

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

**Avaliação do Coeficiente de Partição do Colesterol Entre
Duas Fases: Solução Saponificada e Hidrocarbonetos**

Autora: Juliana de Souza Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

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

200015634

Campinas – São Paulo

Agosto de 2000



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	8c
N.º CHAMADA:	TI Unicamp
	F413a
V.	Ex.
TOMBO BC/	42707
PROC.	161278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/10/00
N.º CPD	

CM-00144294-3

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

F413a Ferreira, Juliana de Souza

Avaliação do coeficiente de partição do colesterol
entre duas fases: solução saponificada e hidrocarbonetos /
Juliana de Souza Ferreira.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1. Colesterol. 2. Hexano. 3. Hidrocarbonetos. 4.
Equilíbrio líquido-líquido. 5. Álcool. I. Kieckbusch, Theo
Guenter. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia Química. III. Título.

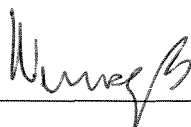
Dissertação de Mestrado defendida por Juliana de Souza Ferreira e aprovada em 22 de agosto de 2000 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch - Orientador



Prof. Dr. Martin Aznar



Profa. Dra. Neura Bragagnolo

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, defendida pela Engenheira Química Juliana de Souza Ferreira e aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de agosto de 2000.



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
(Orientador)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Dedico esse trabalho à minha família que sempre
me incentivou e soube transmitir segurança e
palavras de conforto nos momentos mais difíceis.
Principalmente à minha afilhada, Bruna, que
deixa minha vida repleta de alegria.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelas oportunidades que tive na vida e por iluminar minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch, pela sua orientação, compreensão e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao técnico, Ariovaldo Astini, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela orientação no uso do cromatógrafo a gás, e pela prestação de seus serviços na manutenção do equipamento.

Ao aluno de pós-graduação, Pedro de Alcântara Pessoa Filho, que permitiu o uso do programa computacional com base no modelo UNQUAC, desenvolvido por ele em seu trabalho de mestrado, e que serviu de peça fundamental para análise dos meus resultados.

Aos amigos do Departamento de Termofluidodinâmica, pelos momentos de companheirismo e estudo intenso e aos amigos do Laboratório de Engenharia de Processos, pela compreensão e amizade.

Aos amigos, Sérgio Bernardo e Wanda Batista de Amorim, que demonstraram ser amigos leais e estiveram presentes em todo o período de mestrado, compartilhando momentos alegres e difíceis. À amiga Virgínia Aparecida da Silva Moris, por se mostrar uma pessoa tão dedicada, compreensiva, carismática e alegre. E as amigas Luciana Igarashi e Leci Maricela Romero Peña, pela orientação e amizade.

Aos meus pais, por terem se esforçado tanto para que eu pudesse ter um futuro melhor, aos meus irmãos e aos meus tios que sempre me aconselharam da melhor maneira possível.

Ao programa de Bolsas CNPq pelo apoio financeiro

Finalmente, a todas as pessoas que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho, pois foram várias as pessoas cujos nomes não foram citados acima, mas que me deram apoio e demonstraram amizade.

São todas essas pessoas que me fazem acreditar que não importa a situação que estamos vivendo, nem onde moremos, o maior presente de nossas vidas são a família e os amigos.

RESUMO

A quantificação analítica do teor de colesterol em alimentos envolve a preparação da amostra que consiste em uma saponificação dos lipídeos com solução alcóolica de KOH, seguida de extração dos insaponificáveis, entre os quais se inclui os esteróis, com um solvente orgânico, normalmente um hidrocarboneto. Na prática, assume-se uma partição predominante do colesterol na fase solvente e que a extração se completa com um ou dois contatos. A presente pesquisa visa avaliar a influência das condições de equilíbrio de fases do sistema ternário (água, álcool, hidrocarboneto) sobre os Coeficientes de Partição do colesterol e de um padrão interno cromatográfico, o 5 α -colestano. As condições ensaiadas foram:

- ✓ Proporção A: 10 mL de álcool, 5 mL de água e 10 mL de solvente;
- ✓ Proporção B: 10 mL de álcool, 15 mL de água e 10 mL de solvente;
- ✓ Proporção C: 20 mL de álcool, 5 mL de água e 10 mL de solvente;
- ✓ Proporção D: 10 mL de álcool, 5 mL de água e 20 mL de solvente.

Avaliou-se como solventes: hexano, ciclohexano e tolueno e como álcoois: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol. Observou-se contração de volume da fase leve e determinou-se a densidade das fases antes e após contato de equilíbrio, como forma de avaliar o efeito do KOH na composição de fases, estimada por um programa baseado no Modelo UNQUAC. O etanol mostrou ser o solvente mais adequado para a saponificação e a Proporção A, com hexano ou ciclohexano produziu a situação mais favorável em termos de rendimento e operacionalidade. Foram encontrados Coeficientes de Partição do colesterol em torno de 6,0 (hexano) e 7,0 (ciclohexano), indicando que o número de contatos de extração deve ser, no mínimo, 3. O Coeficiente de Partição do 5 α -colestano, foi superior a 100. A Proporção C foi a mais desfavorável, pois a maior quantidade de álcool aumenta a mútua solubilidade solvente/água, diminuindo a seletividade da extração. Comparações entre o comportamento das Proporções B e D sugerem que, para melhorar a eficiência de extrações, é preferível aumentar a proporção de água na mistura em vez de solvente.

Palavras-chaves: Colesterol, Coeficiente de Partição, Hexano, Ciclohexano, Saponificação, Equilíbrio de Fases.

ABSTRACT

The analytical quantification of cholesterol content in food requires a sample preparation step consisting of the lipid saponification with an alcoholic solution of KOH, followed by extraction of the unsaponifiables, among them the sterols, with an organic solvent, usually a hydrocarbon. In the practice a preference of cholesterol for the solvent phase is assumed, so that one or two contacts are only needed. This research focuses on the influence of the phase equilibrium conditions of the ternary system (water, alcohol, hydrocarbon) on the partition coefficients of cholesterol and of an internal chromatographic standard (5- α -cholestane). The conditions tested were:

- ✓ Proportion A: 10 mL alcohol, 5 mL water, 10 mL solvent
- ✓ Proportion B: 10 mL alcohol, 15 mL water, 10 mL solvent
- ✓ Proportion C: 20 mL alcohol, 5 mL water, 10 mL solvent
- ✓ Proportion D: 10 mL alcohol, 5 mL water, 20 mL solvent

The type of solvent evaluated were hexane, cyclohexane and toluene, and, methanol, ethanol, propanol and butanol were used as alcohol. A volume contraction of the light phase was observed and the specific mass of all phases, before and after the equilibrium contact were determined, as an approach to evaluate the effect of KOH in the composition of the phases, estimated by a numerical program based on the UNIQUAC model. The ethanol was verified as the most adequate solvent for the saponification and the Proportion A, with hexane or cyclohexane, generated the most favorable situations in terms of yield and operationality. Partition Coefficients for the cholesterol around 6,0 (hexane) and 7,0 (cyclohexane) were found, an indication that the number of contacts should be at least three. The Partition Coefficient of 5- α -cholestane was higher than 100. The Proportion C created the most unfavorable condition, since the larger quantity of ethanol increased the solvent/water mutual solubility, decreasing selectivity. Comparison between the behavior of Proportion B and D suggests that, for a better extraction efficiency, it is advantageous to increase the water ratio in the mixture, instead the solvent quantity.

Key Words: Cholesterol, Partition Coefficient, Hexane, Cyclohexane, Saponification, Phase Equilibrium.

SUMÁRIO

Nomenclatura	xi
Capítulo 1 - Introdução	01
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	03
2.1 Colesterol	03
2.1.1 Características Gerais	03
2.2 Hidrólise de Lipídios (Saponificação)	05
2.3 Determinação Quantitativa do Colesterol	05
2.3.1 Procedimento do Método Oficial da AOAC	07
2.4 Histórico e Adaptações das Técnicas Empregadas	08
2.5 Equilíbrio de Fases	12
2.6 Sistema Água-Álcool-Hidrocarboneto	16
2.7 Solubilidade	19
2.8 Efeito de Eletrólitos	22
2.9 Coeficiente de Partição	24
2.10 Partição do Colesterol	27
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	31
3.1 Reagentes	31
3.2 Materiais	32
3.3 Preparo da Fase Lipídica	33
3.4 Saponificação	36
3.5 Extração dos Insaponificáveis	37
3.6 Cromatografia Gás-Líquido	37
3.7 Determinação de Densidade das fases	39
3.8 Equilíbrio de Fases	40
3.9 Determinação do Coeficiente de Partição	41
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	45
4.1 Equilíbrio e Solubilização dos Componentes	45
4.1.1 Sistema: Água-Solução Etanólica-Hexano	46

4.1.1.1) Composição de Equilíbrio	46
4.1.1.2) Densidade das Fases	49
4.1.1.3) Variação de Volume das Fases na Mistura	53
4.1.2 Sistema: Água-Solução Etanólica-Ciclohexano	56
4.1.2.1) Composição de Equilíbrio	56
4.1.2.2) Densidade das Fases	59
4.1.2.3) Variação de Volume das Fases na Mistura	62
4.1.3 Sistema: Água-Solução Etanólica-Tolueno	65
4.1.3.1) Composição de Equilíbrio	65
4.1.3.2) Densidade das Fases	67
4.1.3.3) Variação de Volume das Fases na Mistura	70
4.1.4 Sistema com Metanol	74
4.1.5 Sistema com Propanol e Butanol	75
4.1.5.1) Composição de Equilíbrio	75
4.1.5.2) Densidade das Fases	76
4.1.5.3) Variação de Volume das Fases na Mistura	79
4.2 Coeficiente de Partição	80
4.2.1 Sistema: Água-Solução Etanólica-Hexano	82
4.2.2 Sistema: Água-Solução Etanólica-Ciclohexano	84
4.2.3 Sistema: Água-Solução Etanólica-Tolueno	86
4.2.4 Sistema: Água-Solução de 1-propanol-Hexano	88
4.3 Ajuste de dados (Sistemas: Hexano e Ciclohexano)	89
Capítulo 5 - Conclusões e Sugestões	93
5.1 Conclusões e Recomendações	93
5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros	95
Apêndice A - Diagramas de Equilíbrio Ternário Líquido-Líquido	97
Apêndice B - Propriedades Físicas dos Compostos	105
Apêndice C - Parâmetros de Ajuste do Modelo UNIQUAC	109
Apêndice D - Propagação de Erros	119
Referências Bibliográficas	127

NOMENCLATURA

Área	área do pico calculado pelo integrador do cromatógrafo a gás
DP	desvio-padrão
K_I	coeficiente de partição após a 1ª extração
K_{II}	coeficiente de partição após a 2ª extração
$K_{\text{médio}}$	coeficiente de partição médio
K_{ajuste}	coeficiente de partição de ajuste
PM	peso molecular (g/gmol)
%Rec	percentagem de recuperação
SAP	volume da fase aquosa (mL)
SOLV	volume da fase orgânica (mL)
x	fração molar na fase aquosa
y	fração molar na fase orgânica
z	fração molar na mistura global
ΔV	diferença de volume antes e após o equilíbrio (mL)
ρ	densidade (g/mL)

Subscritos

1	água
2	álcool
3	solvente
0	antes do equilíbrio ou estado puro do componente
I	após o 1º contato de equilíbrio
II	após o 2º contato de equilíbrio
III	após o 3º contato de equilíbrio
wo	fase aquosa antes do equilíbrio

1 INTRODUÇÃO

O colesterol é um metabólito essencial ao organismo humano, pois na sua ausência, as membranas biológicas não funcionariam adequadamente. Além disso, o colesterol é convertido em uma variedade de hormônios esteróides com funções reguladoras importantes e em ácidos biliares que são cruciais para a absorção de gordura. No entanto, há uma relação entre o aumento de incidência de doenças cardiovasculares e os elevados níveis de colesterol no sangue.

Os dados mais recentes publicados mostram que, em média, 32,4% dos brasileiros entre 14 e 70 anos de idade, apresentam elevada taxa de colesterol (STRINGUETO, 1999).

Devido à crescente preocupação dos consumidores com os níveis de colesterol no sangue e à indústria atenta a este fato, há a necessidade de se encontrar uma metodologia rápida e precisa para a determinação de seu teor nos alimentos, no intuito de facilitar o planejamento de dietas baseadas em alimentos com baixo colesterol, além de aperfeiçoar a identificação e o tratamento de indivíduos que apresentam altos níveis de colesterol no sangue (AL-HASANI *et al*, 1993).

A metodologia para a determinação de colesterol, vem sofrendo ao longo dos anos, simplificações no intuito de promover a praticidade do método. No entanto, há pouca uniformidade entre os já existentes, sendo que mesmo os métodos padrões atualmente aceitos diferem não somente em detalhes, mas também em pontos significantes. De fato, todos os métodos padrões exigem maiores e menores preparações de amostras e complexos

procedimentos de extrações, usando produtos químicos altamente tóxicos e inflamáveis em grandes quantidades (KOVACS, 1979).

As etapas empregadas nos vários métodos existentes são:

- Extração lipídica usando uma combinação de solventes (clorofórmio-metanol) (FOLCH *et al.*, 1957). Esta etapa foi descartada no método da saponificação direta.
- Saponificação com solução de KOH alcóolica para promover a obtenção do colesterol na sua forma livre e solubilização das gordura e proteínas em água.
- Extração dos esteróis não saponificáveis com solvente orgânico, sendo que o colesterol é o esterol encontrado em maior proporção;
- Derivatização, etapa usada apenas quando a técnica de quantificação é a cromatografia gasosa;
- Quantificação do colesterol.

Para quantificação do colesterol, a técnica mais utilizada é a cromatografia, gasosa ou líquida, por apresentar vantagens em termos de precisão e especificidade. Outras técnicas fazem uso da precipitação por digitonina, de métodos colorimétricos ou enzimáticos.

O propósito deste trabalho foi estudar a distribuição do colesterol no equilíbrio líquido-líquido entre hidrocarboneto-álcool-água, de forma a determinar as melhores condições de análise para quantificação do colesterol por cromatografia gasosa, para obter sua máxima recuperação. Deste modo, será possível eliminar as divergências que há nas diferentes técnicas apresentadas e, principalmente, comprovar o número mínimo de extrações com o solvente para obter uma recuperação satisfatória de colesterol.

Por isso, foram realizados ensaios variando as proporções de cada componente do equilíbrio e o tipo de álcool, como o metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol e o 1-butanol; e o tipo de hidrocarboneto, sendo escolhidos inicialmente hexano, ciclohexano e tolueno. Deverão também ser analisados os tempos adequados de agitação e decantação.

Além disso, verificou a influência do hidróxido de potássio usado na saponificação que permanece presente no equilíbrio e o comportamento do padrão interno 5 α -colestano, mais usado na cromatografia gasosa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Colesterol

2.1.1 Características Gerais

O colesterol é um esterol. Os esteróis são álcoois de alto peso molecular, pertencentes à família dos esteróides. Constitui o componente principal da fração insaponificável dos óleos e gorduras, podendo ser encontrado no estado livre ou esterificado com ácidos graxos de alto peso molecular (BRUNHARA, 1997).

Os esteróis são classificados segundo a sua origem: zoosteróis (animal), fitosteróis (vegetal) e micosteróis (microorganismos). Entre os zoosteróis, o colesterol é o mais abundante. Em vegetais, o esterol encontrado com maior frequência é o sitosterol, seguido do estigmasterol e do campesterol. O esterol mais importante produzido por fungos é o ergosterol, precursor da vitamina D₂.

O colesterol, um sólido cristalino de ponto de fusão bastante elevado, tem a estrutura e a configuração estereoquímica indicadas na Figura 2.1 (FIESER e FIESER, 1967). Possui um sistema de anel tetracíclico, tem uma dupla ligação em um dos anéis e um grupo hidroxila.

