um equilíbrio, em termos de partição de colesterol.

f) Após a separação, retirava-se uma amostra da fase oleosa (emulsão) que era colocada no banho de ultra-som por vinte e quatro horas e centrifugada para separar o óleo da fase aquosa, originários da emulsão. O óleo era armazenado à -20°C para posterior análise de colesterol e umidade.

A Figura 3.1 é uma representação esquemática do processo de extração de colesterol do óleo de manteiga utilizando solução aquosa de saponinas de quilaia e terra diatomácea.

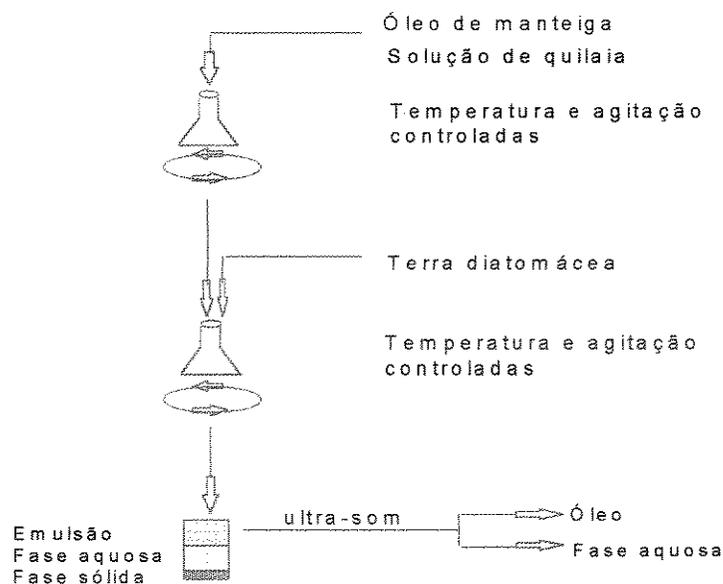


Figura 3.1: Fluxograma experimental do processo de extração de colesterol do óleo de manteiga utilizando saponina de quilaia e terra diatomácea.

3.3.2. Estudo do equilíbrio trifásico

Os estudos de partição do colesterol no sistema trifásico (fase oleosa, fase aquosa e torta) foram realizados em dois pHs diferentes (pH 3 e pH 4), mantendo-se constantes as outras variáveis. Os valores escolhidos de pHs foram os mais baixos estudados, devido aos mesmos contribuírem para uma maior remoção de colesterol. Trabalhou-se com sete amostras de óleo de manteiga nas quais variou-se a concentração de colesterol, por meio da adição do mesmo em diferentes proporções. Os ensaios foram idênticos aos da otimização (de a a e) acrescidos das seguintes etapas:

- g) Após a separação das fases, retirava-se amostras da fase oleosa, fase aquosa e torta (fase sólida formada principalmente pelo Celite® 545).
- h) A fase oleosa recebia o mesmo tratamento anterior (item f).
- i) A fase aquosa era centrifugada obtendo-se uma fina película de emulsão sobrenadante e a fase aquosa límpida, com aparência semelhante à solução de quílaia original. A emulsão era descartada e a fase aquosa mantida à -20°C para posterior análise de colesterol.
- j) A torta era armazenada à -20°C para posterior análise de colesterol, determinação de umidade e extração de óleo.

3.3.3. Análises Químicas

3.3.3.1. Determinação de Colesterol

A quantidade de colesterol do óleo de manteiga, fase oleosa, fase aquosa, torta e óleo extraído da torta foi determinada por um procedimento que envolvia a saponificação dos lipídeos, extração da fração insaponificável com hexano e determinação quantitativa de colesterol nesta fração usando cromatografia gasosa.

- **Saponificação**

Amostras do óleo de manteiga, da fase oleosa, da fase aquosa, da torta e do óleo extraído da torta foram descongeladas e muito bem homogenizadas. Pesava-se aproximadamente 0,3000 gramas do óleo de manteiga e da fase oleosa ou 0,5000 gramas da fase aquosa e da torta, diretamente dentro de tubos de ensaio de 50ml com tampa rosqueável. O óleo extraído da torta era analisado em sua totalidade, pois a quantidade determinada era sempre pequena. Adicionava-se 10ml de solução 20% KOH em etanol 90% em cada tubo. Os tubos eram bem fechados e colocados num banho de água à 80°C durante 15 minutos, com agitação, para completar a saponificação (Bohac,1988).

- **Extração dos insaponificáveis**

A fração insaponificável que contém o colesterol, era obtida através de extrações com hexano. O método empregado foi uma adaptação do método desenvolvido por Bohac (1988) para determinação de colesterol em carnes utilizando técnicas colorimétricas.

- a) Após saponificação da amostra, adicionava-se 5ml de água destilada aos tubos que eram deixados sob agitação até esfriarem à temperatura ambiente.
- b) Adicionava-se 10ml de hexano e agitava-se por 1 minuto num agitador de tubos de ensaio.
- c) Após a separação das duas fases (hexano e fração saponificável) transferia-se a fase hexano, com uma pipeta, para um outro tubo de ensaio previamente tarado.
- d) Repetia-se o item b) e c) mais duas vezes num total de três extrações em série.
- e) Pesava-se o tubo de ensaio com hexano e determinava-se o volume de solvente.
- f) Uma alíquota de hexano era retirada e colocada no frasquinho do amostrador automático do cromatógrafo gasoso e as amostras eram analisadas.

- **Determinação de colesterol utilizando cromatografia gasosa**

Curva de calibração

Soluções padrão de colesterol em hexano foram preparadas com concentrações 0,01 ; 0,05 e 0,1 mg/ml e injetadas no cromatógrafo. Construiu-se um gráfico plotando-se as áreas obtidas em relação as concentrações de colesterol e uma reta ajustou-se aos dados, sendo possível achar o fator de relação entre área e concentração (coeficiente angular).

A curva de calibração obtida é mostrada na Figura 3.2.

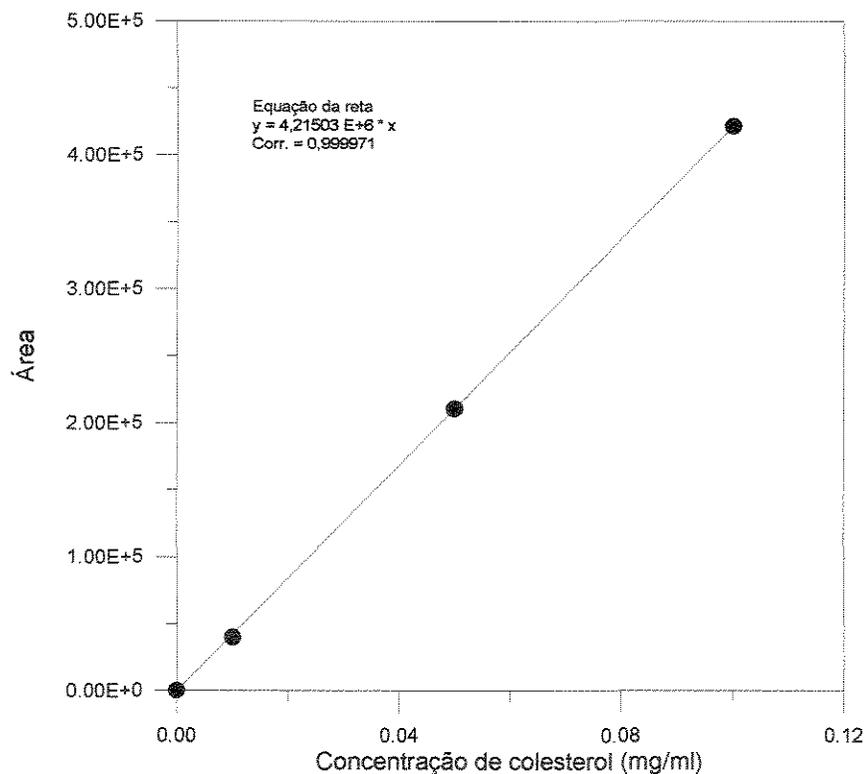


Figura 3.2 - Curva de calibração para o colesterol.

Teste de reprodutibilidade

Testou-se a reprodutibilidade do método de extração do insaponificável com hexano, determinando-se colesterol em dez amostras de óleo de manteiga.

O método mostrou-se eficiente e bastante reprodutível, apresentando um desvio padrão de 0,048. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Valores de concentração de colesterol em dez amostras de óleo de manteiga.

Amostra de óleo de manteiga	Concentração de colesterol (mg/g)
1	2,429
2	2,512
3	2,531
4	2,502
5	2,540
6	2,487
7	2,529
8	2,518
9	2,621
10	2,538
Valor médio	2,521
Desvio padrão	0,048

3.3.3.2. Determinação de umidade nas fases oleosas e nas tortas

Vidros de relógio foram lavados e secos na estufa à 100°C por 1 hora. Depois de resfriados, eles foram pesados em balança analítica, com precisão de 4 casas decimais. Amostras (ca. 3g) da fase oleosa e da torta foram pesadas com precisão nestes vidros e colocadas na estufa à vácuo à 60°C. Decorrido 3 horas, as amostras eram retiradas da estufa e colocadas num dissecador onde resfriavam até a temperatura ambiente. Os vidros eram pesados e colocados novamente na

estufa à vácuo por mais 3 horas. Se o peso não estivesse constante, o procedimento de secagem, resfriamento e pesagem era repetido; caso não houvesse variação do peso, a umidade era determinada (AOAC 43.287, 1984).

3.3.3.3. Extração do óleo da torta

Com o objetivo de caracterizar a torta, de testar a consistência da metodologia de amostragem, e de comprovar a eficiência do Celite®545, extraíu-se o óleo que ficou retido na torta utilizando o método de Bligh & Dyer (1959).

- a) Pesou-se com precisão 0,5000g de torta seca (ver Seção 3.2.3.2) num tubo de ensaio de 50ml com tampa rosqueável.
- b) Adicionou-se 0,4ml de água destilada, 10ml de metanol e 10ml de clorofórmio e agitou-se por 2 minutos no agitador de tubos de ensaio.
- c) Adicionou-se 5ml de água destilada e agitou-se por mais 30 segundos.
- d) O conteúdo do tubo de ensaio foi filtrado em papel de filtro.
- e) O filtrado foi transferido para uma proveta graduada, onde houve a separação das fases.
- f) O volume da camada de clorofórmio foi anotado, e retirou-se com uma pipeta toda camada de metanol e água, tendo sido arrastado um pouco da camada de clorofórmio para garantir a completa remoção da água.
- g) Uma alíquota de 3ml da camada de clorofórmio foi transferida para um tubo de ensaio previamente tarado.
- h) Todo clorofórmio foi evaporado utilizando nitrogênio e aquecimento, e o resíduo (gordura) no tubo de ensaio pesado até peso constante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste capítulo é apresentar e discutir os resultados obtidos na etapa de otimização do processo de remoção de colesterol do óleo de manteiga, assim como as curvas de partição do colesterol entre as fases oleosa, aquosa e torta de terra diatomácea, obtidas através de ensaios de equilíbrio e outros parâmetros que ajudarão na caracterização do processo.

4.1. ANÁLISE GERAL DO PROCESSO

Os ensaios de remoção de colesterol do óleo de manteiga utilizando solução aquosa de quilaia e terra diatomácea, foram realizados conforme os procedimentos descritos na Seção 3.3.1. Após o contato líquido-líquido-sólido observou-se a formação de três fases bem definidas: emulsão, solução aquosa e torta (fase sólida). O volume de emulsão formado foi da ordem de 1/3 do volume total, podendo ser diminuído com uma redução na agitação, mas não completamente eliminado.

O processo mostrou-se bastante eficiente para obter óleo de manteiga com reduzida concentração de colesterol. O óleo de manteiga processado não apresentou alteração visível em suas propriedades físicas, tais como cor, densidade, viscosidade e ponto de fusão, sendo uma evidência de que o processo não muda a estrutura química do mesmo.

O gosto amargo residual no óleo de manteiga processado, provavelmente devido às saponinas de quilaia que permaneceram incorporadas ao mesmo, pode ser eliminado através de extrações sucessivas com água.

Determinações de umidade foram realizadas em cinco amostras da fase óleo oriundas de ensaios representativos, separadas da emulsão após tratamento com ultra-som. O maior valor de umidade obtido foi de 0,20%. Este valor é muito

baixo, sobretudo considerando ser provável uma contribuição, em sua determinação, de outros voláteis evaporados na estufa à vácuo. Como consequência, não se julgou necessário corrigir a base de cálculo, e os valores de concentração de colesterol no óleo foram referidos a massa total de óleo contendo esses traços de umidade.

A fase aquosa foi colocada no ultra-som e centrifugada, conseguindo-se a separação da emulsão arrastada. A concentração de colesterol foi reportada com base em massa de fase aquosa isenta de emulsão.

O conteúdo de colesterol determinado na torta foi calculado em base de massa de torta seca, evitando-se assim qualquer interferência da quantidade de água nos resultados.

O conteúdo de óleo em cinco amostras de torta foi determinado usando o método proposto por Bligh & Dyer (1959), encontrando-se um teor médio de 20%. A quantificação de colesterol realizada nestes óleos apresentou um valor aproximadamente 300% maior do que nas fases oleosas sobrenadantes, em equilíbrio. O alto valor é parcialmente justificado porque pelo método de Bligh & Dyer, o colesterol contido nas micelas de saponina da fase aquosa retida pela torta também é extraído pelo clorofórmio utilizado como solvente de óleo.

Uma simples adsorção da fase oleosa pela torta resultaria em teores iguais de colesterol nas amostras de fase oleosa livre e do óleo extraído da torta. Um balanço de massa entretanto, assumindo que a fase aquosa aderida tem a mesma concentração que a fase aquosa livre, indica uma adsorção seletiva do colesterol no Celite®545. A quantidade de colesterol no óleo extraído da torta é grande o suficiente para acreditarmos que a contribuição do colesterol presente na fase aquosa em contato com a torta não justifica o valor obtido.

Os valores de umidade da fase oleosa e torta, conteúdo de óleo encontrado nas tortas e concentrações de colesterol na torta, assim como no óleo extraído da mesma, são apresentados no Apêndice A.

4.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE REMOÇÃO DE COLESTEROL

4.1.1. Aplicação do Método de Análise por Superfície de Resposta: Modelagem Empírica, Refinamento do Modelo e Construção da Superfície de Resposta

Os resultados obtidos no Planejamento Experimental constituído por Planejamento Fatorial (Ensaio 1 a 16), Planejamento Composto Central (Ensaio 20 a 27) e replicatas no Ponto Central (Ensaio 17, 18, 19, 28 e 29), juntamente com as condições experimentais nas quais foram realizados, são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos nos ensaios realizados de acordo com o Planejamento Experimental.

Ensaio	CSQ(g/ml)	QTD(g/g)	T(°C)	pH	Col.(mg/g)
1	0,065	0,16	43,75	4	1,701
2	0,155	0,16	43,75	4	1,120
3	0,065	0,32	43,75	4	1,607
4	0,155	0,32	43,75	4	0,881
5	0,065	0,16	61,25	4	1,860
6	0,155	0,16	61,25	4	0,965
7	0,065	0,32	61,25	4	1,786
8	0,155	0,32	61,25	4	0,933
9	0,065	0,16	43,75	6	2,131
10	0,155	0,16	43,75	6	2,072
11	0,065	0,32	43,75	6	2,095
12	0,155	0,32	43,75	6	2,002
13	0,065	0,16	61,25	6	2,101
14	0,155	0,16	61,25	6	2,055
15	0,065	0,32	61,25	6	2,017
16	0,155	0,32	61,25	6	1,972
17	0,11	0,24	52,5	5	1,763
18	0,11	0,24	52,5	5	1,840
19	0,11	0,24	52,5	5	1,935
20	0,02	0,24	52,5	5	1,713
21	0,20	0,24	52,5	5	1,089
22	0,11	0,08	52,5	5	1,643
23	0,11	0,40	52,5	5	1,601
24	0,11	0,24	35,0	5	1,691
25	0,11	0,24	70,0	5	1,648
26	0,11	0,24	52,5	3	0,675
27	0,11	0,24	52,5	7	2,049
28	0,11	0,24	52,5	5	1,783
29	0,11	0,24	52,5	5	1,983

CSQ = concentração da solução de quilaia; QTD = quantidade de terra diatomácea; Col. = concentração de colesterol na fase oleosa resultante e T = temperatura

Os valores da concentração de colesterol (Col.) foram calculados de acordo com o procedimento descrito no Apêndice B.

Uma observação preliminar dos resultados apresentados na Tabela 4.1, indica que a situação que mais favoreceu a redução do teor de colesterol foi a correspondente ao ensaio 26, caracterizado pelo menor valor estudado de pH.

a) Modelagem Empírica

O processo de otimização se inicia com uma regressão múltipla usando um modelo linear, obtendo-se resultados que sofrerão ajustes e refinamentos.

As condições experimentais na forma de variáveis codificadas e os resultados para a concentração de colesterol referentes aos Ensaios 1 a 19 (planejamento fatorial) foram introduzidas no programa Modreg (Bruns et al., 1995). Obteve-se o modelo de 1ª ordem para a concentração de colesterol descrito pela Equação [4.1], acompanhado pelo erro experimental associado a cada parâmetro (entre parênteses).

$$Y^* = 1,7282 - 0,2061X_1 - 0,0445X_2 + 0,0050X_3 + 0,3495X_4 \quad [4.1]$$

$$(\pm 0,0526) \quad (\pm 0,0625) \quad (\pm 0,0625) \quad (\pm 0,0625) \quad (\pm 0,0625)$$

O gráfico dos resíduos contra as respostas previstas está apresentado na Figura 4.1.

A listagem contendo os valores dos coeficientes do modelo, os resíduos e a matriz para o cálculo do erro experimental está no Apêndice C.

A análise do gráfico dos resíduos indica falta de ajuste do modelo, pois, ao invés de se distribuírem de forma aleatória, os resíduos sugerem nitidamente um padrão geométrico, no qual a região central do gráfico concentra os resíduos

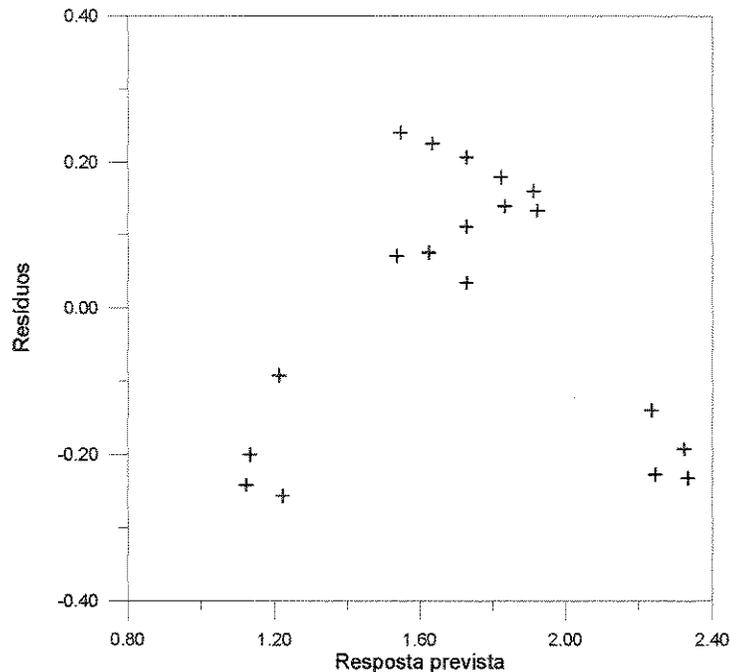


Figura 4.1 - Resíduos deixados pelo ajuste de um modelo linear aos valores da Tabela 4.1.

positivos, ao passo que os resíduos negativos localizam-se nas extremidades. Conclui-se portanto que o modelo não representa satisfatoriamente os resultados experimentais.

Devido à falta de ajuste apresentada pelo modelo de 1^a ordem, optou-se por testar um modelo de ordem superior.

Para que um modelo de 2^a ordem pudesse ser ajustado através de uma regressão não-linear, o Planejamento Fatorial foi complementado com os ensaios correspondentes ao Planejamento Composto Central (Ensaio 20 a 27) e com mais uma duplicata no ponto central (Ensaio 28 e 29). As condições experimentais na forma de variáveis codificadas e os resultados da concentração de colesterol referentes a todos os experimentos (Ensaio 1 a 29) foram introduzidos no programa Modreg, resultando no modelo de 2^a ordem para a

concentração de colesterol. O modelo, assim como o erro experimental associado a cada parâmetro no nível de 95% de confiança, está descrito na Equação [4.2]

$$\begin{aligned}
 Y^* = & 1,8608 - 0,1894X_1 - \underline{0,0332}X_2 - \underline{0,0002}X_3 + 0,3475X_4 - 0,0829X_1^2 - \\
 & (\pm 0,136) \quad (\pm 0,062) \quad (\pm 0,062) \quad (\pm 0,062) \quad (\pm 0,062) \quad (\pm 0,060) \\
 & \underline{0,0276}X_2^2 - \underline{0,0157}X_3^2 - 0,0926X_4^2 - \underline{0,0085}X_1X_2 - \underline{0,0237}X_1X_3 + \\
 & (\pm 0,060) \quad (\pm 0,060) \quad (\pm 0,060) \quad (\pm 0,076) \quad (\pm 0,076) \\
 & 0,1757X_1X_4 + \underline{0,0104}X_2X_3 + \underline{0,0104}X_2X_4 - \underline{0,0244}X_3X_4 \quad [4.2] \\
 & (\pm 0,076) \quad (\pm 0,076) \quad (\pm 0,076) \quad (\pm 0,076)
 \end{aligned}$$

Através da Análise da Variância (ANOVA) obteve-se parâmetros estatísticos para a avaliação do ajuste que estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Parâmetros de análise de variância no ajuste de um modelo quadrático aos dados da Tabela 4.1.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	4,6446	14	0,3318	
Resíduos	0,2809	14	0,0201	16,5325
Falta de ajuste	0,2444	10	0,0244	
Erro puro	0,0365	4	0,0091	2,6797
Total	4,9255	28		

% de variância explicada= 94,2963

% máxima de variância explicável= 99,2592

Analisando os valores obtidos para os critérios estatísticos de ajuste do modelo de 2ª ordem proposto, verifica-se que a Equação [4.2] se ajusta muito bem aos valores experimentais da concentração de colesterol, e pode ser considerada bastante significativa e satisfatória, pois:

- a) Os valores dos resíduos deixado pelo modelo são da mesma ordem de grandeza, quando comparados com o erro experimental.
- b) A porcentagem de variância explicada é muito satisfatória (94,2963), o que significa dizer que 94,3% da variação total em torno da média é devida à regressão, ficando apenas 4,96% com os resíduos.
- c) No nível de 95% de confiança, o valor de $F(14,14)_{\text{estimado}}$ para a regressão é 16,5325, aproximadamente 7 vezes maior do que $F(14,14)_{\text{tabelado}}$ (2,483) o que mostra que o modelo é altamente significativo e muito útil para fins preditivos, dentro da região estudada.
- d) No nível de 95% de confiança o valor de $F(10,4)_{\text{estimado}}$ é 2,6797, valor bem menor do que o tabelado (5,96), mostrando que o modelo não apresenta evidência de falta de ajuste. A análise do gráfico dos resíduos apresentado na Figura 4.2, nos mostra que estes se distribuem aleatoriamente em torno do valor zero, confirmando o resultado do Teste F que indica não haver falta de ajuste.

A comparação entre os dois modelos mostra claramente que o de 2ª ordem deve ser o escolhido por ser mais apropriado para representar os valores obtidos para a concentração de colesterol, pois ele inclui termos quadráticos significativos que não aparecem no modelo de 1ª ordem, justificando assim, o comportamento sistemático dos resíduos. Além disso, a regressão do modelo de 2ª ordem explica uma porcentagem bem maior da variação dos valores observados em torno da média do que o modelo de 1ª ordem.