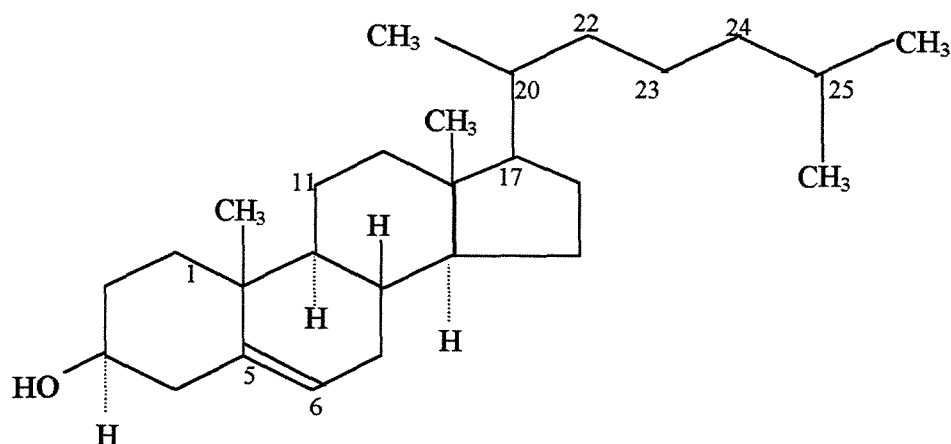


Figura 2.1: Estrutura e configuração estereoquímica do colesterol.

Propriedades físico-químicas do colesterol (WEAST *et al.*, 1965):

- Fórmula química: $C_{27}H_{45}OH$
- Peso molecular: 386,87 g/gmol
- Ponto de fusão: 148,5° C
- Ponto de ebulição: 360° C (decomposição)
- Densidade: 1,067 g/cm³
- Solubilidade:
 - ✕ ligeiramente solúvel em água e álcool;
 - ✕ muito solúvel em éter, dioxano e clorofórmio;
 - ✕ solúvel em benzeno.

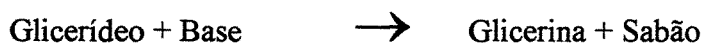
O colesterol é encontrado em todos os tecidos do organismo humano, sobretudo no sangue, que contém, normalmente, até 200 mg de colesterol total em 100 mL. Cerca de 27 % do colesterol do sangue está presente como tal, estando o restante esterificado com ácidos graxos pesados, como o esteárico, o oleico e o palmítico (FIESER e FIESER, 1967).

Nem todas as funções biológicas do colesterol são ainda conhecidas. Sabe-se que o colesterol serve como um intermediário na biossíntese de todos os esteróides do corpo, sendo, portanto, essencial para a vida. Porém, o ser humano não precisa ter colesterol na sua dieta, pois seu corpo pode sintetizar a quantidade necessária. Ao ingerir colesterol, o corpo sintetiza menos colesterol. (SOLOMONS, 1992).

A principal via de degradação do colesterol é a conversão a ácidos biliares no fígado. Estes são liberados no intestino delgado onde auxiliam na absorção dos lipídios para formarem os quilomicrons. Os ácidos biliares são reabsorvidos durante a absorção lipídica. A principal via de excreção do colesterol é a intestinal onde o coprostanol (principal esterol das fezes) é formado pela ação microbiana e uma fração menor do colesterol é convertido em hormônios esteroidais, sofrendo eliminação urinária (HARPER *et al.*, 1982).

2.2 Hidrólise de Lipídios (Saponificação)

A saponificação é a reação dos glicerídios com álcalis, geralmente NaOH ou KOH, para a obtenção do sabão comum. É um processo pelo qual são invertidas as relações de solubilidade, porque, numa diluição conveniente, os produtos são solúveis em água e não extratáveis com éter ou qualquer outro solvente orgânico. De um modo geral:



Quando se saponifica um tecido de origem animal contendo colesterol, grande parte dos fosfolipídios, das gorduras e das proteínas é convertida em produtos solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. Por extração com solvente orgânico, obtém-se a fração de lipídios não saponificável, constituída principalmente por colesterol.

A camada não saponificável conterá também alguns hidrocarbonetos, álcoois de cadeia longa e os esteróis originalmente presentes na amostra de lipídios, na forma livre ou esterificada (CHRISTIE, 1989).

2.3 Determinação Quantitativa do Colesterol

Para a determinação do colesterol existem vários métodos que diferem em número e tipos de etapas. Porém, de modo geral, as etapas usadas nos diversos procedimentos obedecem a seguinte ordem:

- Extração de lipídios: o objetivo deste procedimento é extrair não somente o colesterol contido na fração lipídica do tecido animal, mas também qualquer colesterol que possa estar ligado a proteínas, assim como a uma lipoproteína;
- Saponificação: é a hidrólise dos ésteres de colesterol para convertê-los à forma livre, assim como a solubilização em água dos lipídios, através de sua transformação em glicerol e sais de ácidos graxos;
- Extração dos insaponificáveis: separa o colesterol solúvel em solvente orgânico dos lipídios e ácidos graxos saponificados que permanecem na fase aquosa e/ou alcóolica;
- Quantificação do colesterol: por meio de uma técnica quantitativa tal como gravimetria, titulometria, colorimetria, cromatografia de camada delgada, análise por enzimas, cromatografia líquida ou cromatografia gasosa (CG).

Os métodos colorimétricos e enzimáticos apresentam desvantagens por não serem estritamente específicos e portanto sujeitos a erros devido a substâncias interferentes. Atualmente, a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida (HPLC) são mais indicadas do que as outras técnicas, por apresentarem especificidade e precisão (ULBERTH e REICH, 1992; JIANG *et al.*, 1991; KARKALAS *et al.*, 1982; BITMAN e WOOD, 1980). A análise de cromatografia gasosa é particularmente rápida quando um equipamento de amostragem automático é usado (BEYER *et al.*, 1989).

Cromatografia gasosa é a técnica usada para a quantificação do colesterol baseada na diferença de afinidade do colesterol com uma fase estacionária líquida. Através de um detector e um integrador é possível registrar as áreas referentes ao colesterol (COLLINS *et al.*, 1993).

Como etapa adicional de preparo de amostra para a CG, pode-se optar por uma derivatização que é a transformação do colesterol em um derivado com características mais adequadas para ser analisado por cromatografia gasosa. É utilizada particularmente na determinação de substâncias de alta massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares.

2.3.1 Procedimento do Método Oficial da AOAC

A determinação do colesterol em alimentos baseada no Método Oficial da AOAC 994.10 (1997) emprega a saponificação direta dos lipídios da amostra com solução etanólica de KOH e temperatura de ebulição (refluxo). A fração insaponificável contendo colesterol e outros esteróis é extraída com tolueno. Os esteróis são derivatizados a éteres de trimetilsilil (TMS) e quantificados por cromatografia gasosa (AOAC,1997).

Este procedimento elimina a extração dos lipídios baseada no método de FOLCH *et al.* (1957) que, mesmo assim, ainda é muito usado. Nele, para cada 10 g de amostra utiliza-se 200 mL de clorofórmio-metanol (2:1), agita-se por 2 min, filtra-se em um funil de separação de 500 mL e faz-se duas lavagens com 40 mL e 20 mL de NaCl 0,58%, respectivamente, completando-se o volume com clorofórmio em balão volumétrico de 200 mL. Em seguida, toma-se 5 mL deste extrato clorofórmico, evapora-se o solvente com N₂ e banho-maria a 55° C, e dá-se seqüência à saponificação.

Um resumo da metodologia AOAC (1997) é dado abaixo:

Saponificação: após pesar a amostra em um frasco Erlenmeyer, adiciona-se 40 mL de etanol 95% e 8 mL de KOH 50% e mantém-se sob refluxo por 60 a 80 min. Remover o frasco do condensador, tampar, e resfriar a solução à temperatura ambiente.

Extração: Adicionar 100 mL de tolueno à amostra saponificada sob agitação. Tampar o frasco e agitar por mais de 30 s. Despejar a solução em um funil de separação de 500 mL sem enxaguar. Adicionar 110 mL de solução KOH 1N, e agitar o funil vigorosamente por 10 s. Deixar em repouso até a separação das camadas e descartar a fase aquosa (inferior) que será turva. Adicionar 40 mL da solução de KOH 0,5 N, ao funil de separação, inverter gentilmente o funil por 10 s, e descartar a fase aquosa (inferior).

Lavar a camada de tolueno com 40 mL de H₂O girando gentilmente o funil de separação. Permitir a separação das camadas e descartar a fase aquosa. Repetir a lavagem com água pelo menos 3 vezes, agitando cada vez mais vigorosamente. Se ocorrer emulsificação, adicionar pequena quantidade de etanol 95%, agitar o conteúdo do funil, permitir a separação de fases e continuar as lavagens com água. Após a lavagem final, a camada de tolueno deveria ser clara.

Transferir a camada de tolueno do topo do funil através de um funil de vidro contendo lã de vidro e cerca de 20 g de Na_2SO_4 para um erlenmeyer de 125 mL já contendo cerca de 2 g de Na_2SO_4 . Tampar o frasco e agitar o conteúdo. Deixar a solução em repouso por mais de 15 min. Os extratos da amostra podem ser mantidos em frascos por até 24 horas, desde que firmemente selados.

Pipetar 25 mL de extrato do erlenmeyer (125 mL) e evaporar até secura em um evaporador a 40° C. Adicionar cerca de 3,0 mL de acetona e evaporar o conteúdo até a secura, novamente. Dissolver o resíduo em 3,0 mL de DMF (dimetilformamida). A concentração final de colesterol em DMF deveria estar dentro da faixa das soluções padrões (0,0025 – 0,2 mg/mL).

Derivatização: Colocar alíquotas de 1,0 mL de solução padrão e de solução teste em tubos de centrífugas separados. Essa solução padrão é obtida diluindo a solução estoque (2,0 mg de colesterol/mL de DMF) a várias concentrações de 0,0025 a 0,2 mg/mL. Adicionar 0,2 mL de HMDS (hexametildisilano) e 0.1 mL de TMCS (trimetilclorosilano), agitar por 30 s, deixar em repouso por 15 min e adicionar 1,0 mL de solução do padrão interno, 5 α -colestano, (0.1 mg/mL em n-heptano) e 10 mL de H_2O . Agitar e centrifugar por 2,0 min. Transferir a fase superior (heptano) para o frasco de injeção.

Análise de CG: injetar uma quantidade apropriada no cromatógrafo a gás e determinar a área dos picos de 5 α -colestano e colesterol.

2.4 Histórico e Adaptações das Técnicas Empregadas

ZAK (1977) revisou várias metodologias empregadas na determinação de colesterol apresentando um breve histórico e as vantagens e limitações das técnicas usadas. As primeiras determinações de colesterol foram feitas no final do século XIX, baseadas em uma reação de cor desenvolvida por Salkowski. A combinação de uma precipitação com digitonina para purificação e de uma reação de cor para quantificação, levou ao primeiro método colorimétrico para determinação de colesterol no sangue, que foi baseado no procedimento gravimétrico de Windaus. Com o tempo, introduziu-se a etapa de saponificação. A saponificação, realizada antes da extração, se faz necessária quando o

solvente de escolha não for capaz de extrair quantitativamente o colesterol esterificado. A razão primordial da extração é a purificação parcial do colesterol antes de seu isolamento por cromatografia gasosa, ou cromatografia em coluna ou como um derivado precipitado.

Ao longo dos tempos a tendência foi diminuir o número e o tipo de extrações presentes nos procedimentos. Por isso, a extração de lipídios proposta por FOLCH (1957) e utilizada por vários pesquisadores (RHEE *et al.*, 1982; BOHAC *et al.*, 1988) tem sido discutida, sendo que diversos trabalhos realizaram uma comparação entre a saponificação direta e a saponificação após extração lipídica (KOVACS *et al.*, 1979; FENTON e SIM, 1991; MAURICE *et al.*, 1994; MARASCHIELLO *et al.*, 1996). Na saponificação direta ocorre a reação de toda a matéria orgânica com solução de potassa alcóolica, não se considerando a extração prévia de lipídios. Não foi encontrado diferença significativa nos resultados. Apesar da purificação parcial e eliminação da maioria das interferências obtida pela extração prévia dos lipídios possibilitar resultados mais precisos, a vantagem da reação direta é diminuir o número de etapas do processo, e com isso a probabilidade de erros. Além disso, o potencial para automação aumenta à medida que a complexidade do processo diminui.

Os solventes escolhidos na extração do material insaponificável são vários. PUNWAR (1975), foi pioneiro ao usar benzeno, adotado também pelo método 976.26 da AOAC (1976). No entanto, essa metodologia foi considerada trabalhosa e de pouca praticidade (THOMPSON e MEROLA, 1993), além do manuseio de benzeno para extração de insaponificáveis, representar riscos à saúde. A preferência por hexano como solvente está se estabelecendo nas duas últimas décadas, em trabalhos como de KOVACS *et al.* (1979), RHEE *et al.* (1982), KARKALAS *et al.* (1982), BOHAC *et al.* (1988), FENTON e SIM (1991), VAN ELSWYK *et al.* (1991), JIANG *et al.* (1991), AL-HASANI *et al.* (1993) e BRAGAGNOLO, (1992 e 1997). Mesmo assim, ainda são encontrados trabalhos usando éter etílico ou éter de petróleo (BITMAN e WOOD, 1980; PARK e ADDIS, 1986; BEYER *et al.*, 1989; MAURICE *et al.*, 1994), ciclohexano (SLOVER *et al.*, 1983; ULBERTH e REICH, 1992; ALONSO *et al.*, 1995) ou uma combinação de solventes (MARASCHIELLO *et al.*, 1996).

THOMPSON e MEROLA (1993) e RODRIGUES-PALMERO *et al.* (1994), defendem o uso de ciclohexano em substituição ao éter etílico por ser menos tóxico, não formar peróxidos e, principalmente, porque não forma emulsões durante o procedimento. Além disso, a água apresenta menor solubilidade em ciclohexano o que permite a eliminação das etapas de lavagens da fase orgânica, pois a quantidade de água determina a fração de hidróxido arrastada junto com os insaponificáveis durante a extração. Em ensaios realizados por THOMPSON e MEROLA (1993), o pH da água usado nessas lavagens mostrou-se inalterado pelo processo, confirmando que esta etapa não é necessária para remover o álcali. Além da etapa de lavagem ser eliminada, elimina-se a etapa de secagem com Na₂SO₄, pois a remoção da fração de água presente no ciclohexano não requer uma secagem preliminar.

No trabalho desenvolvido por HARTMAN *et al.* (1994), afirmou-se que resultados obtidos com hexano e ciclohexano, como solventes usados na extração de material insaponificável, são semelhantes. No entanto, citam as vantagens de se adotar o uso do ciclohexano, por ser menos volátil, por razões ambientais, e principalmente, por motivos de segurança, pois os riscos de incêndio são menores. Além disso, o custo do ciclohexano é menos do que a metade do de hexano.

Em relação ao tipo de álcool usado, a grande maioria dos trabalhos sobre as reações de saponificação utilizam o etanol, encontrando-se modificações como no trabalho de AL-HASANI *et al.* (1993), que usaram uma combinação de álcoois para a saponificação que consistia de 90% etanol, 5% metanol e 5% isopropanol. O uso do metanol é discutível. No trabalho de PARK e ADDIS, (1986), foi feita a saponificação em metanol com KOH, mantendo o sistema durante o pernoite e à temperatura ambiente. A extração foi realizada em três vezes com éter etílico, sendo necessárias lavagens com solução de KOH e com água destilada. MARASCHIELLO *et al.*, (1996), saponificaram usando solução de KOH em metanol, durante 1 hora a 80° C, e adição de água saturada com NaCl, sendo feitas três extrações com hexano/éter (1:1, v/v).

HARTMAN *et al.* (1994) investigaram procedimentos para a saponificação da amostra de gordura com hidróxido de potássio metanólico. O produto obtido foi dissolvido em éter etílico e separou-se os sabões em água. O resultado não foi satisfatório, porque a

diluição com água produziu três fases ao invés de duas, sendo o volume da fase superior, etérea, pequena.

Apesar do método oficial da AOAC (1997) exigir ainda o uso de refluxo na saponificação, métodos mais simples estão em uso. Nos trabalhos de KOVACS *et al.* (1979), BITMAN e WOOD (1980) e RHEE *et al.* (1982) o uso de refluxo e do funil de separação já tinha sido eliminado, mas SLOVER *et al.* (1983) são os autores que receberam o crédito pela introdução de tubos rosqueados cobertos por teflon® empregados na etapa de saponificação a quente (80° C e 8 min). Após SLOVER *et al.* (1983), poucos trabalhos ainda utilizam refluxo em condensadores, como por exemplo ADAMS *et al.* (1986).