Como o modelo de 2ª ordem mostrou-se muito satisfatório para representar a variação de colesterol em função das variáveis estudadas, não houve necessidade de tentar um modelo de ordem superior.

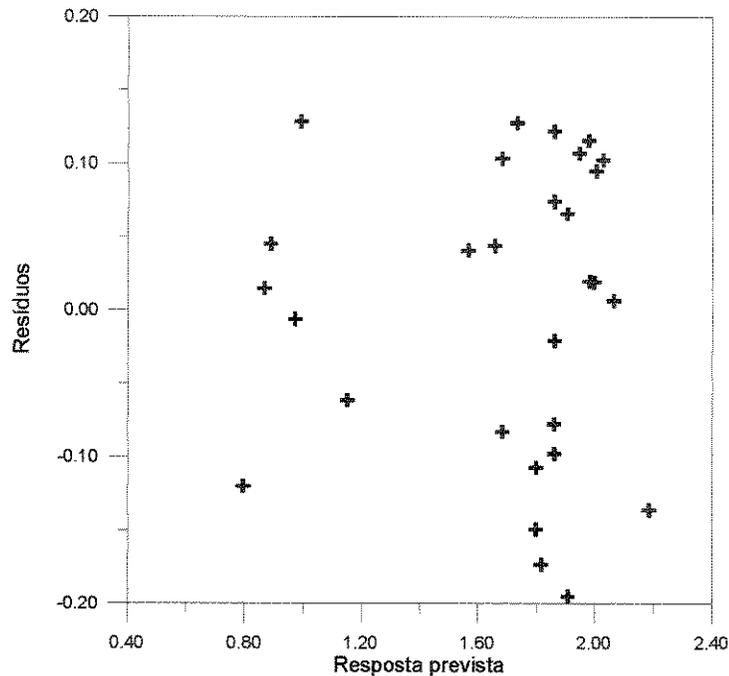


Figura 4.2 - Resíduos deixados pelo ajuste de um modelo quadrático aos dados da Tabela 4.1.

b) Refinamento do Modelo

Para tornar possível a representação da Equação [4.2] na forma de superfície de resposta ou de linhas de contorno, é recomendável o refinamento da expressão, de modo que apenas os parâmetros mais importantes permaneçam.

Um critério para eliminar os parâmetros menos significativos consiste na comparação do valor do coeficiente de um determinado parâmetro com o valor do erro padrão associado ao mesmo. Se o valor deste erro for maior ou aproximadamente igual ao valor do coeficiente do parâmetro, então este parâmetro não é significativo e pode ser desprezado.

A adoção deste critério permitiu a eliminação de 9 termos da Equação [4.2] (os termos sublinhados) e o modelo para a concentração de colesterol torna-se representado pela Equação [4.3], no nível de 95% de confiança.

$$Y^* = 1,8608 - 0,1894X_1 + 0,3475X_4 - 0,0829X_1^2 - 0,0926X_4^2 + 0,1757X_1X_4 \quad [4.3]$$

$(\pm 0,136)$ $(\pm 0,062)$ $(\pm 0,062)$ $(\pm 0,060)$ $(\pm 0,060)$ $(\pm 0,076)$

Fazendo as substituições das variáveis codificadas na Equação [4.3], obtém-se o modelo que representa a variação da concentração de colesterol como função da CSQ e pH, únicas variáveis que mostraram influenciar o processo de remoção de colesterol.

$$\text{Conc.colesterol} = - 0,077 - 14,723 \text{ CSQ} + 0,845 \text{ pH} - 40,939 \text{ CSQ}^2 - 0,0926 \text{ pH}^2 + 3,904 \text{ CSQ pH} \quad [4.4]$$

Introduzindo os valores utilizados em todos os ensaios nas variáveis CSQ e pH da Equação [4.4] podemos verificar se o ajuste do modelo foi satisfatório, comparando-o aos resultados experimentais. A Tabela 4.3 apresenta os desvios.

A análise dos erros apresentados na Tabela 4.3 nos mostra que para a maior parte dos ensaios os erros não ultrapassam 10 % , o que significa que o modelo representa bem os valores experimentais.

Utilizando os resultados dos ensaios repetidos (ensaios 17, 18, 19, 28 e 29) para calcular o erro experimental através da equação

$$\text{Erro experimental} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

obtemos que o erro decorrente de variações experimentais é 0,0954 ou 9,54%, o que nos mostra que as diferenças encontradas entre os valores experimentais e os resultados obtidos através da modelagem são , na maior parte , devido à erros experimentais e , portanto , o modelo não apresenta falta de ajuste.

Tabela 4.3 - Comparação dos resultados experimentais com a modelagem.

Ensaio	Col _{exp.}	Col _{mod.}	Erro(%)*
1	1,701	1,706	0,29
2	1,120	0,976	12,86
3	1,607	1,706	6,16
4	0,881	0,976	10,78
5	1,860	1,706	8,28
6	0,965	0,976	1,14
7	1,786	1,706	4,48
8	0,933	0,976	4,61
9	2,131	2,052	3,71
10	2,072	2,024	2,32
11	2,095	2,052	2,05
12	2,002	2,024	1,10
13	2,101	2,052	2,33
14	2,055	2,024	1,51
15	2,017	2,052	1,74
16	1,972	2,024	2,64
17	1,763	1,865	5,79
18	1,840	1,865	1,36
19	1,935	1,865	3,62
20	1,713	1,913	11,68
21	1,089	1,155	6,06
22	1,643	1,865	13,51
23	1,601	1,865	16,49
24	1,691	1,865	10,29
25	1,648	1,865	13,17
26	0,675	0,798	18,22
27	2,049	2,192	6,98
28	1,783	1,865	4,60
29	1,983	1,865	5,95

$$* \text{ Erro (\%)} = \left| \frac{\text{Col}_{\text{mod.}} - \text{Col}_{\text{exp.}}}{\text{Col}_{\text{exp.}}} \right|$$

É importante observar que a quantidade de terra diatomácea (QTD) e a temperatura (T), mostraram não serem significativas no processo de remoção de colesterol do óleo de manteiga, sendo seus parâmetros lineares, quadráticos ou de interação excluídos do modelo. Isto quer dizer que qualquer variação nos valores

destas duas variáveis não influenciou significativamente o conteúdo de colesterol no óleo de manteiga processado.

A concentração da solução aquosa de quilaia (CSQ) mostrou exercer grande influência na remoção de colesterol do óleo de manteiga, pois os coeficientes de seus termos linear, quadrático e de interação com o pH, são significativos. A análise estatística e a observação dos resultados apresentados na Tabela 4.1 indicam que um aumento na CSQ provoca um aumento na remoção de colesterol, concordando com o resultado obtido por Sundfeld et al.(1993).

As saponinas de quilaia são conhecidas por serem agentes de superfície ativa, por formarem micelas e por apresentarem interação seletiva com o colesterol. O mecanismo proposto por Sundfeld et al. (1993) para a remoção de colesterol do óleo de manteiga utilizando saponinas de quilaia assume que em solução aquosa elas formam micelas e o colesterol é solubilizado por elas.

Durante o contato líquido-líquido (Reação), as saponinas podem distribuir-se entre a fase aquosa, a fase oleosa e estarem presentes na interface água-óleo. Na fase aquosa elas podem apresentar-se como monômeros ou como monômeros e micelas, dependendo da sua concentração. Na interface sua presença diminui a tensão superficial e promove a emulsificação dos lipídeos em água e da água no óleo. As saponinas deveriam preferencialmente ficar na fase aquosa, mas devido à sua natureza anfífilica, elas podem estar na fase oleosa emulsificando a água no óleo.

O colesterol, por sua vez, deve se distribuir entre a fase oleosa e a solução micelar, atingindo um equilíbrio. Desta forma, uma fase oleosa com teor reduzido de colesterol pode ser obtida, como constatado experimentalmente. Como é sabido que a capacidade de solubilização de uma solução micelar aumenta com a concentração de surfactante, era de se esperar que uma maior remoção de colesterol do óleo de manteiga fosse obtido com maiores concentrações de saponinas, conforme mostram os resultados experimentais.

A quantidade de terra diatomácea (QTD) adicionada ao sistema líquido-líquido mostrou não influenciar significativamente o processo de remoção de

colesterol, pois incrementos muito pequenos de remoção foram obtidos com o aumento da quantidade de Celite®545 (adsorvente). O objetivo de se adicionar Celite®545 ao meio de reação é o de promover uma partição adicional de colesterol da fase oleosa para o adsorvente. Este processo pode ser explicado através do fenômeno de adsolubilização (Harwell & O'Rear, 1989), onde monômeros de surfactantes presentes na interface água-óleo e na fase aquosa são adsorvidos na fase sólida formando estruturas admicelares que solubilizam uma quantidade adicional de colesterol. Assim o colesterol pode tanto ser solubilizado na fase aquosa micelar quanto na fase sólida admicelar. Sundfeld et al. (1993) observaram que a quantidade de Celite®545 adicionada ao meio de reação influenciava o processo de remoção de colesterol, pois aumentando a QTD havia um aumento significativo na remoção de colesterol, resultado diferente do encontrado por este trabalho. Uma possível justificativa surge ao se comparar as quantidades relativas de terra diatomácea e quilaia usadas nos dois estudos. Sundfeld et al. (1993) avaliaram a influência da variável QTD em dois níveis que se encontram dentro da faixa estudada neste trabalho, mas utilizaram uma concentração de quilaia equivalente ao dobro da máxima aqui considerada. É possível que na situação em que pequena quantidade de adsorvente foi usada (nível inferior de Sundfeld et al., 1993), tenha ocorrido uma saturação da superfície ativa do Celite®545 e o excesso de monômeros de saponina permaneceu inativo em solução. Quando se aumentou a quantidade de Celite®545 (nível superior de Sundfeld et al., 1993) favoreceu-se a adsorção complementar de saponinas na terra diatomácea, promovendo um incremento na remoção de colesterol.

Os resultados dos ensaios de equilíbrio (ver Seção 4.3) indicam que no presente trabalho, a maior CSQ não foi suficiente para saturar nem mesmo a menor QTD. Desta maneira, aumentos na QTD não redundaram em maior remoção de colesterol.

Uma confirmação desse possível mecanismo de saturação como regulador da capacidade de remoção de colesterol por adsorção só poderá ser obtida com um estudo mais específico do fenômeno de adsorção, de preferência com soluções de saponinas puras. Os extratos de quilaia usados por Sundfeld et al. (1993) e neste trabalho são de origem distinta e pode ter havido ainda o efeito competitivo de diferentes contaminantes.

O custo do adsorvente é bem inferior ao do extrato de quilaia, e além disso, ele pode ser reativado por lavagens e tratamento térmico. Desta maneira uma otimização controlada pela quantidade de quilaia (excesso de terra diatomácea), como neste trabalho, tem maior interesse industrial.

A temperatura em que ocorreu o processo de remoção de colesterol foi a variável menos significativa em estudo, mostrando não influenciar o processo e nem mesmo uma possível tendência de como seria sua influência. Sundfeld et al. (1993) obtiveram um efeito significativo da temperatura, mostrando a tendência de que um aumento na temperatura diminuía a remoção de colesterol. A temperatura pode influenciar o grau de emulsificação, e como neste trabalho, ao contrário do de Sundfeld et al. (1993), houve grande preocupação em amostrar uma fase lipídica pura, é possível atribuir as diferentes tendências encontradas aos distintos métodos utilizados.

O pH da solução aquosa de quilaia mostrou ser a variável que mais influência o processo de remoção de colesterol, pois seus efeitos linear, quadrático e de interação com a concentração da solução de quilaia mostraram-se altamente significativos. A tendência observada é de que quanto mais baixo o valor do pH maior é a remoção de colesterol, resultado que coincide com o obtido por Sundfeld et al. (1993). É possível perceber diretamente esta influência observando a Tabela 4.1. Nota-se que os valores mais baixos de concentração de colesterol foram obtidos para os menores valores de pH.

Uma possível explicação para este comportamento pode ser dada se considerarmos a estrutura química das saponinas de quilaia e o efeito da densidade de carga na formação de micelas. Todas as espécies químicas

identificadas nos extratos de quilaia possuem o mesmo grupo iônico: uma molécula de ácido glucurônico. O caráter altamente aniônico da saponina faz com que seja mais difícil a formação das micelas devido a alta densidade de carga. Assim, uma diminuição do pH da solução diminui a densidade de carga negativa, diminuindo a repulsão eletrostática entre os monômeros da saponina, favorecendo a formação de micelas. Isto implica numa capacidade maior de solubilização da solução micelar, refletindo em níveis mais altos de remoção de colesterol. Sundfeld (1997) observou concentrações críticas de micela (CCM) menores em soluções com pHs mais baixos. Um outro efeito da diminuição da repulsão eletrostática seria observado no favorecimento da adsorção da micela no Celite®545, pois por ser basicamente formado por sílica, o Celite®545 é também muito eletronegativo.

c) Definição das condições ótimas para redução do teor de colesterol do óleo de manteiga.

Uma técnica bastante usada para se otimizar um processo, determinando seu ponto ótimo, consiste em analisar a superfície descrita pelo modelo que o representa. O programa “Statistica for Windows” foi utilizado para desenhar a superfície que representa o modelo obtido para o comportamento da concentração de colesterol quando são variados a concentração da solução de quilaia e o pH.

A superfície de resposta e as curvas de nível para o modelo proposto pela Equação [4.4] estão apresentadas nas Figuras 4.3 e 4.4, respectivamente.

Através da Figura 4.3 pode-se perceber nitidamente que a condição que mais favorece a remoção de colesterol do óleo de manteiga é a que apresenta CSQ alta e pH baixo. É importante ressaltar que o modelo proposto é um modelo local, válido apenas na região que foi investigada. Qualquer extrapolação pode conduzir a erros. É o que se verifica, por exemplo, quando avaliamos o ponto de máximo da superfície, que indica que menores remoções de colesterol seriam

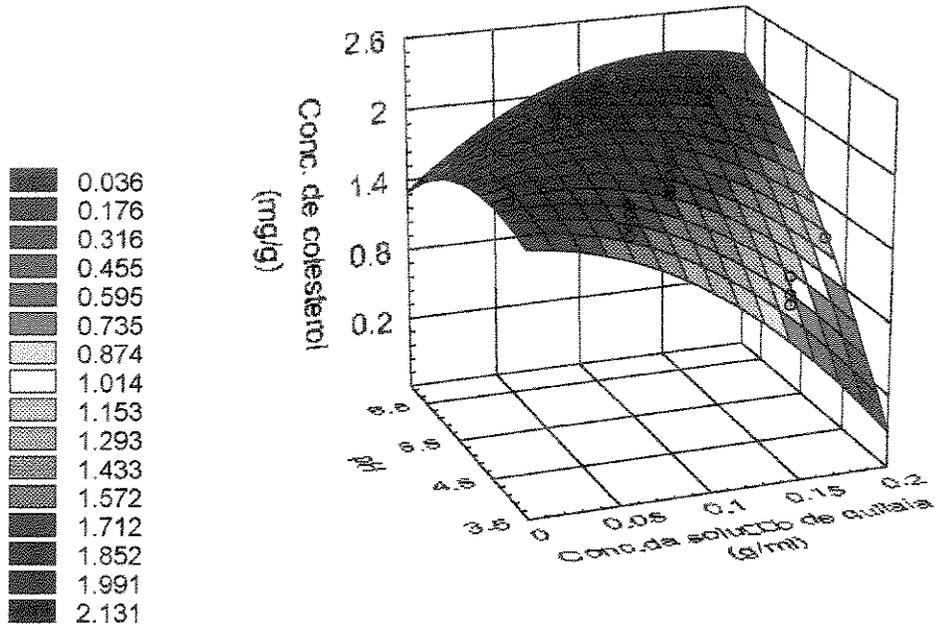


Figura 4.3 - Superfície de Resposta descrita pela Equação [4.3]

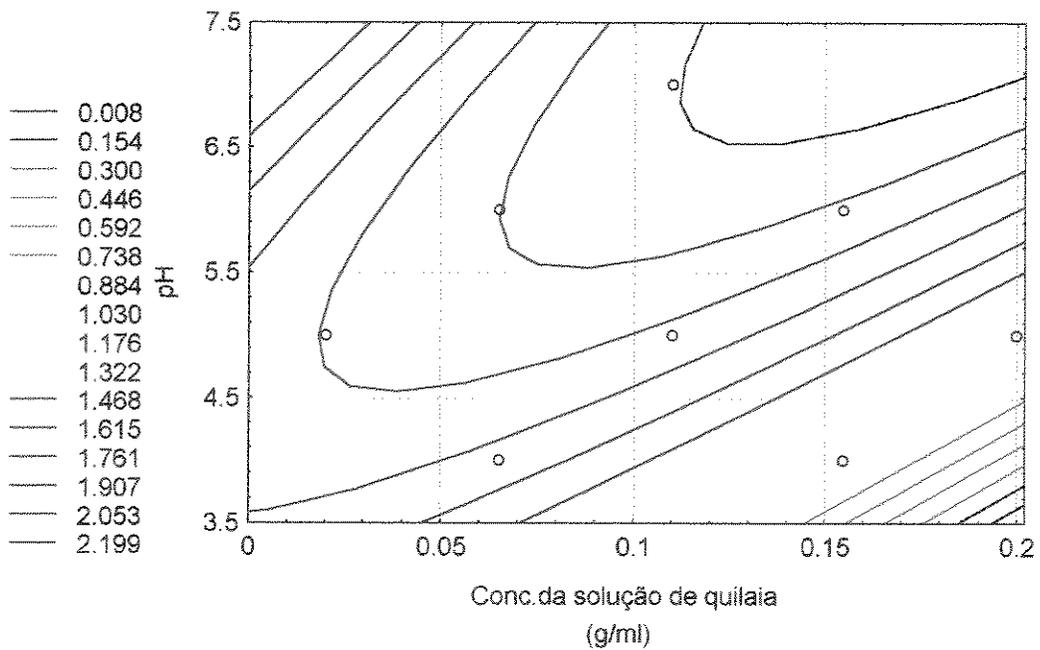


Figura 4.4 - Curvas de nível descrita pela Equação [4.3]

obtidas com valores de pH e CSQ altos, uma incoerência com os fundamentos teóricos. O pH alto pode ser justificável, mas a CSQ não apresenta a tendência sugerida por aquela região.

Seguindo a tendência apresentada pela Superfície de Resposta, deve-se estabelecer limites operacionais para os valores das variáveis, que ponderem os custos das operações necessárias para remover todo o ácido do óleo final. Sabe-se que para abaixar o valor do pH da solução aquosa de quilaia, que é aproximadamente 5, para 2, uma quantidade significativa de ácido teria que ser adicionada, dificultando uma etapa posterior à nível industrial, de purificação. Baixos pHs podem também promover a hidrólise dos lipídeos. É necessário que um novo processo de otimização, que leve em consideração esses dois fatores técnico-econômicos seja realizado. Dentro dos limites propostos e executados no presente trabalho, sugere-se o pH 3 como um valor ótimo e seguro para o processo.

Escolhido o pH 3 como um limite de trabalho, procurou-se definir uma CSQ viável e satisfatória a nível operacional. Para isso programaram-se cinco ensaios de extração com CSQ variando de 0,05 a 0,25 g/ml, pH fixo em 3, QTD igual a 0,24 g/g de óleo, T igual a 35°C e relação massa solução de quilaia / massa óleo igual a 50/30, como em todos os ensaios anteriores. A variação da concentração de colesterol em função da CSQ, é apresentada na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Valores da concentração de colesterol a pH 3, QTD 0,24 g/g óleo e T 35° C, variando-se a CSQ.

CSQ (g/ml)	Conc. Colesterol (mg/g)
0,05	1,108
0,10	0,563
0,15	0,439
0,20	0,354
0,25	0,291

O gráfico mostrando a porcentagem de redução de colesterol obtida está na Figura 4.5.

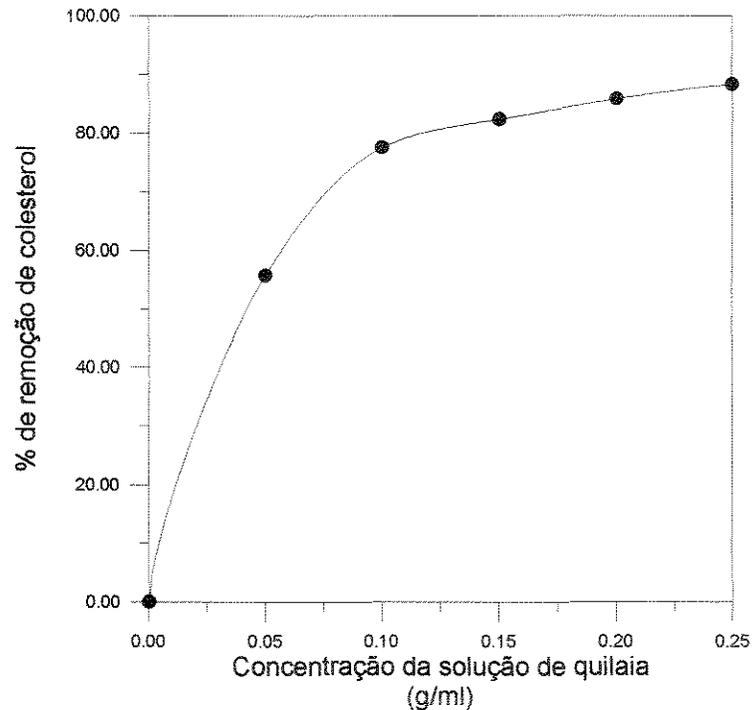


Figura 4.5- Variação da concentração de colesterol em função da CSQ

Através da Figura 4.5, pode-se perceber que a relação custo/benefício ao se trabalhar com concentrações da solução de quilaia acima de 0,10 g/ml, é pouco beneficiada em termos de remoção de colesterol, a um pH 3. Por isso pode-se definir um ponto ótimo operacional nas condições de concentração da solução de quilaia (CSQ) em torno de 0,10g/ml e pH = 3. Como as variáveis quantidade de terra diatomácea (QTD) e temperatura não influenciam o processo, seus valores podem ser mantidos baixos, diminuindo o custo operacional. Sugere-se trabalhar com QTD igual a 0,08g/g de óleo, numa temperatura um pouco acima da de fusão do óleo de manteiga (aproximadamente 40°C).

A curva assintótica deixa antever ser possível remover todo o colesterol em um único estágio, se se utilizar altas concentrações de quilaia, mas o mais adequado é a utilização de contatos em sequência. Três contatos nas condições otimizadas sugeridas acima reduziriam o colesterol para aproximadamente 0,8% do original.

4.3. ESTUDO DO EQUILÍBRIO TRIFÁSICO

A etapa de otimização apontou as condições de operação mais indicadas no processo de remoção de colesterol usando saponinas. A melhor compreensão dos fenômenos envolvidos e a previsão do comportamento em variantes do processo só é possível, entretanto, com o conhecimento dos equilíbrios físico-químicos entre as fases.

O fato de se usar um extrato aquoso de quilaia que contém vários componentes interferentes, em vez da saponina pura, acrescido da impossibilidade até o momento, de quantificar o teor de saponina, e problemas associados à modelagem dos diferentes triglicerídeos contidos no óleo de manteiga (Metello, 1996), impedem um rigor termodinâmico no tratamento de dados de equilíbrio.