Poucos estudos foram feitos com relação ao uso de antioxidantes do colesterol (BOHAC *et al.*, 1988; BRAGAGNOLO, 1992; ULBERTH e REID, 1992). Os autores relatam a importância de fazer uso de anti-oxidantes, pois o processo de aquecimento na saponificação pode promover reações de oxidação. O anti-oxidante mais comumente usado é o pirogalol (THOMPSON e MEROLA, 1993 e PATERSON e AMADÒ, 1997), por ser uma substância solúvel em água, etanol e metanol, e insolúvel em solventes apolares como o hexano.

O estudo de BOHAC *et al.* (1988) foi abrangente comparando métodos colorimétricos e cromatográficos. Considerou-se diferentes tempos de saponificação (15 ou 60 min), efeito de antioxidante (pirogallol, 3% na mistura de saponificação; galato de propila, 3%; e butil hidroxitolueno (BHT), 12,5%). Os resultados obtidos pelo método colorimétrico, cujo tempo de saponificação foi de 15 minutos na presença de antioxidante, produziu valores semelhantes àqueles obtidos pelo método da cromatografia gasosa (CG).

Após BOHAC *et al.* (1988), o trabalho de FENTON e SIM (1991) tem servido de referência. Além de comparar a saponificação direta *versus* etapa de extração com clorofórmio-metanol antes da saponificação, eles avaliaram também a influência do tamanho da amostra; efeito dos níveis de triglicerídios nas amostras e a eficiência da extração de hexano após a saponificação. Também, eliminaram a etapa de derivatização com o uso de colunas capilares na CG. Com o desenvolvimento de polisiloxanos para fases líquidas, suportes mais inertes e com os aperfeiçoamentos na instrumentação de cromatografia, outros autores também puderam eliminar a derivatização (KOVACS *et al.*,

1979; ADAMS *et al.*, 1986; ULBERTH e REID, 1992 e AL-HASANI *et al.*, 1993). A derivatização não somente é demorada, mas também contribui para um aumento do ruído e decréscimo da linearidade devido aos depósitos sobre o detector de chamas (FID) originados dos derivados de trimetilsilil (TMS).

O método proposto por estes autores consumiu menos solventes, economizando trabalho, eliminou o uso de reagentes tóxicos (clorofórmio, metanol e todos aqueles usados na derivatização) não criando problemas ambientais, dispensou o uso de vidrarias (por exemplo, o evaporador rotatório) e eliminou o depósito de óxidos no FID, reduzindo o trabalho de manutenção.

Poucos trabalhos tem se preocupado em definir o uso de padrões internos. Embora a AOAC (1997) recomende sua adição na etapa final de preparo da amostra para o CG, PARK e ADDIS (1986) e THOMPSON e MEROLA (1993) o introduziram antes da saponificação. O padrão interno mais usado é o 5 α -colestano, por ser quimicamente semelhante ao colesterol.

ALONSO *et al.* (1995), compararam procedimentos diferentes para quantificação do colesterol, na presença de 5 α -colestano ou betulina. Os testes usando a betulina exibiram maior dispersão. Concluíram que o 5 α -colestano é o padrão interno indicado por ser bem definido em cromatografia gasosa e eluir próximo ao colesterol.

THOMPSON e MEROLA (1993) indicaram o uso de 5 α -colestanol como padrão interno para alimentos contendo produtos vegetais, em substituição ao colestano, pelo seu comportamento cromatográfico e possuir um grupo 3 β -hidroxila que conferirá solubilidades e reatividades muito semelhantes àquelas do colesterol.

2.5 Equilíbrio de Fases

A eficiência e a seletividade de extrair o colesterol presente no meio resultante da saponificação, depende de sua partição entre as duas fases formadas pela adição do solvente. Uma avaliação desse processo deve-se basear no conhecimento do equilíbrio entre fases, que no caso é dominado pelo efeito que o álcool induz na mútua solubilidade entre

água e solvente. Acrescente-se a isso, a influência do KOH na composição das fases e na partição do colesterol.

O desenvolvimento apresentado a seguir, sobre equilíbrio líquido-líquido envolvendo sistemas ternários teve como base o levantamento descrito em NOVÁK *et al.* (1987) e em REID *et al.* (1987).

Forma da Curva de Equilíbrio em um Sistema Ternário: Como era de se esperar, há uma maior variedade de curvas binodais (equilíbrio) para um sistema ternário do que para um sistema binário. Os sistemas ternários podem ser divididos em três grupos básicos cujas combinações produzem tipos mais complexos. O primeiro grupo inclui sistemas contendo somente regiões de duas fases, formadas a partir de sistemas binários correspondentes. O segundo grupo consiste de sistemas com uma região trifásica e o último grupo contém aquelas com uma região interna de imiscibilidade limitada.

Se somente um sistema binário é heterogêneo, então diagramas como o da Figura 2.2 são obtidos. Esta é a situação mais frequentemente encontrada e SORENSEN e ARLT (1980) afirmam que representa aproximadamente 75% dos sistemas ternários estudados.

O formato das curvas binodais não é tão importante para aplicações práticas como a inclinação das linhas de amarração, projetadas na Figura 2.2. Elas são caracterizadas em termos de coeficientes de distribuição e a seletividade.

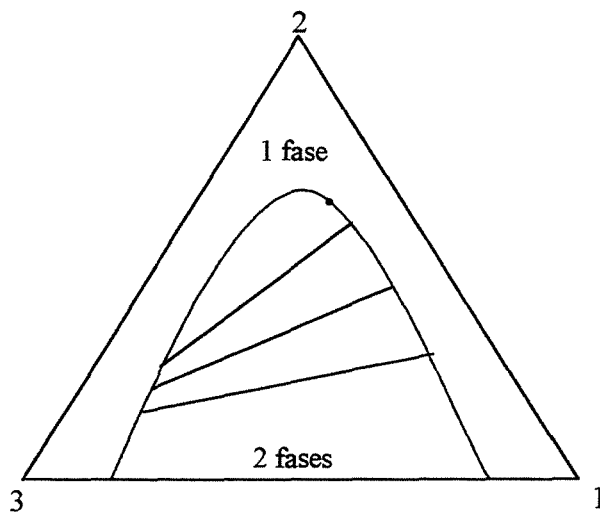


Figura 2.2: Tipo básico de sistema ternário com uma região de duas fases

O tamanho da região heterogênea depende principalmente da mútua solubilidade dos componentes e a região bifásica será maior quanto menor a afinidade das substâncias para se misturarem. Outra importante forma de análise está relacionada com o valor de $G_{11}(x_1)$, que representa a segunda derivada da Energia Livre de Gibbs em relação à composição, e que geralmente apresenta um mínimo, $(G_{11})_{x_0}$. Quanto menor o valor de $(G_{11})_{x_0}$, maior a não-idealidade e maior a região heterogênea.

A inclinação das linhas de amarração é consequência da diferença na não-idealidade dos sub-sistemas binários homogêneos. As linhas de amarração são inclinadas na direção do subsistema homogêneo menos ideal (considerando desvios positivos da lei de Raoult). No caso da Figura 2.2, seria o subsistema 2+3.

Modelagem de Equilíbrio Líquido-Líquido: Independentemente da equação usada, muita cautela deve ser tomada na determinação de parâmetros de dados experimentais. Sempre que possível, esses parâmetros devem ser obtidos de dados binários de solubilidade mútua. Quando dados de equilíbrios líquido-vapor são usados, os resultados são freqüentemente insensíveis aos conjuntos de parâmetros binários escolhidos. Quando equilíbrios líquido-líquido são utilizados, os resultados são extremamente sensíveis à escolha dos parâmetros binários. Portanto, é difícil estabelecer equilíbrios líquido-líquido ternários (ou superiores) confiáveis usando somente dados binários obtidos a partir de equilíbrio líquido-líquido e líquido-vapor. Normalmente, para resultados confiáveis é necessário utilizar alguns dados de equilíbrio líquido-líquido de multicomponentes.

Exige-se considerável habilidade em análises numéricas para poder construir um programa computacional que determine as composições de um sistema multicomponente líquido-líquido a partir de uma expressão para a Energia de Gibbs de excesso, para um dado sistema. É difícil construir um programa que sempre convirja para uma solução fisicamente significativa usando somente um pequeno número de iterações. Esta dificuldade é especialmente pronunciada em regiões próximas ao ponto crítico, onde as composições das duas fases de equilíbrio tornam-se idênticas.

Misturas contendo hidrocarbonetos, água e álcoois exibem um complexo comportamento de fase. Portanto, estes sistemas são particularmente difíceis de serem

modelados, especialmente em regiões críticas. Várias abordagens para modelar os sistemas água-hidrocarboneto-álcool nas condições próximas ao crítico e supercríticas são disponíveis (ABDULKADIROVA e KHOKHLACHEV, 1997).

O trabalho de MERTSLIN *et al.* (1961) refere-se ao equilíbrio líquido-líquido entre água-hexano-etanol. Ao plotar curvas de índice de refração - composição para as fases água-etanol e hexano-etanol, os autores verificaram que na fase aquosa há uma inflexão acentuada próxima ao índice de refração 1,3650, e para concentrações baixas de etanol as curvas elevam-se bruscamente até o índice de refração 1,3650, tornando-se mais planas e sobem novamente próximo ao ponto crítico. As curvas para a fase hexano não apresentam inflexões, indicando que há peculiaridades envolvendo o sistema água-etanol. A curva correspondência para os índices de refração das fases conjugadas, ou seja, uma curva que mostra a relação entre os índices de refração da água *versus* hexano, também apresenta uma inclinação brusca, indicando evidente interação entre os componentes do sistema binário dominante. A curva correspondência começa nos índices de refração da água e do hexano e termina no ponto crítico ($n = 1,3685$). Os autores relatam que esta inflexão existente na camada água-etanol é encontrada em todos os sistemas estudados anteriormente por eles, mas é especialmente pronunciada no sistema hexano-água-etanol.

BUENO (1990) desenvolveu outro estudo de equilíbrio líquido-líquido entre água-etanol-solvente orgânico (benzeno, hexano e ciclohexano) a 25° C, 35° C e 45° C. Através do exame de capacitação de remoção de água, verificou que as percentagens de água nos azeótropos ternários de água-etanol-benzeno (7,4% em peso a 64,86° C) e água-etanol-ciclohexano (4,8% ou 7% em peso a 62,1° C e 62,6° C, respectivamente) são próximas, enquanto que no sistema água-etanol-hexano, essa percentagem é menor (3% em peso a 56° C), mostrando que o hexano apresenta menor capacidade de solubilização de água.

Para obter dados experimentais confiáveis e reprodutíveis, vários tempos de agitação e decantação foram testados até que a composição de equilíbrio de cada componente em cada fase não diferiram entre si pelo valor correspondente ao desvio padrão tolerado pela técnica cromatográfica empregada. Os tempos de agitação e de decantação foram estabelecidos em 12 horas e 5 horas, respectivamente. Para MORIYOSHI *et al.* (1988), que estudaram o mesmo sistema, esses valores foram de 8 horas e 2 horas.

Houve dificuldades experimentais na faixa de concentração referente ao ponto crítico, pois neste caso as densidades das duas fases tornam-se praticamente idênticas dificultando a separação das fases. Os dados experimentais de BUENO (1990) para o equilíbrio líquido-líquido de água-etanol-hexano concordam com os de Vorob'eva e Karapet'yants (1966), citados por BUENO (1990) e MORIYOSHI *et al.* (1988).

2.6 Sistema Água-Álcool-Hidrocarboneto

Como neste trabalho, o objetivo principal é estudar a partição do colesterol no sistema água-álcool-hidrocarboneto, procurou-se obter o maior número possível de trabalhos que fornecessem dados e diagramas de equilíbrio envolvendo este tipo de sistema.

A Figura 2.3 representa dois diagramas de equilíbrio entre água-etanol-hexano a 25° C (MORIYOSHI *et al.*, 1988).

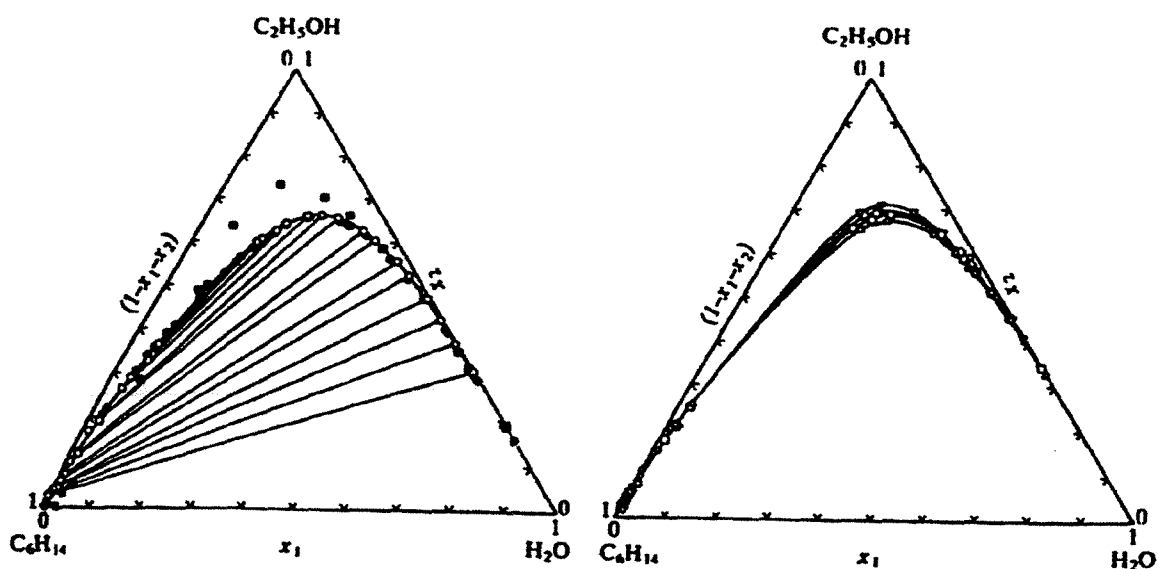


Figura 2.3: Sistema Água-Etanol-Hexano a 25° C (MORIYOSHI *et al.*, 1988)

No primeiro diagrama, compara-se as frações molares medidas a 0,1 MPa com os dados de solubilidade e linhas de amarração de outros autores. O efeito da pressão, que variou de 50 a 200 MPa, sobre as curvas binodais é mostrado no segundo diagrama, podendo-se observar que a imiscibilidade da região bifásica aumenta ligeiramente com o aumento da pressão. Nota-se também que a dissolução do etanol promovida pela pressão é

mais pronunciada na fase aquosa do que na fase orgânica, enquanto as solubilidades mútuas entre água e hexano são pouco afetadas.

Vários outros exemplos de diagramas de equilíbrio líquido-líquido são apresentados no Apêndice A.

NOVÁK *et al.* (1987), indicam através dos diagramas apresentados na Figura 2.4 as diferenças entre os sistemas contendo água, álcool (metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol e n-butanol) e hexano. A coluna central apresenta os diagramas ternários entre água-hidrocarboneto-álcool, enquanto os gráficos posicionados nas colunas laterais indicam a relação de $G_{11}(x_1)$ referentes aos sub-sistemas binários formados por água-álcool e hexano-álcool. Como citado na Secção 2.5, a Figura 2.4, mostra que quanto menor o valor de $(G_{11})_{x_0}$, menos ideal será do sistema binário e maior será a região heterogênea do diagrama ternário, e vê-se também que, as linhas de amarração são inclinadas para o sub-sistema menos ideal.

Pode-se observar que o tamanho da região heterogênea decresce na seguinte ordem metanol>etanol>propanol, sofrendo um novo aumento no sistema contendo 1-butanol. Com exceção dos binários água-1-butanol e hexano-metanol, todos os demais sub-sistemas são binários homogêneos. O sistema água + metanol é quase ideal, sendo o sistema com maior valor de $(G_{11})_{x_0}$. Para os sistemas formados com os outros álcoois, os valores de $(G_{11})_{x_0}$ para ambos os sub-sistemas binários homogêneos são menores e comparáveis em módulo.

NOVÁK *et al.* (1987) também fazem uma observação a respeito dos sistemas contendo 1-propanol e 2-propanol.

O sistema binário 1-propanol + água é ligeiramente menos ideal do que o sistema 1-propanol + n-hexano. No entanto, a inclinação das linhas de amarração é muito maior do que no sistema contendo 2-propanol, onde as diferenças dos valores de $(G_{11})_{x_0}$ entre os sub-sistemas homogêneos são maiores. Este comportamento pode ser explicado pela assimetria das solubilidades mútuas de água e n-hexano. A solubilidade do n-hexano em água é 40 vezes menor do que a solubilidade de água em n-hexano e assim a maior não-idealidade no comportamento do sistema pode ser observada na vizinhança da água pura. Deste modo, a inclinação da linha de amarração é maior do que corresponderia à diferença em $(G_{11})_{x_0}$. No sistema contendo 2-propanol, este fato compensa o efeito das diferenças

em $(G_{11})_{x_0}$ dos dois sistemas homogêneos e as linhas de amarração são apenas ligeiramente inclinadas em direção ao sistema binário 2-propanol + n-hexano, onde o conteúdo de álcool é maior. Para quantidades menores de álcool, a inclinação das linhas de amarração inverte o sinal e se verifica o efeito solutrópico neste sistema.

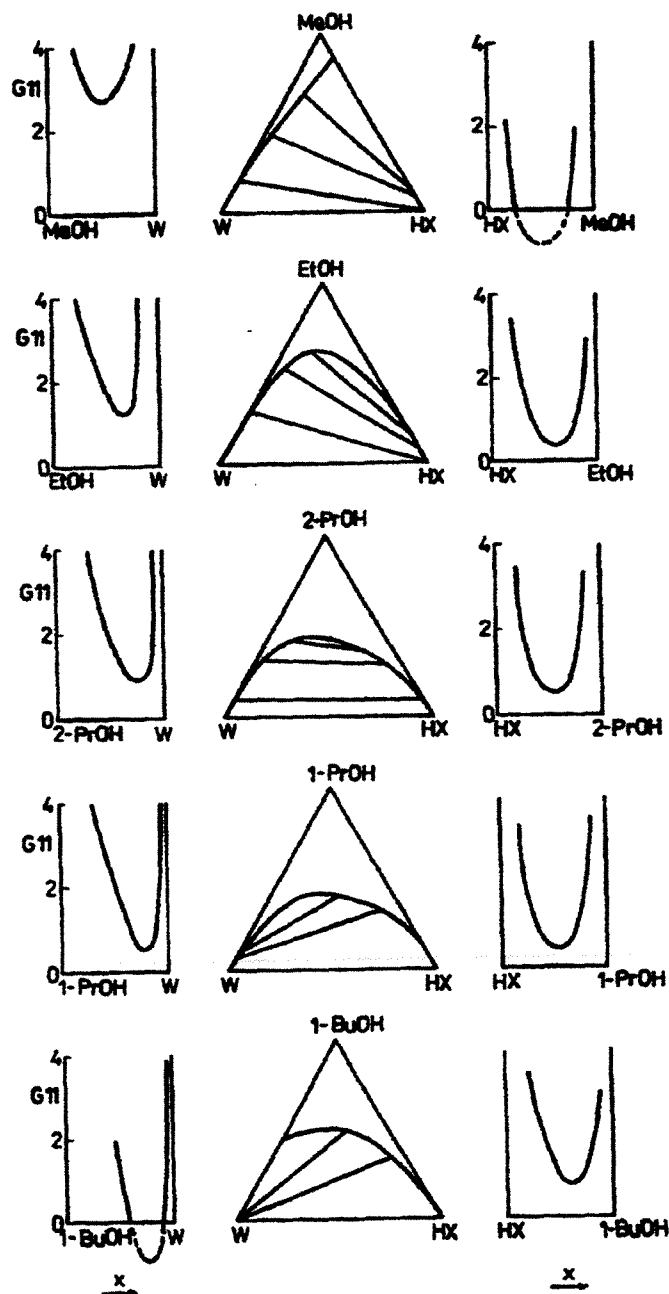


Figura 2.4: Equilíbrio líquido-líquido em sistemas ternários Água + Álcool + Hexano (MeOH = metanol, EtOH = etanol, 1-PrOH = 1-propanol, 2-PrOH = 2-propanol, 1-BuOH = 1-butanol, W = água e HX = hexano) (NOVÁK *et al.*, 1987).

Através do estudo do equilíbrio líquido-líquido para misturas de alanol, 1-hepteno, e água, LETCHER e BRICKNELL (1994) notaram que, com exceção do etanol, metanol e 2-propanol, as misturas ternárias envolvendo álcoois resultam na separação de fases sendo a água praticamente pura.

2.7 Solubilidade

Para melhor entender o comportamento dos componentes de um sistema ternário é preciso ter conhecimento da solubilidade mútua dos mesmos. Pode-se obter informação a respeito em GLASSTONE (1940); HILDEBRAND e SCOTT (1964) e BELOUSOV E PANOV (1994).

A adição de uma substância estranha ao sistema de dois componentes líquidos o torna um sistema de três componentes: as solubilidades mútuas dos líquidos, depende da natureza e da quantidade do 3º componente a ser adicionado. Se o último é solúvel em somente um dos dois líquidos, então as solubilidades mútuas diminuem.

Desvios negativos da lei de Raoult, correspondendo ao aumento de solubilidade, tendem a ocorrer quando os componentes de uma solução apresentam uma atração muito grande uns com os outros. As causas das interações específicas são: polaridade, formação de pontes de hidrogênio e diferenças no caráter positivo e negativo dos componentes.

Como pode ser observado na Tabela 2.1 há um rápido aumento na solubilidade da água em parafinas normais com o aumento do número de carbonos; um pequeno aumento em um isômero normal para um ramificado e um grande aumento em uma parafina para uma olefina correspondente.

Tabela 2.1: Solubilidade de água em hidrocarbonetos, x_2 é a fração molar, a 20° C

	n-C ₄ H ₁₀	n-C ₅ H ₁₂	n-C ₆ H ₁₄	n-C ₇ H ₁₆	n-C ₈ H ₁₈	i-C ₄ H ₁₀	i-C ₅ H ₁₂
10 ⁴ x ₂	2,1	3,6	5,3	7,3	9,0	2,4	3,6

	C ₆ H ₁₂ cicl.	C ₆ H ₆	C ₆ H ₅ CH ₃
10 ⁴ x ₂	4,65	19,0	22,0

	1-C ₄ H ₈	2-C ₄ H ₈	1-C ₇ H ₁₄	1,3-C ₄ H ₆	1,5-C ₆ H ₁₀
10 ⁴ x ₂	12,4	14,0	57,0	19,0	46,0

Fonte: HILDEBRAND e SCOTT, 1964

A energia potencial coesiva da água é devido sobretudo às pontes de hidrogênio, e somente em menor extensão a Forças de London, que são as únicas a atuarem nos hidrocarbonetos. As interações entre uma molécula de água e uma molécula de hidrocarboneto dependem principalmente do dipolo da água na outra molécula e de certa forma da sua polarizabilidade e de sua aproximação. Deste modo, a molécula de água age somente nas porções da molécula de hidrocarboneto mais próximas dela, de forma que a polarizabilidade local, e não a global deve ser o fator determinante. Também, o menor número de átomos de hidrogênio do escudo ao redor de uma dupla ligação permite a molécula de água aproximar-se mais e polarizar a ligação mais efetivamente.

Os volumes de mistura são negativos em todas as misturas de água e não-eletrólitos, ao passo que eles são frequentemente positivos, em sistemas não aquosos. Além disso, os valores absolutos de V^E (volume de excesso) são maiores para sistemas aquosos do que para sistemas não aquosos.

MORRONE (1994) estudou o comportamento do volume de excesso de alcanos e alcanóis e pôde-se verificar as seguintes observações:

▲ Segundo o alcano: notou-se claramente a tendência do volume de excesso em aumentar de magnitude com a esfericidade do alcano, isto é, os sistemas contendo um alcano globular como o ciclohexano apresentaram valores para o volume de excesso maiores que os contendo n-hexano.

▲ Segundo o álcool: Quanto ao número de carbonos dos álcoois, constatou-se que nos sistemas contendo ciclohexano, a tendência é aumentar os valores do volume de excesso conforme aumenta o número de carbonos na cadeia. No entanto, para o n-hexano, esta tendência foi o inverso.

As interações entre as moléculas apolares são compostas principalmente de forças de dispersão de London, que resultam da polarizabilidade das moléculas devido aos movimentos eletrônicos. As forças de dispersão de London dependem somente das distâncias entre as moléculas e apresentam efeito negativo no volume de excesso.

As ligações de hidrogênio são as interações de caráter químico que ocorrem nos álcoois. Quando o álcool puro é progressivamente diluído pelo alcano, as quebras das ligações de hidrogênio tornam-se mais significativas, gerando expansões volumétricas nas soluções.

Os efeitos estruturais, caracterizados principalmente pelas acomodações intersticiais que aumentam com a cadeia do alcano, são mais pronunciados em moléculas lineares, como o n-hexano e geram contribuições negativas no volume excesso.

Na determinação e aperfeiçoamento dos métodos de transesterificação de triglicerídeos, NOTA *et al.* (1998) evitaram a variação nos volumes no momento de contato entre as duas fases, usando solução de n-hexano pré-saturada com metanol e solução de NaOH em metanol pré-saturada com n-hexano.

Dentre os sistemas envolvendo água-álcool-hidrocarboneto, a solubilidade de misturas de etanol-água-hexano foram estudados por BUENO (1990). O sistema etanol-água, sob o ponto de vista termodinâmico é formado por moléculas de características altamente polares. A água possui um momento dipolar de 1,84 Debye e etanol, de 1,66 Debye. Tanto o etanol quanto a água possuem um grupo OH, que formam ligações de hidrogênio, sendo essas ligações muito fortes. Devido a essas ligações fortes, quando puros, o etanol e a água se encontram na forma associada.

Quando em solução, as ligações de hidrogênio que se estabelecem entre as moléculas água-água e etanol-etanol são quebradas para formarem ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e etanol, ou seja, as moléculas de etanol-água se encontram na forma solvatada.

A solubilidade do etanol em água é ilimitada, pois a parte hidrófila do etanol, ou seja, a parte formada pelo grupo OH, constitui uma grande porção da molécula, comparativamente com a parte hidrófoba, isto é, a parte do hidrocarboneto, uma cadeia não muito comprida.

O sistema etanol-água, quando colocado em presença de solvente hidrófobo, apresenta solubilidade limitada, pois são poucas ligações de hidrogênio que se quebram entre as moléculas de etanol e água.

O hexano não apresenta características semelhantes ao etanol e a água quanto à polaridade e capacidade de formação de ligações de hidrogênio. Apesar disso, quando o etanol é colocado em contato com este solvente, a sua parte hidrófoba (grupo etila) se dissolve no solvente orgânico apolar. O mesmo não acontece com a água, que não apresenta grupo orgânico. Quando diluída em excesso em solvente orgânico, a água se apresenta dissociada. Com o aumento da concentração de água, começa a haver associação das moléculas das mesmas, até que se atinja uma concentração tal que é impossível a sua dissolução.

Devido às fortes ligações de hidrogênio e do caráter hidrofóbico dos solventes orgânicos o etanol é preferencialmente dissolvido na fase aquosa.

2.8 Efeito de Eletrólitos

Quando uma substância é dissolvida em água, o arranjo das moléculas próximas ao soluto é diferente daquelas distantes do mesmo. É claro, a alteração da estrutura local induzida pelo soluto depende da natureza da força de interação com a água. Em um líquido simples, ou puro ou mistura, a interação repulsiva entre as moléculas desempenha uma função dominante ao determinar sua distribuição espacial. A força repulsiva entre as moléculas de água não desempenha um papel tão direto em determinar a estrutura, essa estrutura é influenciada localmente pelo tamanho e pela forma da molécula de soluto. Além disso, se o soluto apresenta carga, a combinação de um campo elétrico forte agindo sobre as moléculas de água e as diferenças nas formas e nos tamanhos das moléculas de água e soluto pode produzir uma diferença impressionante entre o arranjo local e o distante, no líquido. Há também uma mudança mais sutil na estrutura de água líquida que estende-se a uma distância do íon (BERRY *et al.*, 1980).

Se eletrólitos são adicionados à água, a solubilidade do composto orgânico pode ser reduzida ainda mais, isto é, ele será *salted-out*, e o processo de extração será facilitado. Isso ocorre porque a variação de entalpia de mistura em uma solução contendo sal é maior do que aquela em água, pois misturas com soluções na presença de sal requerem energia adicional para separar os íons com carga.

CHOU *et al.* (1998) estudando o efeito do sal no equilíbrio líquido-líquido para sistemas parcialmente miscíveis, verificaram que os sais são promotores de estruturas (*structure makers*) no sentido de aumentar a estrutura da água. Portanto, o álcool tende a tornar-se menos solúvel em água e forma-se uma fase líquida mais estável. O efeito de promotores de estruturas poderia ser considerado aplicando o conceito de solvatação, já que o efeito de solvatação foi maior na água do que no álcool.

Os modelos termodinâmicos para as misturas de não-eletrólitos expressam desvios da idealidade que surge das interações de curto alcance (*short-range*). Em soluções de eletrólitos há também as forças eletrostáticas de longo alcance (*long-range*) que leva a desvios significantes do comportamento de solução ideal; estas interações de longo alcance são particularmente importantes para baixas concentrações de sal. O efeito de forças de curto alcance podem ser descritas por teorias "físicas" (tais como Van Laar) e/ou por teorias "químicas" (solvatação dos íons) (ZERRES e PRAUSNITZ, 1994).

Vários trabalhos foram realizados no intuito de analisar o efeito de sal em sistemas ternários, notando que ambos os sais NaCl e KCl, aumentaram a área de região bifásica, e diminuíram as solubilidades mútuas de água e do solvente orgânico (TAN e ARAVINTH, 1999). Para sistemas formados por água, solvente orgânico e etanol, provaram que a adição de sal aumenta a solubilidade de etanol na fase orgânica, pois o sal modifica o equilíbrio de fases do sistema, aumentando o coeficiente de distribuição para o etanol e a seletividade do solvente, à medida que a massa de sal aumenta (OLAYA *et al.*, 1997 e MARCILLA *et al.*, 1995).

GOMIS *et al.* (1998) estudaram o efeito do sal sobre o coeficiente de distribuição do etanol em soluções aquosas e verificaram que houve uma mudança na inclinação das linhas de amarração à medida que aumentavam a quantidade de sal. Outro resultado obtido foi o aumento considerável do coeficiente de distribuição com a aumento da quantidade de sal na fase aquosa, porém o aumento do coeficiente de distribuição foi insignificante com relação ao aumento da concentração de etanol.

Apesar de haver vários trabalhos sobre a influência de eletrólitos, em nenhum deles fazia-se referência especificamente ao efeito de bases ou ácidos em equilíbrio líquido-líquido.

2.9 Coeficiente de Partição

Os trabalhos de SANDLER (1989); GLASSTONE (1940) e TREYBAL (1951), são tomados como referência para descrever o conceito de Coeficiente de Partição, como relatado abaixo.

Lei de distribuição: Se a um sistema de duas camadas, composto de dois componentes imiscíveis ou parcialmente imiscíveis, é adicionada uma certa quantidade de uma terceira substância solúvel em ambas as camadas, então, a substância encontra-se distribuída, ou dividida, entre as duas camadas de uma maneira definida. Suponha que C_I e C_{II} são as concentrações nas camadas I (pesada) e II (leve) respectivamente, então, à temperatura constante

$$K_c = \frac{C_{II}}{C_I}, \quad (2.1)$$

sendo que K é constante para soluções diluídas. Esta conclusão constitui a **Lei de Distribuição** ou **Lei de Partição**, e a constante K_c é denominada como Coeficiente de Distribuição ou de Partição.

A distribuição de equilíbrio do soluto é determinado a partir da relação simples de equilíbrio, usando fugacidades, f :

$$\bar{f}_I(T, P, x_I^I) = \bar{f}_I(T, P, x_I^{II}) \quad (2.2)$$

e a restrição de que o número de moles do soluto se conserva: $N_I = N_I^I + N_I^{II}$, onde N_I^i é o número de moles de soluto na fase i . Usando a definição de coeficiente de atividade:

$$\bar{f}_I(T, P, x_I) = x_I \gamma_I(T, P, x_I) f_I^L(T, P) \quad (2.3)$$

Substituindo em (2.2):

$$x_I^I \gamma_I^I(T, P, x_I^I) = x_I^{II} \gamma_I^{II}(T, P, x_I^{II}) \quad (2.4)$$

Rearranjando:

$$\frac{x_I^{II}}{x_I^I} = K_x = \frac{\gamma_I^I(T, P, x_I^I)}{\gamma_I^{II}(T, P, x_I^{II})} \quad (2.5)$$

que estabelece que o coeficiente de distribuição em termos de fração molar do soluto é igual ao inverso da razão dos coeficientes de atividade do soluto nas duas fases. Deste

modo, conhecendo-se o coeficiente de atividade do soluto nas duas fases, pode-se calcular a distribuição do soluto entre as fases, ou, com a informação sobre a distribuição do soluto, pode-se calcular a razão dos coeficientes de atividade do soluto.