Fez-se um estudo da partição do colesterol entre as três fases formadas (óleo separado da emulsão, solução aquosa e torta) nas condições indicadas como mais favoráveis pela otimização. Manteve-se fixas a concentração da solução de quilaia ($CSQ=0,11$ g/ml), a quantidade de terra diatomácea ($QTD=0,24$ g/g de óleo), a temperatura ($T=35^{\circ}C$) e dois níveis de pH (3,0 e 4,0). Para cada um dos níveis de pH, preparou-se sete amostras de óleo de manteiga, com concentrações diferentes de colesterol.

As Tabelas 4.5 e 4.6 apresentam os valores das concentrações iniciais de colesterol no óleo de manteiga e da concentração de colesterol nas fases depois de atingido o equilíbrio com solução de quilaia de pH 3 e 4, respectivamente.

Tabela 4.5 - Concentrações experimentais de equilíbrio do colesterol a pH 3.

Parâmetros de Processo	Col ₀ (mg/g óleo)	Col _I (mg/g óleo)	Col _{II} (mg/g fase aquosa)	Col _{III} (mg/g torta seca)
CSQ=0,11g/ml	2,5	0,532	0,311	0,873
	4,0	0,987	0,632	1,292
QTD=0,24g/g óleo	6,0	1,483	1,015	2,191
	8,0	2,114	1,587	3,371
T=35°C	10,0	2,811	2,339	4,441
	12,0	3,427	2,926	4,895
	14,0	4,210	3,249	5,032

Col₀= concentração inicial de colesterol; Col_I = concentração de colesterol na fase oleosa; Col_{II} = concentração de colesterol na fase aquosa e Col_{III} = concentração de colesterol na torta

Tabela 4.6 - Concentrações experimentais de equilíbrio do colesterol a pH 4.

Parâmetros de Processo	Col ₀ (mg/g óleo)	Col _I (mg/g óleo)	Col _{II} (mg/g fase aquosa)	Col _{III} (mg/g torta seca)
CSQ=0,11g/ml	2,5	1,098	0,238	0,731
	4,0	1,545	0,443	1,061
QTD=0,24g/g óleo	6,0	2,036	0,750	1,890
	8,0	2,708	1,237	2,940
T=35°C	10,0	3,414	1,985	3,857
	12,0	4,055	2,756	4,475
	14,0	5,351	3,136	4,580

Col₀= concentração inicial de colesterol; Col_I = concentração de colesterol na fase oleosa; Col_{II} = concentração de colesterol na fase aquosa e Col_{III} = concentração de colesterol na torta

A concentração de colesterol foi artificialmente elevada pela adição deste componente puro, a fim de se poder atingir condições de saturação. Em uma situação prática de interesse tecnológico, apenas equilíbrios de concentração até cerca de 2 mg/g de óleo são aplicáveis.

Para melhor visualizar a partição, construiu-se curvas de equilíbrio do colesterol entre a fase óleo e a fase aquosa, entre a fase óleo e a torta e entre a fase aquosa e a torta. As curvas de equilíbrio são apresentadas nas Figuras 4.6 a 4.11.

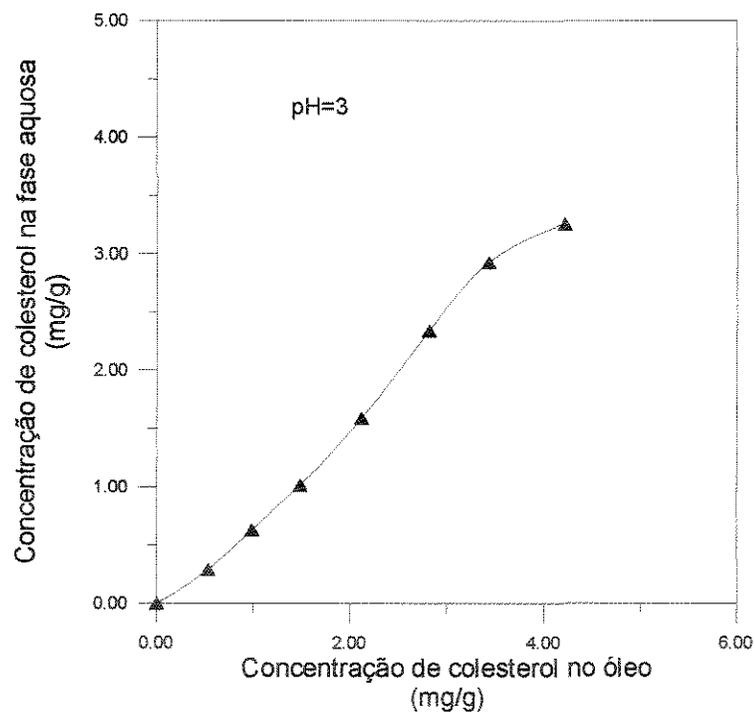


Figura 4.6 - Partição do colesterol entre o óleo e a fase aquosa.

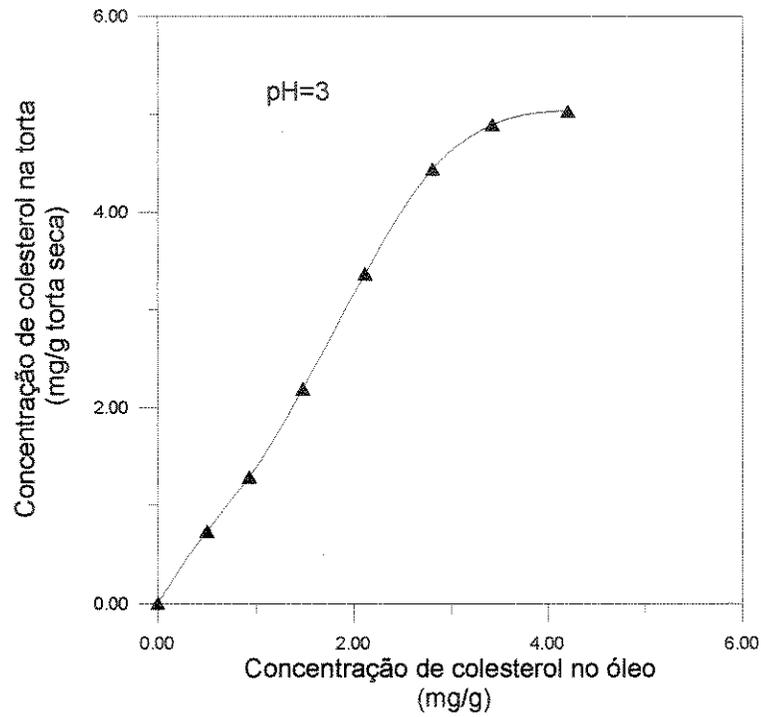


Figura 4.7 - Partição do colesterol entre o óleo e a torta.

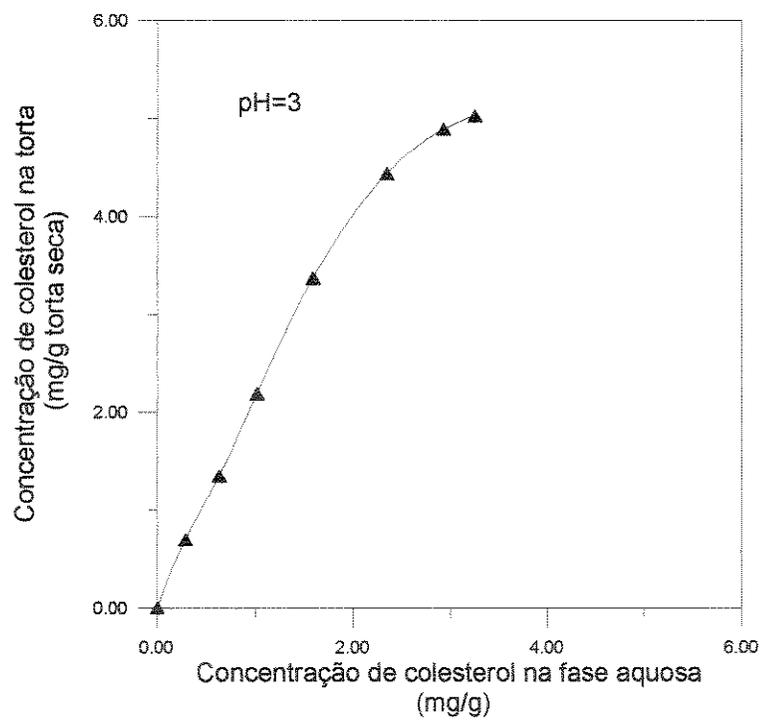


Figura 4.8 - Partição do colesterol entre a fase aquosa e a torta.

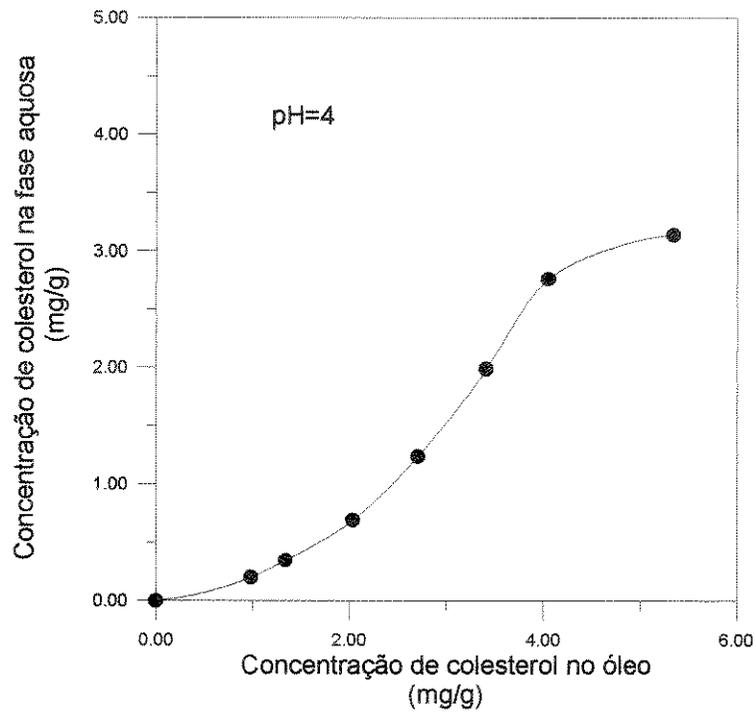


Figura 4.9 - Partição do colesterol entre o óleo e a fase aquosa.

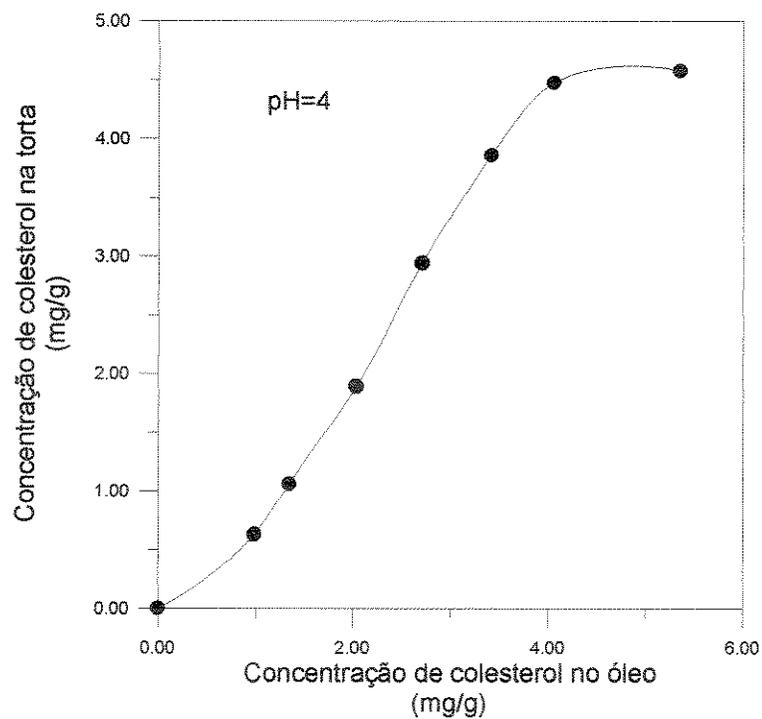


Figura 4.10 - Partição do colesterol entre o óleo e a torta.