As Equações 2.1 a 2.5 são obtidas considerando dois componentes imiscíveis ou parcialmente imiscíveis. Complicações surgem quando os dois solventes são parcialmente miscíveis, pois neste caso, além das equações já mencionadas, tem-se as condições de equilíbrio:

$$\bar{f}_j^I(T, P, x_j^I) = \bar{f}_j^{II}(T, P, x_j^{II}) \quad (2.6)$$

$$x_j^I \gamma_j^I(T, P, x_j^I) = x_j^{II} \gamma_j^{II}(T, P, x_j^{II}) \quad (2.7)$$

$$N_j = N_j^I + N_j^{II} \quad (2.8)$$

aplicadas para cada uma das espécies solventes, que se enumera 2, 3 e assim por diante. Deste modo, para calcular o estado de equilíbrio quando N_2 moles do solvente 2, N_3 moles do solvente 3, etc., são misturados com N_1 moles de soluto, as equações são resolvidas simultaneamente. Esse sistema é difícil de se resolver, primeiro devido à dependência dos coeficientes de atividade em relação às frações molares, que são complexos de se determinar pois estas equações são não-lineares e segundo, porque o número de equações a serem resolvidas é grande mesmo no caso mais simples de um único soluto na mistura de dois solventes parcialmente miscíveis.

A adição de qualquer soluto pode afetar os coeficientes de atividade de todas as espécies numa mistura, o que pode gerar alguns efeitos de interesse. Por exemplo, a adição de um soluto pode aumentar (*salting in*) ou diminuir (*salting out*) a solubilidade mútua dos dois solventes, às vezes ao ponto de que os dois tornam-se completamente miscíveis. Também, a adição de um segundo soluto pode mudar o coeficiente de distribuição do primeiro soluto.

Uma outra consideração envolvida é aquela de que o soluto não afeta a miscibilidade das duas camadas. Apesar das limitações teóricas muitas substâncias obedecem a lei de distribuição de maneira satisfatória, desde que o soluto tenha a mesma massa molecular em ambos os solventes.

Eficiência de extração: É possível deduzir a fórmula que mostra a eficiência a ser esperada pela extração sob dadas condições. Suponha $l \text{ cm}^3$ de uma solução (fase I) contendo w_T gramas de uma substância dissolvida que são repetidamente extraídas com porções frescas de $v \text{ cm}^3$ de um outro solvente (fase II) imiscível no primeiro. Se w_I é a massa do soluto que é extraída pela fase II após o primeiro equilíbrio, então as concentrações são $w_I/v \text{ g/cm}^3$ na fase II e $(w_T - w_I)/l \text{ g/cm}^3$ na fase I, de forma que o coeficiente de distribuição K será dado por:

$$\frac{w_I/v}{(w_T - w_I)/l} = K, \quad \text{portanto: } w_I = w_T \frac{Kv}{Kv + l} \quad (2.9)$$

Após a segunda extração, w_{II} gramas são transferidos para a fase II e a equação correspondente para o coeficiente de distribuição fornece:

$$w_{II} = w_I \frac{Kv}{Kv + l} = w_T \left(\frac{Kv}{Kv + l} \right)^2 \quad (2.10)$$

É evidente que este resultado pode ser generalizado, de forma que após a extração n a massa w_n do soluto que é extraída pela fase II seja:

$$w_n = w_T \left(\frac{Kv}{Kv + l} \right)^n \quad (2.11)$$

Na prática deseja-se fazer w_n o maior possível para uma dada quantidade de líquido extrator. O produto de n e v é constante e demonstra-se que é melhor manter n grande e v pequeno. Isto é, os melhores resultados são obtidos por um número relativamente grande de extrações com pequenas quantidades de solvente.

Quando os dois solventes são parcialmente miscíveis, v e l poderão ter valores diferentes ao longo das sucessivas extrações, e a Equação (2.9) deve ser aplicada, individualmente, para cada contato.

Seletividade: A seletividade de um solvente é um índice de utilidade mais importante do que o simples coeficiente de distribuição da substância consoluta. Por exemplo, a seletividade de um componente B em relação a C é definida como:

$$\beta = \frac{x_{CB}/x_{AB}}{x_{CA}/x_{AA}} \quad (2.12)$$

onde as concentrações são aquelas nas camadas de equilíbrio. Como $x=a/\gamma$, e desde que no equilíbrio $a_{CB} = a_{CA}$ e $a_{AB} = a_{AA}$, então:

$$\beta = \frac{\gamma_{CA}/\gamma_{AA}}{\gamma_{CB}/\gamma_{AB}} \quad (2.13)$$

Consequentemente, este valor pode ser estimado a partir de dados usados na predição da distribuição. Para um processo satisfatório β deve exceder a unidade.

2.10 Partição do Colesterol

Após pesquisar vários dos tópicos necessários para compreender e obter as melhores condições de extração do colesterol resta, então, discutir, em particular, a distribuição deste composto entre a fase aquosa e a orgânica.

Não se encontrou, na literatura, valores do coeficiente de partição do colesterol para os sistemas em estudo. Uma perspectiva da partição do colesterol pode ser deduzida pelo conhecimento da solubilidade de colesterol em vários solventes.

As informações sobre solubilidade de colesterol em diferentes solventes é muito escassa (BAR *et al.*, 1984). Além disso, os trabalhos encontrados citam apenas interações do colesterol com solventes orgânicos e em todos, as quantidades do soluto usadas foram bastante superiores àquelas de interesse para o presente trabalho.

Como pode-se observar pela Figura 2.1, a molécula de colesterol possui um grupo hidroxila e uma dupla ligação, apresentando potencial para interação tanto com solventes polares como aromáticos.

No trabalho de DOMANSKA *et al.* (1994), onde se estudaram a solubilidade de colesterol em hidrocarbonetos, verificou-se um comportamento não-ideal e concluiu-se que o tolueno provou ser melhor solvente do que o benzeno, que por sua vez é melhor que o

ciclohexano. Os autores encontraram diferenças no hábito cristalino, indicando dependência da interação solvente-soluto mesmo sob as mesmas condições de cristalização, uma vez que foram encontrados cristais nas formas de placas ou de agulhas de diferentes tamanhos dependendo do tipo de solvente. Eles alegam que devido ao grupo hidroxila e à ligação de ponte de hidrogênio em uma molécula de colesterol, pode-se considerar que a forma cristalina é ditada pela interação solvente-soluto assim como as condições de cristalização.

BAR *et al.* (1984) pesquisaram a solubilidade de colesterol em solventes polares a várias temperaturas e observaram que todas as curvas sofrem desvios da solubilidade ideal; que a solubilidade aumenta com a temperatura; e que à temperatura constante, a solubilidade diminui com o aumento da polaridade do solvente ou da mistura de solventes. Eles ainda justificam que, nos tipos de soluções estudadas, há interações soluto-soluto (dimerização, oligomerização) e associações soluto-solvente e solvente-solvente, além da formação de cristal-solvato (hidrato, etanolato, metanolato). Estes fatores tornam o sistema difícil de ser analisado.

Pode-se verificar pelo trabalho de FLYNN *et al.* (1979) que a solubilidade do colesterol em álcoois aumenta até o álcool composto de sete carbonos, sendo este efeito pronunciado à temperatura maiores, e segue um perfil imprevisível para os álcoois de cadeia superior a oito carbonos. Ao compararem com os resultados de solubilidade do β -sitosterol, verificaram que os perfis de solubilidade são totalmente diferentes, indicando que o colesterol é único no modo de interagir com os álcoois homólogos e que há outras formas de interações específicas com o solvente.

A presença de uma hidroxila livre obviamente favorece a solubilidade devido ao aumento das interações intermoleculares, porém os álcoois também podem variar a natureza da fase cristalina. Através de análises térmicas (termogramas), verificaram que os cristais formados de soluções alcóolicas saturadas apresentam propriedades diferentes. Por isso, a maior solubilidade de colesterol para álcoois de cadeias intermediárias, pode ser atribuída à presença de hidroxila livre e às modificações na forma de cristal em equilíbrio com a fase saturada.

FOSTER *et al.* (1981) estudaram o tipo de auto-associação do colesterol em clorofórmio (CHCl_3) e tetracloreto de carbono (CCl_4) para determinar como as variações no número e nas posições estereoquímicas dos grupos hidroxilas afetam a interação com colesterol. Como resultado, verificaram que o solvente influencia significativamente a auto-associação do colesterol. Em clorofórmio ocorre ponte de hidrogênio entre o soluto e o solvente, e o modelo de auto-associação é o monômero-dímero. Nenhuma interação de ponte de hidrogênio entre soluto-solvente ocorre em tetracloreto de carbono e observa-se que a auto-associação é mais forte. A associação neste solvente é melhor descrita com o modelo monômero-trímero-hexâmero.

Ainda no trabalho de FOSTER *et al.* (1981) há a indicação de que a interação de sais biliares com colesterol em meios aquosos é muito difícil pela baixa solubilização, e por isso se faz necessário o uso de lecitina contendo eletrólitos como KCl ou NaCl. Isto pode indicar que a presença de eletrólitos em água aumenta a solubilização do colesterol.

GÓRALSKI (2000) estudou as interações de van der Waals entre colesterol e solventes orgânicos de estrutura linear, através de manifestações volumétricas. Encontrou que o aumento no comprimento da cadeia alquila de alcanos aumenta as interações de dispersão solvente-solvente e enfraquece a contribuição das forças de dispersão nas interações colesterol-solvente. Em álcoois, as interações de dispersão de colesterol-solvente aumentam com o aumento da cadeia de alquila do solvente, sendo que este efeito pode ser compensado pela auto-associação do solvente.

A dualidade nas interações do colesterol com solvente e sua capacidade de se formar associações, tornam difícil uma previsão sobre sua partição entre a fase orgânica e aquosa. Mas, nem mesmo em um sistema tricomponente água-hexano-colesterol o coeficiente de partição pode ser considerado suficientemente alto para permitir que se assuma uma extração completa em apenas um estágio de equilíbrio, como utilizado por AL-HASANI *et al.* (1993), por exemplo.

A presença de etanol aumentará a solubilidade na fase aquosa e além disso promoverá a mútua solubilidade entre hexano e água, o que certamente diminuirá o coeficiente de atividade do colesterol na fase aquosa e, com isso, o valor do coeficiente de partição será menor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

- Colesterol, 96% de pureza (CG)- Sigma Chemical Co.;
- 5 α -colestano, 97,7% de pureza (CG) - Sigma Chemical Co.;
- Etanol 96% P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas;
- Etanol absoluto P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas;
- 1-propanol P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas;
- 2-propanol P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas;
- 1-butanol P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas;
- Hexano P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas;
- Ciclohexano P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas;
- Tolueno P.A. Merck S.A. Indústrias Químicas.
- Hidróxido de potássio em lentilhas P.A., 85% de pureza, Merck S.A.;
- Óleos vegetais comerciais;
- Água destilada;

3.2 Materiais

- Cromatógrafo gás-líquido, Varian Star, Série 3400 CX, dotado de integrador e injetor automático;
- Shaker Bath, Lab-Line Instruments, Inc.;
- Provetas de 50 mL, com tampa esmerilhada;
- Balança Analítica, Ohaus;
- Centrífuga Allegra 21R, Beckman;
- Agitador de tubos – Vortex – Phoenix, modelo AP56
- Picnômetros de vidro, 25 mL.

A metodologia adotada tem como referência o trabalho de FENTON e SIM (1991), que aplica a técnica de saponificação direta e quantificação do colesterol por cromatografia gasosa. Na saponificação usou-se o método de BOHAC *et al.* (1988), pelo qual a reação é mantida em uma fase alcóolica a 80°C, durante 15 minutos, seguida da extração dos insaponificáveis com solvente (Secção 3.4).

A fase lipídica foi óleo de girassol, ao qual se incorporou colesterol e padrão interno (5 α -colestano). A determinação das concentrações de equilíbrio foi realizada em provetas. A partição do colesterol entre as fases aquosa e orgânica foi avaliada em quatro diferentes proporções de volume dos componentes água, álcool e hidrocarboneto, conforme especificado na Tabela 3.1

Tabela 3.1: Proporção entre os componentes do equilíbrio água-álcool-hidrocarboneto.

Proporção	Volume de água (mL)	Volume de álcool (mL)	Volume de solvente (mL)
A	5	10	10
B	15	10	10
C	5	20	10
D	5	10	20

A relação de volumes da Proporção A corresponde aos valores mais utilizados na literatura e foi considerada como proporção padrão de referência.

Os solventes hexano, ciclohexano e tolueno foram testados em todas as proporções indicadas na Tabela 3.1 tendo como álcool o etanol. Para os demais álcoois: 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol e metanol os ensaios se basearam apenas na proporção padrão.

A composição das fases conforme Tabela 3.1 foi usada para as várias análises realizadas:

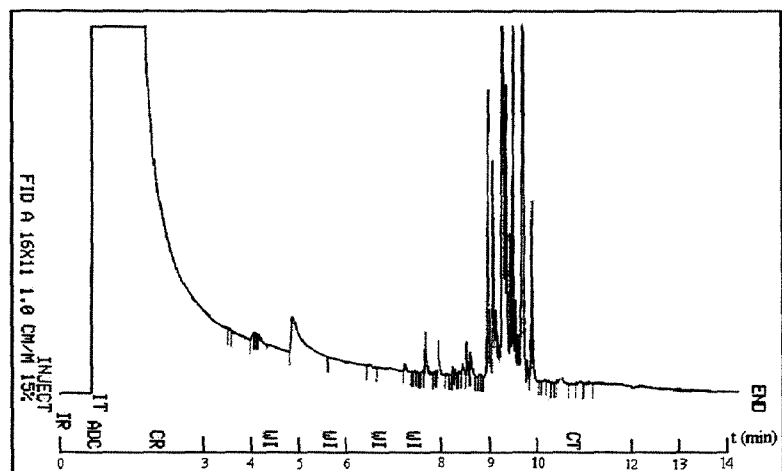
- determinação do coeficiente de partição, através da quantificação do colesterol;
- determinação da densidade das fases aquosa e orgânica;
- determinação da variação de volume, durante os estágios de extração com solvente.

3.3 Preparo da Fase Lipídica

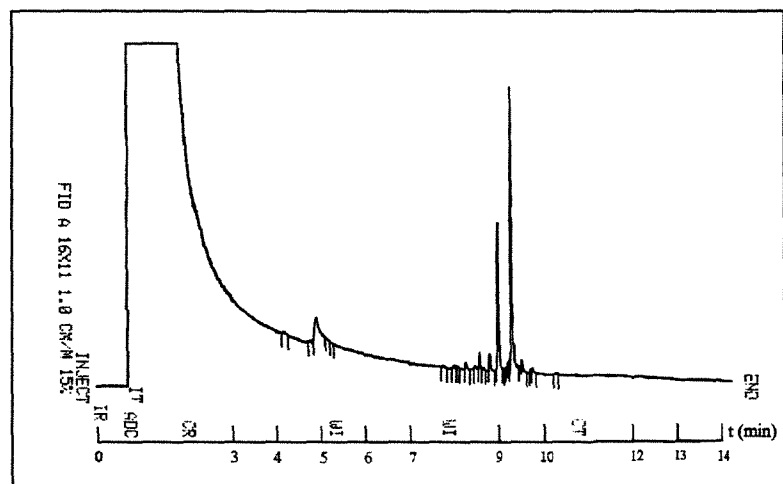
Como material de trabalho, foi usado um óleo vegetal ao qual foi incorporado colesterol e padrão interno.

Para promover a solubilização completa de colesterol e padrão interno em óleo vegetal, esses componentes foram adicionados em quantidade suficiente para poder gerar picos com áreas satisfatórias para permitir uma quantificação precisa nos cromatogramas e, em seguida, levou-se a amostra ao Shaker, durante 24 horas a 150 rpm com temperatura de banho entre 40 e 50°C. Após retirar a amostra do Shaker, centrifugou-se uma alíquota a 22°C e 4000 rpm por 15 min, para confirmar se todos os componentes adicionados foram solubilizados.

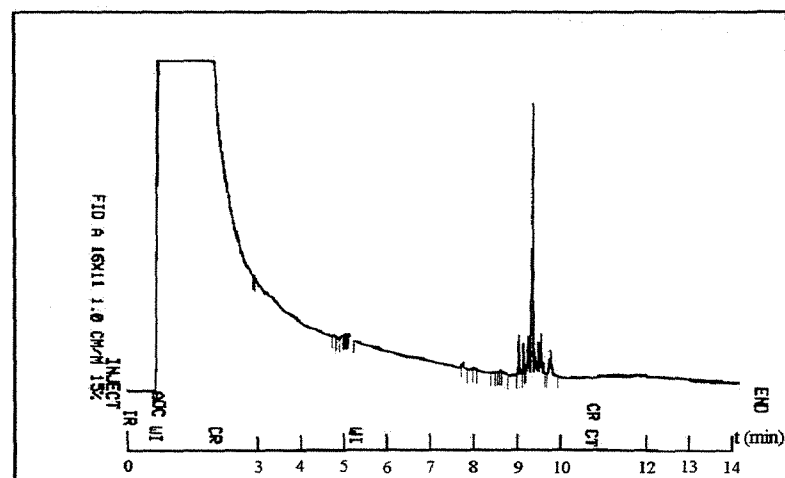
Na escolha do óleo vegetal mais adequado para os ensaios, cinco fontes diferentes (soja, milho, arroz, cânola e girassol) foram avaliados, averiguando-se a existência de possíveis interferentes, cujos cromatogramas apresentassem picos com tempos de retenção iguais ou próximos aos do colesterol ou do padrão interno. Para tanto, seguiu-se o mesmo procedimento de saponificação e de análise (ver Seção 3.4), mas sem a presença de colesterol e de padrão interno. Cromatogramas típicos obtidos estão apresentados na Figura 3.1.



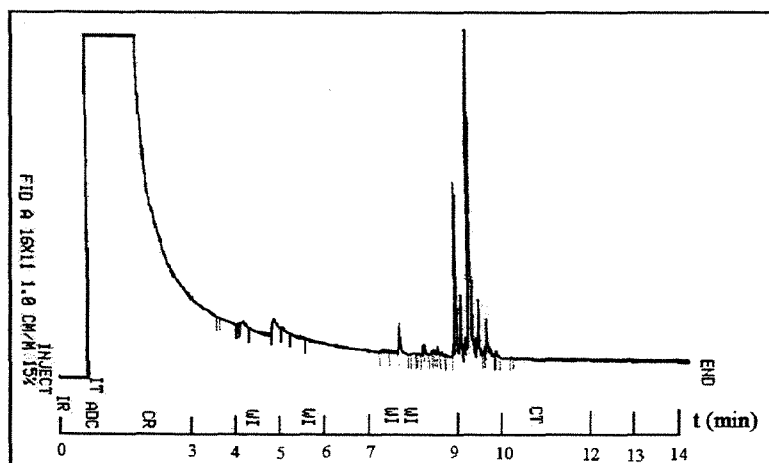
Óleo de Arroz



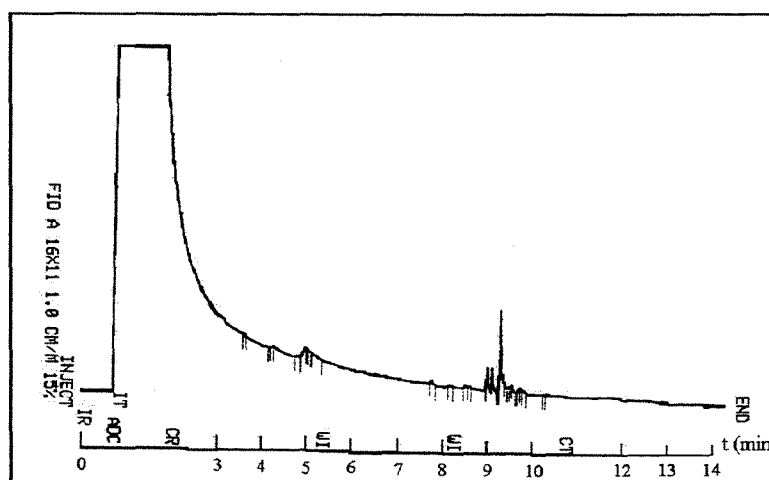
Óleo de cânola



Óleo de girassol



Óleo de milho



Óleo de soja

Figura 3.1 – Cromatograma dos insaponificáveis dos diversos tipos de óleos

Pôde-se verificar que apenas o óleo de girassol não possui outros componentes insaponificáveis que apresentam picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção do colesterol e do 5α -colestano, (na faixa de 8,6 a 8,7 min e 7,69 e 7,75 min, respectivamente).

Uma avaliação de três marcas comerciais de óleo de girassol indica que o produto da marca Ville Premiun Line apresentou o menor número de interferentes, mostrando-se adequada para os ensaios. Esse óleo, contendo 5α -colestano e colesterol, foi denominado de amostra padrão.

A Figura 3.2 apresenta um cromatograma típico, obtido com a saponificação e extração com hexano desse óleo após adição de colesterol e 100 mg/ 50 mL de óleo e 100 mg/50 mL de óleo de 5 α -colestano. Observa-se que a definição dos dois picos é excelente.

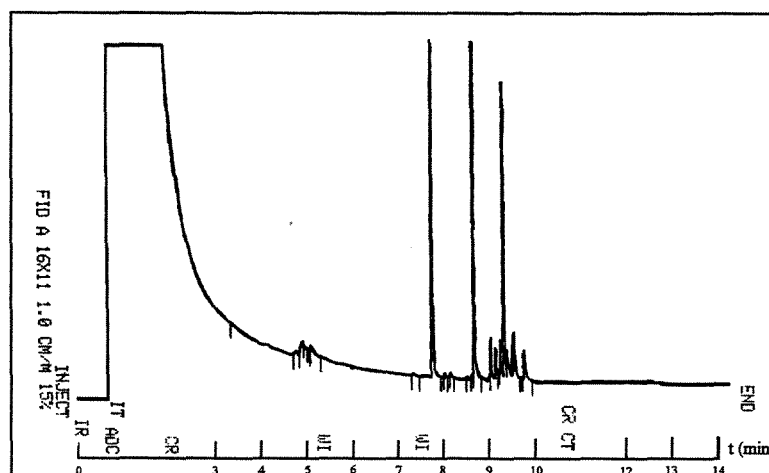


Figura 3.2 – Cromatograma dos insaponificáveis da amostra padrão.

3.4 Saponificação

Em uma proveta de 50 mL, dotada de tampa esmerilhada, foi adicionado 0,3 g de amostra padrão de óleo de girassol e 10 ou 20 mL de solução alcóolica de KOH 12% preparada no dia do ensaio. A proveta, hermeticamente fechada, foi colocada a 80°C por 15 min, em banho termostático para o desenvolvimento da reação de saponificação. A mistura foi então resfriada até próxima à temperatura ambiente, entre 25 e 27°C, simplesmente deixando em repouso na exaustão da capela, e em seguida prosseguiu-se com as etapas de extração.

Durante os ensaios de saponificação e de extração com solução metanólica, verificou-se a formação de uma terceira fase de densidade intermediária e optou-se por realizar a reação usando água saturada com NaCl, como recomendado MARASCHIELLO *et al.* (1996).

3.5 Extração dos Insaponificáveis

Quantidades pré-determinadas de água destilada e de solvente foram adicionadas à mistura resultante da saponificação. Esses volumes foram escolhidos de forma a abranger um apropriado campo de condições de equilíbrio e estão indicados na Tabela 3.1.

A mistura foi submetida ao agitador de tubos à temperatura ambiente e, em seguida, mantida em repouso de maneira a permitir a separação de fases.

O melhor tempo para agitação foi determinado pela avaliação do Coeficiente de Partição para 3 e 5 minutos, e para a decantação verificou-se o tempo mínimo em que o volume de fases aquosa e orgânica não sofria alteração perceptível. Os tempos mais adequados de agitação e decantação foram de 3 minutos e 30 minutos, respectivamente.

A fase orgânica (fase superior) foi recolhida por meio de uma pipeta, mais precisamente pipeta de Pasteur, de forma que a separação fosse completa. A fase aquosa (fase inferior) foi submetida a mais duas extrações com a mesma quantidade de solvente.

A fração extraída foi centrifugada a 22°C e 4000 rpm por 15 min para garantir que nenhuma fração aquosa ou qualquer substância resultante da reação de saponificação estivesse presente na amostra analisada pelo cromatógrafo a gás, uma vez que compostos polares e produtos da saponificação podem danificar a coluna.

Anotou-se os níveis correspondentes ao volume da mistura total e da fase aquosa antes da agitação e após a decantação para observar o comportamento do volume durante a mistura. Pesou-se a fração aquosa antes e após a agitação de cada fração orgânica extraída.

3.6 Cromatografia Gás-Líquido

O cromatógrafo gás-líquido, série 3400 CX Varian, é equipado com um injetor "on-column" do tipo SPI (*Septum Equipped Programmable Injector*) com insersor empacotado com lã de vidro; um Autosampler, série 8200 CX Varian; detector FID (*flame ionization detector*) e uma coluna capilar de sílica-fundida DB-5 de 30 m X 0,25 mm I.D. com 0,1 µm de espessura do filme.

As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes:

- Coluna: temperatura inicial: 150°C
tempo de retenção: 2,0 minutos
temperatura final: 325°C
taxa: 20°C/min
mantida por 3,5 minutos
- Injetor: temperatura inicial: 250°C
tempo de retenção: zero
temperatura final: 340°C
taxa: 10°C/min
mantido por 10 minutos
- Detector: temperatura: 340°C
atenuação: 16, Faixa: 11

O hidrogênio (H₂) foi usado como gás de arraste (*carrier*) com velocidade linear média de 106 cm/s e o volume de injeção adotado foi de 0,5 µL, no modo sanduíche (*Standard Sampling Mode*).

Para a análise de cada fração extraída, usou-se três frascos do Autosampler com seis injeções em cada frasco.

O septo do injetor foi trocado a cada 100 injeções. Para controle da reprodutibilidade do cromatógrafo, preparou-se amostras contendo 100, 200, 500 e 1000 ppm de colesterol que foram analisadas após cada conjunto de quatro condições de equilíbrios. Caso a reprodutibilidade não fosse confirmada, fazia-se a manutenção do sistema. Normalmente, bastava cortar cerca de 5 cm da parte inicial da coluna capilar, conforme recomendado por FENTON e SIM (1991). Em algumas situações trocou-se o insensor.

3.7- Determinação de Densidade das Fases

Determinou-se a densidade das fases aquosas e das fases orgânicas, antes e após o equilíbrio, na presença e ausência de hidróxido de potássio (KOH), sendo avaliados os produtos das três extrações sucessivas no caso do sistema composto por etanol, e apenas a primeira extração para os sistemas com os demais álcoois.

A densidade foi determinada por picnometria à temperatura ambiente, no intuito de verificar a alteração das massas conforme o equilíbrio e também avaliar a influência de hidróxido de potássio na composição de equilíbrio.

Para cada uma das medidas de massa, usou-se três picnômetros e três repetições para cada picnômetro. Utilizou-se 5 vezes os volumes indicados na Tabela 3.1 sendo que a mistura e a separação foram realizadas em erlenmeyers.

A densidade dos reagentes P.A. (solventes e álcoois) também foi medida conforme indicado acima e a densidade da água foi obtida de tabelas, e usada como referência na calibração dos picnômetros. O etanol (95%), utilizado nos ensaios com hexano, foi preparado a partir da diluição de etanol absoluto com água destilada e a densidade determinada para cada amostra preparada. Para os ensaios com ciclohexano e tolueno, foi utilizado o etanol (96%). Nos cálculos da fração de água presente na composição global, foi considerado o volume de água adicionada como pura e o da fração presente no álcool.

Os valores de densidade dos produtos químicos utilizados estão apresentado na Tabela 3.2, com os respectivo desvio-padrão (DP) e peso molecular (PM).

Tabela 3.2: Densidade com desvio-padrão e peso molecular dos componentes puros.

Composto	Densidade (g/mL)	DP	PM (g/gmol)
1-propanol	0,799	0,000	60,10
2-propanol	0,782	0,000	60,10
1-butanol	0,804	0,000	74,12
Etanol (95%)	0,805	0,001	46,07
Etanol (96%)	0,804	0,000	46,07
Hexano	0,657	0,001	86,18
Ciclohexano	0,775	0,000	84,16
Tolueno	0,862	0,001	92,14
Água	0,997	****	18,016

Média de 9 repetições

3.8 Equilíbrio de Fases

O equilíbrio de fases de misturas formadas pelos três componentes básicos (água-álcool-hidrocarboneto) para os sistemas estudados pode ser encontrado na literatura, conforme já mencionado na Revisão Bibliográfica. A fim de uniformizar o tratamento de dados, os valores encontrados na literatura foram ajustados ao Modelo UNIQUAC (SANDLER, 1989 e NOVÁK *et al.* 1987). Os dados da literatura utilizados e os parâmetros de ajuste para cada sistema estão apresentados no Apêndice C.

A análise de equilíbrio de fases, realizada juntamente com a avaliação de variação de volume e de densidade das fases antes e após o equilíbrio, tem o intuito de verificar se o comportamento observado nos ensaios realizados em laboratório, corresponde ao equilíbrio ternário de água-álcool-hidrocarboneto, onde não estão presentes os interferentes comumente encontrados no meio saponificado.

O programa computacional desenvolvido por PESSOA FILHO (1998) foi usado para obter as composições das fases de equilíbrio nos sistemas sem KOH. O programa utiliza os dados de equilíbrio e as constantes do modelo UNIQUAC e fornece a composição de equilíbrio das fases que se formam, a partir da composição da mistura global. A composição fornecida pelo programa foi em termos de fração molar. Para os cálculos da

composição da mistura global em cada contato, utilizou-se os valores de densidade e volume, determinados experimentalmente para cada fase.