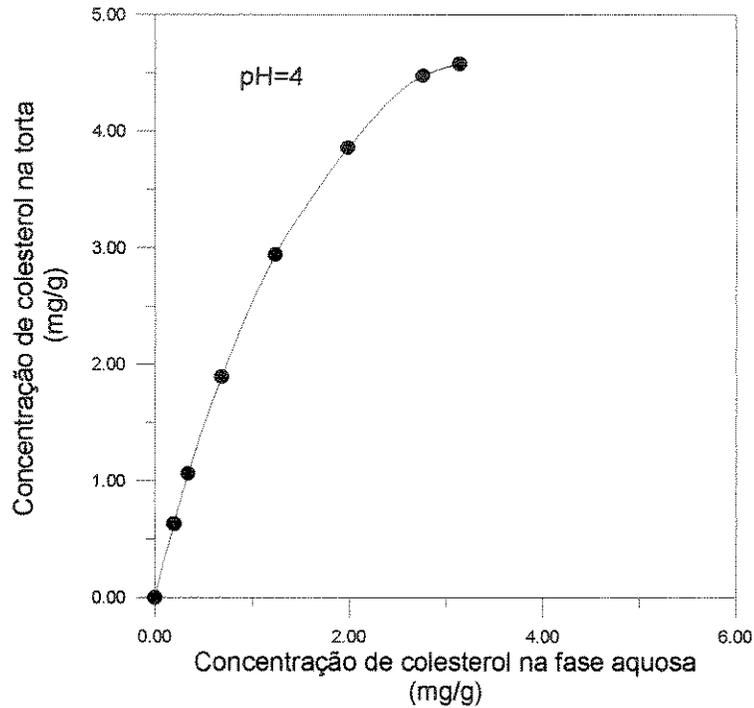


Figura 4.11 - Partição do colesterol entre a fase aquosa e a torta.

Observe-se que as três curvas em cada pH não são independentes, pois uma delas pode ser obtida pela razão entre as outras duas.

As Figuras 4.6 e 4.9 mostram a partição do colesterol entre a fase oleosa (óleo separado da emulsão) e a fase aquosa (solução de quilaia). As curvas obtidas têm um formato sigmóide, apresentando uma região de saturação da fase aquosa.

Utilizando os valores de concentração próximos a saturação e a concentração de sapogenina fornecida pelo fabricante, assim como os pesos moleculares da sapogenina e do colesterol, calculou-se que para solubilizar 1 molécula de colesterol são necessárias 3,63 moléculas de saponina no pH 3 e 3,76 no pH 4. Esse resultado é surpreendente e mostra a eficiência do uso de quilaia.

As Figuras 4.7 e 4.10 apresentam a partição do colesterol entre a fase oleosa e a torta. As curvas obtidas têm o mesmo formato de uma típica isoterma de adsorção de surfactantes, talvez devido a semelhança do mecanismo. É bem evidente a saturação da torta pelo colesterol em ambos os pHs. Aparentemente esta saturação está em contradição com o resultado da otimização que mostrou que a quantidade de Celite®545 não influencia a remoção de colesterol. Nos presentes ensaios, entretanto, a concentração de colesterol é muito mais alta do que nos de otimização, e, segundo proposto na Seção 4.1.1b, é preciso considerar que na realidade as saponinas de quilaia adsorvidas no Celite®545 foram saturadas, pois esta adsolubilização é que efetivamente deve remover o colesterol.

Sem dúvida o resultado mais surpreendente destas curvas de equilíbrio é o alto poder de solubilização da solução aquosa de saponina, sobretudo se for levado em conta que o colesterol é praticamente insolúvel em fase aquosa pura. A linearização da curva de equilíbrio entre o óleo e a água a pH 3 para teores baixos de colesterol indica que a concentração na fase aquosa é a metade da existente no óleo. As Figuras 4.8 e 4.11 indicam que a partição entre a torta e a solução de quilaia é praticamente independente do pH, e da ordem $2 \text{ (mg col./g torta) / (mg col./g solução aquosa)}$.

Uma avaliação comparativa entre os resultados correspondentes obtidos nos dois pHs indica um comportamento semelhante, embora o formato sigmoidal das curvas seja mais pronunciado a pH 4. Os valores de equilíbrio achados também justificam a melhor eficiência de extração a pHs mais baixos. A Tabela 4.7 apresenta as razões entre as concentrações de colesterol na solução de quilaia e na torta obtidas nos dois pHs, para concentrações na fase óleo de 1,0 mg/g e na condição de saturação. Os números obtidos dão uma clara vantagem para o pH 3.

Tabela 4.7 - Razão de concentração de colesterol na solução de quilaia e na torta entre pH 3 e pH 4.

Concentração de colesterol no óleo (mg/g)	Solução de quilaia (Col _{II}) _{pH3} / (Col _{II}) _{pH4}	Torta (Col _{III}) _{pH3} / (Col _{III}) _{pH4}
1,0	2,66	1,767
> 4,0 (saturação)	1,036	1,099

O estudo da partição do colesterol permitiu também determinar a significativa participação da emulsão no processo. Através de um balanço de massa do colesterol, considerando a concentração determinada experimentalmente nas três fases, verificou-se que se teria uma recuperação média de apenas 80% do colesterol introduzido no sistema. A hipótese mais provável para explicar essa discrepância é uma intensificação da ação de solubilização micelar por parte da emulsão. Para confirmar repetiu-se o ensaio de equilíbrio com concentração inicial de colesterol 2,5 mg/g, pH 4, CSQ 0,11 g/ml, QTD 0,24 g/g óleo e temperatura 35°C, seguindo os procedimentos já descritos, exceto quanto ao tratamento final das fases formadas. A emulsão foi separada em dois frascos, sendo analisada diretamente em um deles e obtendo-se o conteúdo de colesterol por massa de emulsão. No frasco remanescente, apenas o óleo que se separou da emulsão após tratamento com ultra-som foi analisado. Os resultados indicaram que a emulsão é, em média, 26% mais rica em colesterol do que o óleo puro. Esse valor foi introduzido em um balanço de massa do colesterol, comparando seu valor no óleo inicial com os obtidos na fase aquosa, na torta e na emulsão, encontrando-se uma diferença de apenas 2%, um desvio aceitável considerando a margem de erro experimental, não apenas na determinação analítica do colesterol, como também na caracterização física da emulsão.

Os resultados dos cinco ensaios realizados para determinar a concentração de colesterol na emulsão e o balanço de massa para o colesterol estão apresentados no Apêndice D.

A emulsão, sendo uma fase de grande superfície específica, pode tender a concentrar as saponinas e com isso sequestrar com mais facilidade moléculas de colesterol. O fenômeno global portanto, pode ser muito mais complexo do que a simples solubilização em micelas postulada por Sundfeld (1992), e abre perspectivas para se conseguir uma remoção ainda mais eficiente de colesterol. Pesquisas neste sentido, entretanto, só serão efetivas após o domínio das técnicas quantitativas para a determinação de saponinas.

O estudo de otimização das condições de operação aqui apresentado foi baseado no teor de colesterol residual do óleo de manteiga puro e centrifugado, obtido após tratamento. Ele leva em consideração o efeito da emulsão formada, e portanto continua válido. Esse estudo não considerou formas de quebrar a emulsão, e com isso, aumentar a produtividade do processo.

As curvas de partição foram traçadas considerando a determinação experimental do colesterol em cada uma das fases puras e portanto representam uma situação real de equilíbrio. Conforme sugerido acima, é provável que a emulsão seja mais rica em saponinas, e portanto a concentração de quilaia efetiva nos equilíbrios deve ser menor do que 0,11 g/ml.

Curvas de equilíbrio sigmoidais são comuns em sistemas como os aqui estudados. O formato implica em uma participação do próprio colesterol na estabilidade das micelas, o que é muito provável pois ele tem atividade de superfície conhecidas (Adamson, 1960). O aumento da solubilização com a maior presença de colesterol, entretanto, pode ser o reflexo da formação de emulsão, que, conforme descrito acima, é, na prática, uma quarta fase mais rica em colesterol.

5. CONCLUSÕES

A presente pesquisa mostrou em todos os ensaios que em contato com uma solução aquosa de quilaia, o óleo de manteiga tem seu teor reduzido de colesterol.

O modelo de 2^a ordem encontrado para descrever a variação da concentração de colesterol em função das variáveis estudadas, é bastante representativo, não demonstrando necessidade de se tentar um modelo de ordem superior.

O nível de remoção de colesterol pelo processo não foi significativamente afetado pela quantidade de terra diatomácea (QTD) e temperatura (T). Por outro lado, as variáveis concentração da solução de quilaia (CSQ) e pH afetaram-no significativamente. Nas faixas estudadas, níveis crescentes de remoção de colesterol foram obtidos com a diminuição do pH e com o aumento da concentração da solução de quilaia.

As condições mais favoráveis de operação definidas por este trabalho foram baseadas em limites operacionais ponderando custos das matérias-primas, tais como saponinas e Celite® 545 e das operações necessárias para a lavagem do óleo final, devido à acidificação. Baixos valores de pHs também podem promover a hidrólise dos lipídeos.

Um novo processo de otimização, que leve em consideração esses dois fatores técnico-econômicos deverá ser realizado. Dentro dos limites propostos e executados no presente trabalho, sugere-se o pH 3 como um valor ótimo e seguro para o processo.

O estudo da partição do colesterol entre as fases formadas pelo processo apresentou como resultado mais surpreendente a significativa participação da emulsão no processo de extração de colesterol. A mesma é em média 26% mais rica em colesterol do que a fase oleosa em equilíbrio. Permitiu também calcular que para o pH 3, 3,63 moléculas de saponina são necessárias para solubilizar 1 molécula de colesterol, o que mostra a eficácia do uso de quilaia.

6. SUGESTÕES

Como consequência dos conhecimentos adquiridos neste trabalho, sugere-se:

- 1) Realizar um estudo do fenômeno de adsorção para confirmar mecanismos de adsolubilização (ou de estruturas admicelares) envolvidos no processo aqui estudado.
- 2) No processo de extração de colesterol do óleo de manteiga, substituir o Celite®545 que é um adsorvente aniônico (repulsão eletrostática com a quilaia) por um catiônico, o que provavelmente aumentará a adsorção da saponina no mesmo.
- 3) Desenvolver técnicas analíticas para quantificar as saponinas de quilaia.
- 4) Utilizar extratos de saponina de plantas cultivadas no Brasil, por exemplo, o juazeiro, como agente de extração de colesterol.
- 5) Avaliar técnicas para melhorar a qualidade do óleo de manteiga residual do processamento.
- 6) Desenvolver técnicas para recuperar o colesterol extraído do óleo de manteiga e a saponina utilizada no processo.
- 7) Realizar uma avaliação técnico-econômica do processo, visando uma produção industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, A.W; Physical Chemistry of Surfaces , 2^a ed., Interscience Publ., USA, 1960, 747p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 28092, 14^a ed. Arlington, 1984.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 43289, 14^a ed. ,1984.
- BARR, A. Consumer motivational forces affecting the sale of light dairy products. Food Technology. 44 (10): p.97, 1990.
- BARROS, B.N; SCARMINIO, I.S; BRUNS, R.E. Otimização e Planejamento de Experimentos: Uma Introdução à Quimiometria. 1995.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. Canadian J. of Biochem. and Physiology, V.37, n.8 , p. 911-917, 1959.
- BOHAC, C.E., RHEE, K.S. , CROSS, H.R. and ONO, K. Assessment of Methodologies for Colorimetric Cholesterol Assay of Meats. Journal of Food Science, V.53 (6), p. 1642-1644, 1988.
- BOX, G.E.P; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1978.