3.9- Determinação do Coeficiente de Partição

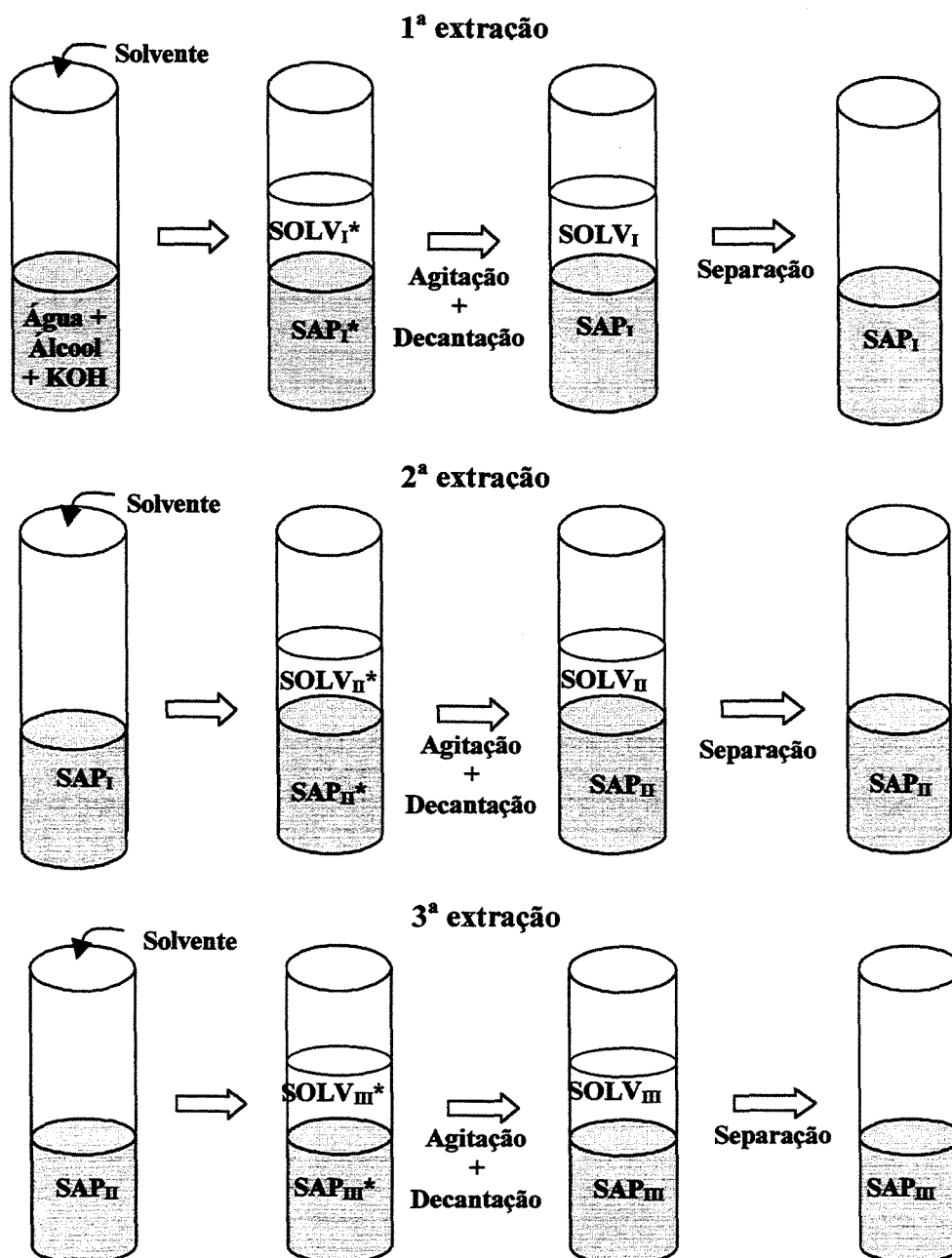


Figura 3.3 – Sequência de contatos de equilíbrio

A Figura 3.3 ilustra a sequência de contatos de equilíbrio, assim como a nomenclatura adotada. SOLV e SAP são os volumes de cada fase. O superescrito * representa o volume da fase antes da agitação. Apenas amostras das fases SOLV_I, SOLV_{II} e SOLV_{III} foram analisadas cromatograficamente.

Para simplificação e clareza, a apresentação a seguir considera apenas a partição do colesterol. As mesmas equações são aplicáveis para o padrão interno.

De acordo com o esquema da Figura 3.3, tem-se três equilíbrios e, em princípio, três coeficientes de partição diferentes. Entretanto, apenas os dois primeiros coeficientes K_I e K_{II}, podem ser calculados, pois não há condições para estimar a concentração do colesterol remanescente em SAP_{III}. Na realidade, ensaios com 4 extrações indicam que a concentração remanescente de colesterol em Sap_{III}*, na maioria das vezes, não era detectável pelo cromatógrafo. Por isso, os cálculos foram baseados na suposição de que todo o colesterol foi extraído com apenas 3 extrações.

Por definição,

$$K_I = \frac{\text{concentração de colesterol em SOLV}_I}{\text{concentração de colesterol em SAP}_I} \quad (3.1)$$

$$K_{II} = \frac{\text{concentração de colesterol em SOLV}_{II}}{\text{concentração de colesterol em SAP}_{II}} \quad (3.2)$$

Em cada coeficiente, o numerador é obtido diretamente pela leitura do cromatograma, enquanto que para o denominador foi necessário um balanço de massa. Desprezando-se a quantidade de colesterol remanescente em SAP_{III}, tem-se que a quantidade de colesterol em SAP_I foi totalmente extraída em SOLV_{II} e SOLV_{III}.

$$K_I = \frac{\frac{\text{massa de colesterol em SOLV}_I}{\text{SOLV}_I}}{\frac{\text{massa de colesterol em (SOLV}_{II} + \text{SOLV}_{III})}{\text{SAP}_I}} \quad (3.3)$$

Pelo mesmo raciocínio, o colesterol contido em SAP_{II} foi extraído por SOLV_{III}:

$$K_{II} = \frac{\frac{\text{massa de colesterol em SOLV}_{II}}{\text{SOLV}_{II}}}{\frac{\text{massa de colesterol em SOLV}_{III}}{\text{SAP}_{II}}} \quad (3.4)$$

A massa de colesterol em uma fase SOLVi é calculada por = C x Área x SOLVi

Onde: Área, corresponde à área do pico calculada pelo integrador do CG.

C é um fator de conversão de área do pico em massa de colesterol e que leva em consideração o volume de amostra de 0,5 µL injetada na coluna. Como as condições do cromatógrafo são mantidas constantes em cada ensaio, C deverá ser o mesmo e, por isso, pode ser compensado durante os cálculos, conforme indicado abaixo:

$$K_I = \frac{\frac{C \times \text{Área}_I \times \text{SOLV}_I}{\text{SOLV}_I}}{\frac{C \times \text{Área}_{II} \times \text{SOLV}_{II} + C \times \text{Área}_{III} \times \text{SOLV}_{III}}{\text{SAP}_I}} \quad (3.5)$$

Simplificando, tem-se:

$$K_I = \frac{\text{Área}_I \times \text{SAP}_I}{\text{Área}_{II} \times \text{SOLV}_{II} + \text{Área}_{III} \times \text{SOLV}_{III}} \quad (3.6)$$

Analogamente para a 2ª extração, chega-se a:

$$K_{II} = \frac{\text{Área}_{II} \times \text{SAP}_{II}}{\text{Área}_{III} \times \text{SOLV}_{III}} \quad (3.7)$$

A porcentagem de recuperação (%Rec) que é dada por:

$$\%Rec_i = \frac{\text{Massa de colesterol em SOLVi}}{\text{Massa de colesterol inicial total}} \times 100 \quad (3.8)$$

Com base nos fatores usados acima, chega-se a:

$$\%Rec_i = \frac{\text{Área}_i}{\sum \text{Áreas das 3 extrações}} \times 100 \quad (3.9)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Equilíbrio e Solubilização dos Componentes

Nesta secção, são apresentados os dados de equilíbrio de fases, de densidade e da variação de volume que são analisados em conjunto para avaliar a solubilidade dos componentes entre si e a influência de substâncias, como o hidróxido de potássio e os compostos resultantes da saponificação, sobre a distribuição de equilíbrio no sistema água-álcool-solvente. Os dados da composição de equilíbrio foram obtidos apenas com os três componentes; os dados experimentais de densidade foram comparados entre sistemas na ausência e na presença de KOH e os dados de variação de volume foram determinados em meio saponificado, ou seja, na presença de todas as substâncias que possam interferir no equilíbrio ternário usado na determinação analítica do colesterol.

As proporções entre os componentes do sistema ternário, indicadas nas tabelas abaixo, são expressas em termos da relação volumétrica : mL de água / mL de álcool ou solução alcóolica de KOH (12%) / mL de solvente, da forma como apresentadas na Tabela 3.1.

4.1.1 Sistema: Água-Solução Etanólica-Hexano

4.1.1.1 Composição de Equilíbrio

Nesta secção são apresentados os dados de composição global da mistura e os de equilíbrio de fases para cada contato de extração, calculados segundo indicado na Secção 3.7. As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam as concentrações do 1º contato entre os componentes água (1), etanol (2) e hexano (3), onde z indica a fração molar da composição global da mistura. As frações molares da composição de equilíbrio foram designadas como x e y para as fases aquosa e orgânica, respectivamente.

Tabela 4.1: Fração molar da composição global da 1ª mistura: água-etanol-hexano

Proporção (1/2/3)	z_1	z_2	z_3
A= 5/10/10	0,5568	0,3038	0,1394
B= 15/10/10	0,7797	0,1510	0,0693
C= 5/20/10	0,4484	0,4487	0,1029
D= 5/10/20	0,4885	0,2667	0,2448

Tabela 4.2: Fração molar da composição das fases após 1º equilíbrio: água-etanol-hexano

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3
A= 5/10/10	0,6494	0,3469	0,0037	0,0011	0,0062	0,9927
B= 15/10/10	0,8370	0,1628	0,0002	0,0036	0,0000	0,9964
C= 5/20/10	0,5131	0,4729	0,0140	0,0016	0,0328	0,9656
D= 5/10/20	0,6504	0,3459	0,0036	0,0011	0,0061	0,9928

Os resultados da Tabela 4.2 quantificam as estimativas de concentração de equilíbrio que se poderia obter pela Figura 2.3 (MORIYOSHI *et al.*, 1988) usando a Regra da Alavanca Invertida. Uma comparação entre as composições das duas fases nas diversas proporções usadas indica que a Proporção A, considerada como a padrão, tem baixas concentrações de etanol e água na fase superior e também muito pouco hexano transferido à

fase aquosa. Conforme sugerido na Seção 2.10, essa situação de equilíbrio é potencialmente mais favorável para uma extração eficiente de colesterol. Outra vantagem dessa proporção, e que deve ser ressaltada, é que o glicerol, um produto da saponificação, é infinitamente solúvel em água e álcool e insolúvel em solvente orgânico, como pode-se verificar pelo Apêndice B. Por isso, se a quantidade de álcool transferida para o hexano, for desprezível, nenhuma fração de glicerol estará no extrato. O mesmo pode ser inferido acerca dos sabões, com relação a solubilidade deles na água arrastada para a fase superior.

Um detalhe interessante é que a duplicação de volume de hexano (Proporção D), uma prática recomendada em algumas extrações, praticamente não altera os valores de equilíbrio.

A relação menos viável é a Proporção C, pois há uma maior solubilidade de hexano na fase aquosa e de etanol na fase orgânica, uma situação inadequada, pois deverá influenciar negativamente no Coeficiente de Partição. Pode-se concluir portanto, que a quantidade de etanol a ser usada na quantificação do colesterol deve ser a mínima possível, suficiente para permitir a saponificação.

Um desenvolvimento interessante foi obtido na Proporção B. Observa-se que o aumento em volume de água produz uma mínima solubilização de hexano em fase aquosa o que é uma situação desejável em termos de extração de colesterol. Infelizmente, entretanto, podem surgir problemas com a seletividade, pois há uma maior transferência de água para a fase orgânica, que poderia arrastar os produtos saponificados para essa fase. Por outro lado, o maior volume de água fez com que todo o etanol permanecesse na fase inferior.

Os valores das Tabelas 4.3 e 4.4 são referentes ao 2º contato de extração.

Tabela 4.3: Fração molar da composição global da 2ª mistura: água-etanol-hexano

Proporção (1/2/3)	z_1	z_2	z_3
A= 5/10/10	0,5704	0,2998	0,1298
B= 15/10/10	0,7797	0,1518	0,0685
C= 5/20/10	0,4748	0,4290	0,0962
D= 5/10/20	0,4960	0,2639	0,2402

Tabela 4.4: Fração molar da composição das fases após o 2º equilíbrio: água-etanol-hexano

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x ₁	x ₂	x ₃	y ₁	y ₂	y ₃
A= 5/10/10	0,6575	0,3392	0,0033	0,0011	0,0055	0,9934
B= 15/10/10	0,8362	0,1636	0,0002	0,0036	0,0000	0,9964
C= 5/20/10	0,5358	0,4527	0,0115	0,0014	0,0261	0,9725
D= 5/10/20	0,6559	0,3407	0,0034	0,0011	0,0056	0,9933

Uma comparação com os valores obtidos para o 1º contato indica pequena, porém perceptível diferença nas concentrações em equilíbrio, exceto para a Proporção C, que permaneceu praticamente inalterada. Pela Tabela 4.4, as frações de etanol e de hexano na fase aquosa são menores do que no 1º equilíbrio, provavelmente por virtude da menor quantidade de etanol na composição global que também diminuiu a solubilidade de hexano em meio aquoso.

Essas mesmas tendências podem ser observadas com relação ao terceiro contato (Tabelas 4.5 e 4.6).

Tabela 4.5: Fração molar da composição global da 3ª mistura: água-etanol-hexano.

Proporção (1/2/3)	z ₁	z ₂	z ₃
A= 5/10/10	0,5684	0,2933	0,1383
B= 15/10/10	0,7792	0,1524	0,0684
C= 5/20/10	0,4848	0,4096	0,1056
D= 5/10/20	0,4973	0,2583	0,2444

Tabela 4.6: Fração molar da composição das fases após 3º equilíbrio: água-etanol-hexano

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x ₁	x ₂	x ₃	y ₁	y ₂	y ₃
A= 5/10/10	0,6615	0,3353	0,0032	0,0011	0,0051	0,9937
B= 15/10/10	0,8356	0,1642	0,0002	0,0035	0,0000	0,9965
C= 5/20/10	0,5512	0,4388	0,0100	0,0014	0,0221	0,9765
D= 5/10/20	0,6611	0,3357	0,0032	0,0011	0,0052	0,9937

De um modo geral, exceto para a Proporção B, a concentração de etanol tende a decrescer nos contatos sucessivos e a concentração de água, na fase hexano tende a permanecer constante.

4.1.1.2) Densidade das Fases

Nas tabelas são mostradas densidades das fases em equilíbrio nas 4 proporções, comparando-se os valores obtidos na presença e na ausência de KOH.

Na determinação da densidade, os desvios padrões encontrados foram satisfatórios e menores que 0,004.

A Tabela 4.7 apresenta a densidade das fases aquosas antes do 1º equilíbrio em todas as proporções usadas (mL de água destilada/mL de solução etanólica). Essa fase aquosa inicial é composta pela mistura da água com a solução etanólica. O etanol usado para dissolver o KOH continha 5% de água.

Tabela 4.7: Densidade média da fase aquosa antes do 1º equilíbrio (etanol – 95%).

Solvente: hexano.

Proporção	SEM KOH		COM KOH	
	Densidades	DP	Densidades	DP
5/10	0,892	0,001	0,945	0,001
15/10	0,946	0,001	0,980	0,001
5/20	0,862	0,001	0,924	0,000
5/10	0,893	0,001	0,946	0,001

Média de 9 repetições

A Tabela 4.8 apresenta os valores de densidade da fase aquosa antes do 1º equilíbrio (ρ_0), após o 1º equilíbrio (ρ_I), o 2º equilíbrio (ρ_{II}), e 3º equilíbrio (ρ_{III}). Todos os valores estão traçados nos gráficos apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2.

Tabela 4.8: Densidade da fase aquosa antes do 1º equilíbrio e após o 1º, o 2º e o 3º equilíbrio. Solvente: hexano.

Proporção (1/2/3)	Na ausência de KOH				Na presença de KOH			
	ρ_0	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}	ρ_0	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}
A= 5/10/10	0,892	0,889	0,891	0,894	0,945	0,948	0,947	0,947
DP	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000
B= 15/10/10	0,946	0,947	0,947	0,948	0,980	0,981	0,981	0,982
DP	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
C= 5/20/10	0,862	0,853	0,851	0,852	0,924	0,904	0,903	0,911
DP	0,001	0,001	0,002	0,004	0,000	0,001	0,002	0,002
D= 5/10/20	0,893	0,893	0,895	0,898	0,946	0,944	0,952	0,956
DP	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001

Média de 9 repetições

A Figura 4.1 apresenta os dados de densidade das fases equilibradas sem o hidróxido de potássio.