- BRADLEY, R. L. Removing cholesterol from milkfat using supercritical carbon dioxide. In: HABERSTROH, C e MORRIS, C. E. Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies. Woodlands: Gulf Publishing Company, 1991. Advances in Applied Biotechnology Series, v.12, p.221- 232.
- BRAGAGNOLO, N. Determinação dos teores de colesterol em carnes, ovos e massas com ovos. Universidade Estadual de Campinas, Tese de Mestrado, 1992, 105p.
- BRAY, G.A. A Health and Nutritional Perspective on Fat, Cholesterol and Risks to Health. In: : HABERSTROH, C e MORRIS, C. E. Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies. Woodlands: Gulf Publishing Company, 1991. Advances in Applied Biotechnology Series, v.12, p.13-19.
- BROWN, M.S.; KOVANEN, P.T.; GOLDSTEIN, J.L.; Regulation of Plasma Cholesterol by Lipoprotein Receptors. Science. v.12 . p.628-635, 1981.
- CHANDEL, R.S. e RASTOGI, R.P. Triterpenoid Saponins and Sapogenins Phytochemistry. v.19, p.1889-1908, 1980.
- DEHAL, S.S.; FREIER, T.A.; YOUNG, J.W.; HARTMAN, P.A.; BEITZ, D.C. A novel method to decrease the cholesterol content of foods. In:HABERSTROH, C e MORRIS, C. E. Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies. Woodlands: Gulf Publishing Company, 1991. Advances in Applied Biotechnology Series, v.12, p.203-220.

- DUNN, R.O. and SCAMEHORN, J.F. Use of Micellar-Enhanced Ultrafiltration to Remove Dissolved Organics from Aqueous Streams. Separation Science and Technology, 20 (4) , p. 257-284, 1985.
- ELWORTH, P.H.; FLORENCE, A.T.; MACFARLANE, C.B. Solubilization by surface - active agents and its applications in Chemistry and Biological Sciences. London: Chapman and Hall, 1968.
- EVERETT, D.H. Basic principles of colloid science. London: The Royal Society of Chemistry, 1989. 243p.
- FEELEY, R.M., CRINER, P.E., and WATT, B.K. Cholesterol Content of Foods. J. Amer. Diet Association. V.61, p.134, 1972.
- FENTON, M. and SIM, J.S. Determination of Egg Yolk Cholesterol Content by on Column Capillary Gas Chromatography. Journal of Chromatography, 540, p. 323-329, 1991.
- FLORENCE, A.T. Biological Implications of Micelle Formation. In : Mittal, K.L. Micellization, Solubilization, and Microemulsion, V.1, p.55, New York : Plenum Press, 1976.
- GEORGE, A.J. Legal status and toxicity of saponins. Food Cosmet. Toxicol., v.3, p.85-91, 1965.
- GESTETNER, B.; BIRK, Y.; BONDI, A.; TENCER, Y. Soya bean saponins-VII: A method for the determination of sapogenin and saponin contents in soya beans. Phytochemistry. v.5, p.803-806, 1966.

- HARPER, H.A. Manual de Química Fisiológica. Trad. J. Reinaldo Magalhães. 4 ed. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo S.A, 1977.
- HARWELL, J.H.; O'REAR, E.A. Adsorbed Surfactant Bilayers as Two Dimensional Solvents; Admicellar-Enhanced Chromatography. In: Scamehorn, J.F. ; Harwell, J.H. Surfactant - Based Separation Processes. New York : Marcel Dekker, Surfactant Science Series, V.33, p.155-171, 1989.
- HETTINGA, D.H. Why alter milk composition? J. Dairy Science. 72 (10): p.2790-2800, 1989.
- HUBBARD, W.D.; SHEPPARD, A.J.; NEWKERK, 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. J. Am. Oil Chem. Soc. v.54 , p.81, 1977.
- JENSEN, R.G.; FERRIS, A.M.; LAMMI-KEEFE, C.J.; HENDERSON, R.A. Lipids of bovine and human milks: a comparison. J. Dairy Science. 73 (2):p. 223-240, 1990.
- KABARA, J.J. Determination and Microscopic Localization of Cholesterol. Methods Biochem. Anal. V. 10, p. 263, 1961.
- KAIZUKA, H.; TAKAHASHI, K. High Performance Liquid Chromatography system for a wide range of naturally occurring glycosides. J. of Chrom. v.258, p-135-146, 1983.

- LACROIX, D.E.; MATTINGLY, W.A.; WONG, N.P.; ALFORD, J.A.
Cholesterol, fat and protein in dairy products. J. Am. Diet. Assoc. v.62,
p.275-279, 1973.
- MATTSON, F.H.; ERICKSON, B.A.; KLIGMAN, A.M. Effect of dietary
cholesterol on serum cholesterol in man. The American Journal of
Clinical Nutrition. v.25, p.589, 1972.
- Mc CARTHY, M.J.; KUKSIS, A.; BEVERIDGE, J.M.R. Composition of
molecular distillates of butter oil: isolation and identification of
components other than glycerides. J. Lipid Res. v.5, p.609-615, 1964.
- MEYER, L.H. Food Chemistry. Westport, Connecticut: The Avi Publishing
Company, Inc., 1975. 385p.
- MICICH, T.J. Behavior of polymer-supported digitonin with cholesterol in the
absence and presence of butteroil. J. Agric. Food Chem. 38 (9): p.1839-
1843, 1990.
- MITTAL, K.L.; MUKERJEE, P. The Wide World of Micelles. In: Mittal, K.M.
Micellization, Solubilization, and Microemulsions, V.1, p.1 New York,
1976.
- MORRIS, C.E. Dairy science removes cholesterol, replaces fat. In:
HABERSTROH, C. e MORRIS, C.E. Fat and Cholesterol Reduced
Foods: Technologies and Strategies. Woodlands: Gulf Publishing
Company, 1991. Advances in Applied Biotechnology Series. v.12,
p.201-202.

- MUCK, G.A. Overview of dairy products modifications. In:
HABERSTROH, C. e MORRIS, C.E. Fat and Cholesterol Reduced
Foods: Technologies and Strategies. Woodlands: Gulf Publishing
Company, 1991. Advances in Applied Biotechnology Series. v.12,
p.233-238.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.W. Food Chemistry. 2 ed. New
York: Marcel Dekker, 1985. p.139-244.
- NEVES, G.B.M. Remoção do Colesterol e Fracionamento do Óleo de Manteiga
com Dióxido de Carbono Supercrítico. Universidade Estadual de
Campinas. Tese de Mestrado, 1996. 145p.
- OAKENFULL, D.G. Saponins in Food - a review. Food Chemistry. n.6, p.19-
40, 1981.
- OAKENFULL, D.G. Agregation of saponins and bile acids in aqueous
solution. Aust. J. Chem. n.39, p.1671-1683, 1986.
- OAKENFULL, D.G.; SIDHU, G.S. Processing technology for cholesterol
extration. In: The 1991 Conference on Fat and Cholesterol Reduced
Foods: Technologies and Ingredients. Atlanta Proceedings. South
Natick: IBC USA Conferences Inc., 1991.
- PENTON, Z. Determination of Neutral Lipids by High Temperature GC. Part
I, Triglycerides and Cholesteryl Esters in Foods. GC Varian Application
Note, p. 22, 1990.

- PRICE, K.R.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R. The chemistry and biological significance of saponins in food and feedingstuffs. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 26 (1):135p., 1987.
- RAO, A.V. and KENDALL, C.W. Dietary Saponins and Serum Lipids. Food Chemistry Toxicology, V.24, p. 441, 1986.
- RUSSEL, C.E. and GRAY, I.K. The Cholesterol Content of Dairy Products. N.Z.J. Dairy Science Technology. V. 14, p.281, 1979.
- SCHWARTZ, D.P.; BREWINGTON, C.R.; BURGWALD, L.H. Rapid quantitative procedure for removing cholesterol from butterfat. J. Lipid Research. v.8, p.54-59, 1967.
- SHIMMA, E; TUNES, S; OLIVEIRA, W; FONSECA, D. Colesterol: o inimigo sob controle. Globo Ciência. Ed Globo, Ano 6, dezembro 1996, nº 65.
- SIDHU, G.S. e OAKENFULL, D.G. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. British Journal of Nutrition. v.55, p.643-649, 1986.
- SPERBER, R.M. New technologies for cholesterol reduction. Food Process. 50 (12): p.154-160, 1989.
- SUNDFELD, E. Separation of cholesterol from butteroil by treatment with quilaia saponin solution and diatomaceous earth. Universidade da Califórnia- Davis, C.A. ; Tese de Mestrado , 1992 . 151p.

_____. Separação de colesterol do óleo de manteiga utilizando extratos de quilaia saponaria molina. Universidade Estadual de Campinas. Exame de qualificação de área, 1994. 52p.

_____. Separação de colesterol do óleo de manteiga utilizando extratos de quilaia saponaria molina. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado (em andamento).

SUNDFELD, E. ; KROCHTA, J.M.; RICHARDSON, T. Separation of cholesterol from butteroil using quilaia saponins. II.Effects of temperature,agitation, and concentration of quilaia solution. J. Food Process Engineering, 16 (3): p.207-226, 1993b.

SUNDFELD, E.; YUN, S.; KROCHTA, J.M.; RICHARDSON, T. Separation of cholesterol from butteroil using quilaia saponins. I. Effects of pH, contact time, and adsorbent. J. Food Process Engineering, 16 (3): p.191-205, 1993a.

SUNDFELD, E.; KROCHTA, J.M.; KIECKBUSCH, T.G. Separação de colesterol da gordura láctea utilizando quilaia e terra diatomácea. I.Efeito de parâmetros de processo. 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química: O novo modelo da indústria química, tecnologias limpas, qualidade e competitividade. p.1433-1438, 1994a.

_____. Separação de colesterol da gordura láctea utilizando quilaia e terra diatomácea. III. Curvas de distribuição de equilíbrio e simulação de processo. 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química: O novo modelo da indústria química, tecnologias limpas, qualidade e competitividade. p.1445-1450, 1994c.

SWAISGOOD, H.E. Characteristics of edible fluids of animal origin: milk. In: FENNEMA, O.W. Food Chemistry. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p.791-827.

SWEENEY, J.P. e WEIHRAUCH, J.L. Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination. CRC Crit. Review in Food Science Nutr., v.8, p.131-159, 1976.

ULBERTH, F.; REICH, H. Gas Chromatographic Determination of Cholesterol in Processed Foods. Food Chemistry, 43, p.387-391, 1992.

8. APÊNDICE

- A: Dados experimentais obtidos para a caracterização das fases resultantes do processo de remoção de colesterol do óleo de manteiga.
- B: Exemplo de cálculo da concentração de colesterol.
- C: Listagem contendo os valores dos coeficientes do modelo de 1^a e 2^a ordem, os resíduos e a matriz para o cálculo do erro experimental, obtida através do programa MODREG.
- D: Balanço de massa para o colesterol.

Apêndice A: Dados experimentais obtidos para a caracterização das fases resultantes do processo de remoção de colesterol do óleo de manteiga.

Tabela A1 : Umidade encontrada na fase oleosa e torta de Celite®545

Ensaio	% umidade fase oleosa	% umidade torta
1	0,17	33,079
2	0,20	33,614
3	0,14	35,652
4	0,17	35,763
5	0,18	34,276

Tabela A2 : Concentração de colesterol na torta, conteúdo de óleo na torta e concentração de colesterol no óleo extraído da torta.

Ensaio	Col _{torta} (mg/g torta)	% de óleo na torta	Col. no óleo extraído da torta (mg/g óleo)	Col _{fase oleosa} (mg/g óleo)	%*
1	0,873	17,58	2,254	0,532	323,68
2	1,292	22,01	3,804	0,987	285,41
3	2,191	19,48	6,099	1,483	311,26
4	3,371	18,10	7,953	2,114	276,21
5	5,032	20,88	19,078	4,210	353,16

* $\frac{\text{Col. no óleo extraído da torta}}{\text{Col. na fase oleosa}} \cdot 100$

Tabela A3 : Demais condições dos ensaios

Ensaio	CSQ	QTD	T	pH	Col _o
1	0,11	0,24	35	3	2,5
2	0,11	0,24	35	4	2,5
3	0,11	0,24	35	4	6,0
4	0,11	0,24	35	4	14,0
5	0,11	0,24	35	3	14,0

Apêndice B : Exemplo de cálculo da concentração de colesterol

Definições :

- ↳ Área do pico : área integrada do pico apresentado pelo colesterol
- ↳ Coeficiente angular : coeficiente angular da curva de calibração obtida para determinar a concentração de colesterol (mg/ml) tendo-se o valor da área do pico
- ↳ Volume de hexano : volume de hexano obtido com extrações sucessivas do colesterol, após saponificação
- ↳ Massa da amostra : valor preciso da amostra que foi saponificada , na qual se queria determinar a concentração de colesterol

Do cromatograma obtinha-se a área do equivalente ao pico do colesterol, que dividida pelo coeficiente angular da curva de calibração, resultava no valor da concentração de colesterol em mg/ml de hexano.

Para se obter o valor da concentração em mg Col. / g de amostra (que é a forma padrão de se expressar concentração de colesterol) , multiplicava-se pelo volume de hexano no qual encontrava-se o colesterol e dividia-se pela massa de amostra inicial.

Ilustrando:

$$\text{Conc. colesterol} = \frac{\text{área do pico}}{\text{coeficiente angular}} \quad (\text{mg col./ml hexano}) \times \frac{\text{vol. hexano}}{\text{massa amostra}} \quad (\text{ml/g})$$

Com valores (ensaio 15):

$$\text{Conc. colesterol} = (89659 / 4,21503 \times 10^6) \times (29,082 / 0,3067) = 2,017 \text{ mg / g}$$

Apêndice C: Listagem contendo os valores dos coeficientes do modelo de 1^a e 2^a ordem, os resíduos e a matriz para o cálculo do erro experimental, obtida através do programa MODREG.

dreg

- * NOME DO ARQUIVO CONTENDO A MATRIZ DE PLANEJAMENTO.....: encod.dat
- * NOME DO ARQUIVO COM OS VALORES DAS RESPOSTAS.....: respn2.dat
- * TIPOS DE RESPOSTAS DIFERENTES.....: 1
- * NUMERO DA RESPOSTA PARA FAZER A REGRESSAO.....: 1
- * NUMERO DE FATORES (VARIAVEIS INDEPENDENTES).....: 4
- * NUMERO TOTAL DE ENSAIOS.....: 19
- * EXISTEM REPETICOES (S/N)?.....: s
- * ORDEM DO POLINOMIO A SER AJUSTADO (1 OU 2).....: 1
- * DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

DADOS DE ENTRADA

PRIMEIRA COLUNA: RESPOSTAS; OUTRAS COLUNAS: MATRIZ DE PLANEJAMENTO)

1	1.7010	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000
2	1.1200	1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000
3	1.6070	-1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000
4	.8810	1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000
5	1.8600	-1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000
6	.9650	1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000
7	1.7860	-1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000
8	.9330	1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000
9	2.1310	-1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000
10	2.0720	1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000
11	2.0950	-1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000
12	2.0020	1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000
13	2.1010	-1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000
14	2.0550	1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000
15	2.0170	-1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	1.9720	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
17	1.7630	.0000	.0000	.0000	.0000
18	1.8400	.0000	.0000	.0000	.0000
19	1.9350	.0000	.0000	.0000	.0000

* DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

RESULTADOS DA MODELAGEM

SAIO	RESPOSTA	RESPOSTA PREVISTA	RESIDUO
1	1.7010	1.6243	.07666
2	1.1200	1.2121	-.09209
3	1.6070	1.5353	.07166
4	.8810	1.1231	-.24209
5	1.8600	1.6343	.22566
6	.9650	1.2221	-.25709
7	1.7860	1.5453	.24066
8	.9330	1.1331	-.20009
9	2.1310	2.3233	-.19234
0	2.0720	1.9111	.16091
1	2.0950	2.2343	-.13934
2	2.0020	1.8221	.17991
3	2.1010	2.3333	-.23234
4	2.0550	1.9211	.13391
5	2.0170	2.2443	-.22734
6	1.9720	1.8321	.13991
7	1.7630	1.7282	.03479
8	1.8400	1.7282	.11179
9	1.9350	1.7282	.20679

* DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

DEFICIENTES DO POLINOMIO AJUSTADO (1 = TERMO CONSTANTE)

1	1.7282
2	-.2061
3	-.0445
4	.0050
5	.3495

* DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

ANALISE DA VARIANCIA

SOURCE OF VARIATION	SOMA QUADRATICA	GRAUS DE LIBERDADE	MEDIA QUADRATICA	TESTE F
REGRESSAO	2.6663	4	.6666	
RESIDUOS	.6074	14	.0434	15.3648
QUANTIDADE DE AJUSTE	.5925	12	.0494	
ERRO PURO	.0148	2	.0074	6.6518
TOTAL	3.2737	18		
DE VARIANCIA EXPLICADA =		81.4469		
MAXIMA DE VARIANCIA EXPLICAVEL =		99.5465		

* DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

MATRIZ ((XT)*X)**(-1) PARA O CALCULO DOS ERROS

.052632	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.062500	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.062500	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.062500	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.062500

op - Program terminated.

N>

Modreg

- * NOME DO ARQUIVO CONTENDO A MATRIZ DE PLANEJAMENTO.....: encod.dat
- * NOME DO ARQUIVO COM OS VALORES DAS RESPOSTAS.....: respn2.dat
- * TIPOS DE RESPOSTAS DIFERENTES.....: 1
- * NUMERO DA RESPOSTA PARA FAZER A REGRESSAO.....: 1
- * NUMERO DE FATORES (VARIAVEIS INDEPENDENTES).....: 4
- * NUMERO TOTAL DE ENSAIOS.....: 29
- * EXISTEM REPETICOES (S/N)?.....: s
- * ORDEM DO POLINOMIO A SER AJUSTADO (1 OU 2).....: 2
- * DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

DADOS DE ENTRADA

PRIMEIRA COLUNA: RESPOSTAS; OUTRAS COLUNAS: MATRIZ DE PLANEJAMENTO)

1	1.7010	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000
2	1.1200	1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000
3	1.6070	-1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000
4	.8810	1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000
5	1.8600	-1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000
6	.9650	1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000
7	1.7860	-1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000
8	.9330	1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000
9	2.1310	-1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000
10	2.0720	1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000
11	2.0950	-1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000
12	2.0020	1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000
13	2.1010	-1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000
14	2.0550	1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000
15	2.0170	-1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	1.9720	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
17	1.7630	.0000	.0000	.0000	.0000
18	1.8400	.0000	.0000	.0000	.0000
19	1.9350	.0000	.0000	.0000	.0000
20	1.7130	-2.0000	.0000	.0000	.0000
21	1.0890	2.0000	.0000	.0000	.0000
22	1.6430	.0000	-2.0000	.0000	.0000
23	1.6010	.0000	2.0000	.0000	.0000
24	1.6910	.0000	.0000	-2.0000	.0000
25	1.6480	.0000	.0000	2.0000	.0000
26	.6750	.0000	.0000	.0000	-2.0000
27	2.0490	.0000	.0000	.0000	2.0000
28	1.7830	.0000	.0000	.0000	.0000
29	1.9830	.0000	.0000	.0000	.0000

DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

RESULTADOS DA MODELAGEM

SAIO	RESPOSTA	RESPOSTA PREVISTA	RESIDUO
	1.7010	1.6572	.04383
	1.1200	.9913	.12867
	1.6070	1.5663	.04067
	.8810	.8665	.01450
	1.8600	1.7322	.12783
	.9650	.9713	-.00633
	1.7860	1.6828	.10317
	.9330	.8880	.04500
	2.1310	2.0287	.10233
	2.0720	2.0658	.00617
	2.0950	1.9793	.11567
	2.0020	1.9825	.01950
	2.1010	2.0062	.09483
	2.0550	1.9483	.10667
	2.0170	1.9983	.01867
	1.9720	1.9065	.06550
	1.7630	1.8608	-.09780
	1.8400	1.8608	-.02080
	1.9350	1.8608	.07420
	1.7130	1.9082	-.19517
	1.0890	1.1505	-.06150
	1.6430	1.8167	-.17367
	1.6010	1.6840	-.08300
	1.6910	1.7983	-.10733
	1.6480	1.7973	-.14933
	.6750	.7953	-.12033
	2.0490	2.1853	-.13633
	1.7830	1.8608	-.07780
	1.9830	1.8608	.12220

DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

COEFICIENTES DO POLINOMIO AJUSTADO (1 = TERMO CONSTANTE)

- 1.8608
- .1894
- .0332
- .0002
- .3475
- .0829
- .0276
- .0157
- .0926
- .0085
- .0237
- .1757
- .0104
- .0104
- .0244

DIGITE <CR> PARA CONTINUAR

MATRIZ ((XT)*X)**(-1) PARA O CALCULO DOS ERROS

.200000	.000000	.000000	.000000	.000000	-.050000	-.050000
-.050000	-.050000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
.000000	.041667	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
.000000	.000000	.041667	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
.000000	.000000	.000000	.041667	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
.000000	.000000	.000000	.000000	.041667	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
-.050000	.000000	.000000	.000000	.000000	.038542	.007292
.007292	.007292	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
-.050000	.000000	.000000	.000000	.000000	.007292	.038542
.007292	.007292	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
-.050000	.000000	.000000	.000000	.000000	.007292	.007292
.038542	.007292	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
-.050000	.000000	.000000	.000000	.000000	.007292	.007292
.007292	.038542	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.062500	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000						
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.062500	.000000	.000000	.000000
.000000						
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.062500	.000000	.000000
.000000						
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.062500	.000000
.000000						
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.062500
.000000						
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
.062500						

o - Program terminated.

Apêndice D: Balanço de massa para o colesterol.

Tabela D1: Valores para concentração de colesterol e comparação entre concentrações de colesterol na emulsão e na fase oleosa

Ensaio	Col _o (mg/g óleo)	Col _I (mg/g fase oleosa)	Col _{II} (mg/g fase aquosa)	Col _{III} (mg/g torta)	Col _{emulsão} (mg/g emulsão)	%**
1	2,5	1,034	0,207	0,654	1,304	26,11
2	2,5	0,998	0,223	0,629	1,276	27,86
3	2,5	1,086	0,231	0,742	1,312	20,81
4	2,5	1,022	0,273	0,698	1,301	27,30
5	2,5	1,007	0,239	0,703	1,288	27,90

** $\frac{\text{Col}_{\text{emulsão}}}{\text{Col}_{\text{fase oleosa}}} \cdot 100$

1) Separação física das três fases (ensaio 3):

Emulsão: 51 ml

Fase aquosa: 27,5 ml

Torta úmida: 14,19 g

2) Secagem da torta e determinação da quantidade de óleo retido na mesma:

Torta seca: 9,87g

Massa de óleo na torta: 2,67g

3) Balanço de massa para o óleo:

M. óleo inicial = M. óleo emulsão + M. óleo fase aquosa + M. óleo torta

30g = X + 0 (aproximadamente) + 2,67g

Massa de óleo na emulsão = 27,33g

4) Balanço de massa para solução de quilaia (assumindo $d=1\text{g/ml}$):

$$M. \text{ sol. quilaia inicial} = M. \text{ sol. quilaia emulsão} + M. \text{ sol. quilaia fase aquosa} + M. \text{ sol. quilaia torta}$$

$$50\text{g} = Y + 27,5\text{g} + 4,32\text{g}$$

$$\text{Massa da solução de quilaia na emulsão} = 18,18\text{ g}$$

Portanto,

$$\text{Massa de emulsão} = 45,51\text{g}$$

5) Balanço de massa para o colesterol:

$$Col_o = Col_{emulsão} + Col_{fase aquosa} + Col_{torta}$$

$$2,5 \text{ mg/g óleo} \times 30\text{g} = 1,312 \text{ mg/g emulsão} \times 45,51\text{g} + 0,231 \text{ mg/g fase aquosa} \times 27,5\text{g} + 0,742 \text{ mg/g torta} \times 9,87\text{g}$$

$$75 \text{ mg colesterol} \sim 73,38 \text{ mg colesterol} \Rightarrow 97,84\% \text{ de recuperação}$$