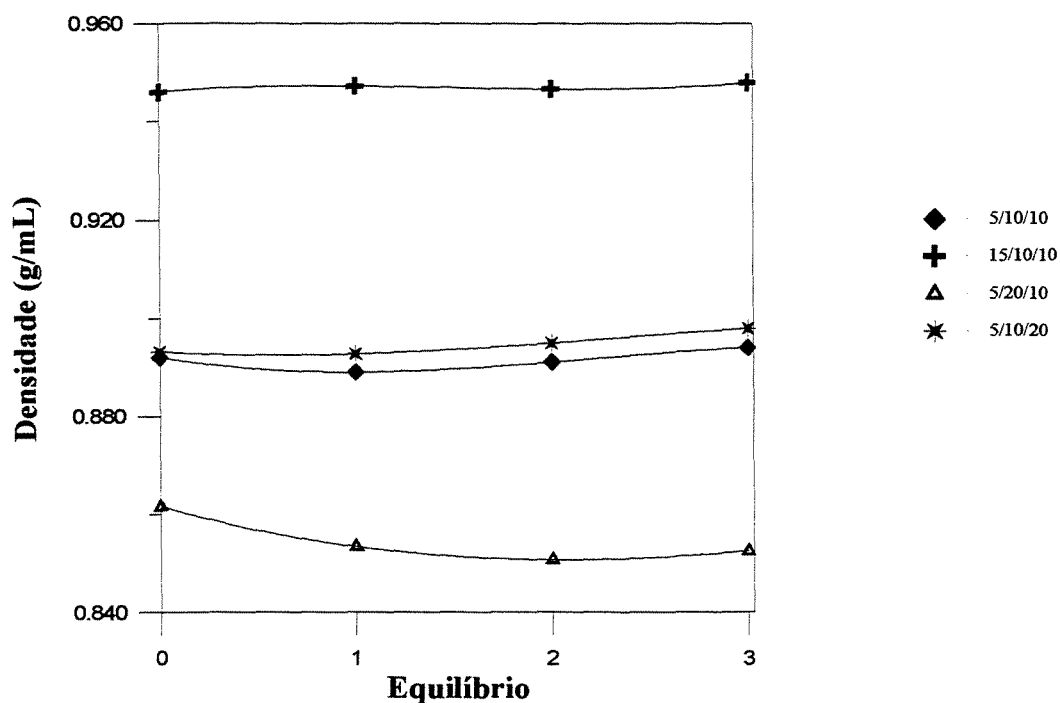


Figura 4.1 – Densidade da fase aquosa sem KOH (água-solução etanólica-hexano)

Pode-se verificar um ligeiro aumento da densidade da fase aquosa nas Proporções A e D. Na Proporção B, a densidade apresenta-se constante ao longo dos três equilíbrios. Para a Proporção C, há uma diminuição da densidade da fase aquosa até o 2º equilíbrio mantendo-se constante no 3º equilíbrio.

A variação de valores da densidade podem ser relacionada com os dados de equilíbrio. As Proporções A e D tem o mesmo comportamento, pois apresentam composições praticamente iguais. O ligeiro decréscimo da densidade no 1º equilíbrio pode ser explicado pela fração de hexano que se solubilizou na fase aquosa, seguido de aumento, que também é previsível pela composição de equilíbrio, pois a fração de água em fase aquosa tende a aumentar. Na Proporção B a densidade é praticamente constante porque a fração de hexano que se solubilizou em água é desprezível, assim como as variações das frações de água e etanol. Para a Proporção C, nota-se uma diminuição mais acentuada da densidade comparada às demais proporções, pois é o ensaio onde ocorre maior solubilização de hexano, cujas frações ficam em torno de 0,0140 para o 1º equilíbrio, 0,0115 para o 2º equilíbrio e 0,0100 para o 3º equilíbrio.

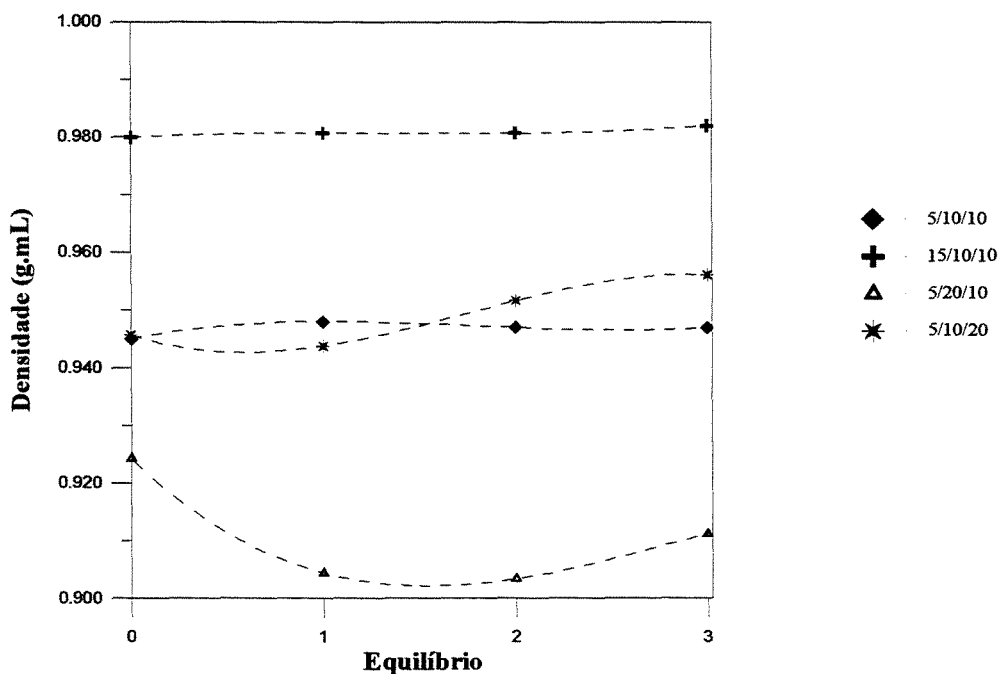


Figura 4.2 – Densidade da fase aquosa com KOH

De modo geral, o efeito do KOH foi o de acentuar as variações de densidade que ocorrem ao se estabelecer o equilíbrio ternário.

A Tabela 4.9 apresenta os valores de densidade da fase orgânica após o 1º equilíbrio (ρ_I), o 2º equilíbrio (ρ_{II}), e 3º equilíbrio (ρ_{III}).

Tabela 4.9: Densidade da fase orgânica após o 1º, 2º e 3º equilíbrio. Solvente: hexano.

Proporção	Na ausência de KOH			Na presença de KOH		
	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}
A= 5/10/10	0,658	0,658	0,658	0,660	0,659	0,661
DP	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	0,000
B= 15/10/10	0,656	0,657	0,658	0,656	0,658	0,659
DP	0,000	0,001	0,000	0,002	0,002	0,001
C= 5/20/10	0,660	0,660	0,659	0,663	0,662	0,662
DP	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000
D= 5/10/20	0,657	0,658	0,657	0,659	0,659	0,661
DP	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Média de 9 repetições

Observa-se que a densidade da fase orgânica sofreu pouca variação e, exceto na Proporção C, que tem a maior proporcionalidade de etanol, ela é muito próxima à densidade do hexano puro, igual a 0,657 g/mL (ver Tabela 3.2).

Uma avaliação preliminar indica que o KOH exerce certa influência na composição de equilíbrio, pois a densidade média da fase superior obtida quando se usa KOH é ligeiramente maior do que sem o KOH, indicando que ele provavelmente se enriqueceu em etanol. Uma avaliação mais rigorosa, entretanto, indica que esse efeito deve ser muito menor do que sugerido pelos trabalhos com sais, indicados no Capítulo 2. Isto pode ser inferido pela comparação entre o comportamento com e sem KOH nas misturas de Proporção B e C.

A Proporção B tem o maior volume relativo de água, que dilue o KOH e domina a distribuição. Não há variação nas densidades da fase aquosa e da fase superior, antes e depois da mistura, indicando que, nessa situação, o KOH não exerce efeito perceptível de *salting out* sobre o álcool.

A Proporção C tem o maior volume de etanol e, conseqüentemente, de KOH. Há considerável variação na densidade da fase inferior, e da fase superior antes e após a 1ª mistura. Entretanto, estatisticamente, a diferença entre a densidade da fase leve com e sem KOH é insignificante, indicando novamente, que o KOH não exerceu influência no equilíbrio.

Na prática analítica, a quantidade de KOH remanescente, após a saponificação é ligeiramente menor que a utilizada nas determinações da densidade. Usando 0,3 g de lipídios na Proporção A, por exemplo, apenas 5,5% de KOH é consumido na reação.

4.1.1.3) Variação de Volume das Fases na Mistura

Durante os ensaios de extração e equilíbrio, nos quais se saponificou amostras de óleo de girassol, anotou-se o volume de cada fase, antes e após o contato e calculou-se o valor médio da leitura dos volumes e seu respectivo desvio-padrão e as diferenças entre o volume medido antes e após o equilíbrio. Os valores correspondem a duas ou até quatro repetições, dependendo do número de ensaios de equilíbrio realizados. Para o sistema água, solução etanólica e hexano, o maior desvio-padrão foi de 0,35.

As Tabelas 4.10 e 4.11 referem-se ao volume (em mL) da fase aquosa e as Tabelas 4.12 e 4.13 correspondem ao volume (em mL) da fase orgânica.

Quando se usou hexano, o volume total das fases sempre correspondeu à soma dos volumes individuais que foram colocados em contato, mas o volume de cada fase sofreu alterações. A observação mais importante diz respeito ao aumento do volume da fase aquosa após o 1º equilíbrio e, sobretudo, a uma diminuição da fase orgânica.

Na maioria dos casos, após o 2º contato de equilíbrio, houve pequena diminuição do volume da fase aquosa, e ligeiro aumento do volume da fase hexano. Essa variação de volume pode induzir a um erro de cerca de 3% na determinação analítica do colesterol, pois os métodos recomendados consideram que o volume da fase superior é igual ao de hexano adicionado. Um forma de contornar essa discrepância é usar como solvente, a fase hexano saturada com álcool na proporção desejada, como foi sugerido por *NOTA et al.* (1998).

Tabela 4.10: Volume da fase aquosa antes e após o equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-hexano

Proporção (1/2/3)	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}
A= 5/10/10	15,20	15,47	15,15	15,50	15,17	15,00
DP	0,00	0,15	0,10	0,14	0,05	0,16
B= 15/10/10	24,75	24,95	24,90	24,95	24,90	24,85
DP	0,21	0,21	0,14	0,21	0,14	0,21
C= 5/20/10	25,25	27,35	26,85	27,45	26,85	26,3
DP	0,35	0,21	0,21	0,21	0,21	0,28
D= 5/10/20	15,25	15,30	14,80	15,35	14,85	14,35
DP	0,07	0,14	0,14	0,07	0,07	0,07

Média de 2 a 4 repetições

Tabela 4.11: Diferença de volume da fase aquosa após e antes do equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-hexano

Proporção (1/2/3)	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{III}
A= 5/10/10	0,30	-0,30	-0,15
B= 15/10/10	0,20	-0,05	-0,05
C= 5/20/10	2,20	-0,5	-0,55
D= 5/10/20	0,10	-0,45	-0,45

Tabela 4.12: Volume da fase orgânica antes e após o equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-hexano

Proporção (1/2/3)	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}
A= 5/10/10	10,00	10,12	10,15	9,65	10,42	10,30
DP	0,00	0,10	0,06	0,07	0,13	0,14
B= 15/10/10	10,05	10,2	10,10	9,85	10,15	10,15
DP	0,07	0,00	0,00	0,07	0,21	0,07
C= 5/20/10	10,00	10,2	10,10	7,70	10,7	10,65
DP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
D= 5/10/20	19,95	20,15	20,10	19,85	20,5	20,55
DP	0,07	0,07	0,14	0,07	0,14	0,07

Média de 2 a 4 repetições

Tabela 4.13: Diferença de volume da fase orgânica após e antes do equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-hexano

Proporção (1/2/3)	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{III}
A= 5/10/10	-0,35	0,30	0,15
B= 15/10/10	-0,20	-0,05	0,05
C= 5/20/10	-2,30	0,50	0,55
D= 5/10/20	-0,10	0,35	0,45

A variação da densidade da fase aquosa com KOH (Figura 4.2) correlaciona-se com a variação de volume. Na Proporção A, há um aumento de volume da fase aquosa juntamente com a diminuição da densidade da fase aquosa, podendo ser causado por uma solubilidade do hexano em água. No 2º e no 3º equilíbrio, o volume da fase aquosa sofre decréscimos e a densidade aumenta em relação ao valor obtido no equilíbrio anterior, provavelmente pela passagem de etanol para a fase orgânica.

As menores variações de volume são verificadas para a Proporção B, cuja densidade da fase aquosa permaneceu praticamente constante, com poucas flutuações e as maiores alterações ocorrem na Proporção C, tanto no volume como para a densidade.

A variação de volume da fase hexano entretanto, não é somente atribuível à variação de composição, pois a transferência de volume de etanol para a fase orgânica é maior do que a contra difusão de volume de hexano, saindo desta fase. A variação de volume observada é bem definida, e ocorreu em todos os ensaios. Ela é muito superior ao máximo erro de leitura e é confirmada pelos valores de densidade da fase superior que, segundo a Tabela 4.9, apresenta um valor médio inferior ao de hexano puro, na Proporção B. É possível, portanto, que uma interação entre as moléculas, conforme indicado na Secção 2.7, promova essa contração.

4.1.2 Sistema: Água-Solução Etanólica-Ciclohexano

4.1.2.1) Composição de Equilíbrio

A composição global e das fases em equilíbrio no sistema ternário água (1), etanol (2) e ciclohexano (3) para o 1º contato de equilíbrio são apresentados nas Tabelas 4.14 e 4.15; para o 2º contato de equilíbrio, nas Tabelas 4.16 e 4.17; e para o 3º contato de equilíbrio, nas Tabelas 4.18 e 4.19.

Tabela 4.14: Fração molar da composição global da 1ª mistura: água-etanol-ciclohexano.

Proporção (1/2/3)	z_1	z_2	z_3
A= 5/10/10	0,5352	0,3000	0,1648
B= 15/10/10	0,7665	0,1507	0,0828
C= 5/20/10	0,4291	0,4479	0,1230
D= 5/10/20	0,4594	0,2575	0,2831

Tabela 4.15: Fração molar da composição de fases após o 1º equilíbrio: água-etanol-ciclohexano

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x ₁	x ₂	x ₃	y ₁	y ₂	y ₃
A= 5/10/10	0,6677	0,3247	0,0076	0,0022	0,0342	0,9636
B= 15/10/10	0,8439	0,1553	0,0007	0,0010	0,0090	0,9900
C= 5/20/10	0,5235	0,4493	0,0271	0,0042	0,0705	0,9253
D= 5/10/20	0,6758	0,3172	0,0070	0,0022	0,0326	0,9652

Tabela 4.16: Fração molar da composição global da 2ª mistura: água-etanol-ciclohexano.

Proporção (1/2/3)	x ₁	x ₂	x ₃
A= 5/10/10	0,5663	0,2753	0,1584
B= 15/10/10	0,7769	0,1429	0,0802
C= 5/20/10	0,4660	0,4000	0,1340
D= 5/10/20	0,4976	0,2335	0,2689

Tabela 4.17: Fração molar da composição de fases após o 2º equilíbrio: água-etanol-ciclohexano.

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃
A= 5/10/10	0,6966	0,2978	0,0056	0,0020	0,0287	0,9693
B= 15/10/10	0,8522	0,1471	0,0006	0,0009	0,0082	0,9908
C= 5/20/10	0,5708	0,4106	0,0186	0,0035	0,0568	0,9397
D= 5/10/20	0,7098	0,2854	0,0048	0,0019	0,0264	0,9717

Tabela 4.18: Fração molar da composição global da 3ª mistura: água-etanol-ciclohexano.

Proporção (1/2/3)	z ₁	z ₂	z ₃
A= 5/10/10	0,5914	0,2528	0,1558
B= 15/10/10	0,7849	0,1355	0,0796
C= 5/20/10	0,5098	0,3668	0,1234
D= 5/10/20	0,5225	0,2102	0,2673

Tabela 4.19: Fração molar da composição de fases após o 3º equilíbrio: água-etanol-ciclohexano.

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃
A= 5/10/10	0,7216	0,2742	0,0042	0,0018	0,0244	0,9738
B= 15/10/10	0,8599	0,1396	0,0005	0,0009	0,0076	0,9915
C= 5/20/10	0,6105	0,3763	0,0132	0,0029	0,0467	0,9504
D= 5/10/20	0,7384	0,2582	0,0034	0,0016	0,0218	0,9766

De uma maneira global, o sistema com ciclohexano apresenta as mesmas tendências gerais observadas com o hexano, confirmando assim os resultados de HARTMAN *et al.* (1994). Numa análise mais detalhada, surgem sensíveis diferenças que devem ser salientadas. Apesar das mesmas proporções em volume, a fração molar de ciclohexano na 1ª mistura (Tabela 4.14) é consideravelmente maior do que no sistema com hexano (Tabela 4.1), pois seu peso molecular é menor e sua densidade maior.

Comparando as composições de equilíbrio pelas Tabelas 4.15, 4.17 e 4.19 com as correspondentes da Secção 4.1.1, observa-se que a fase orgânica contém quantidade maior de etanol no sistema com ciclohexano do que com hexano. Como consequência, há uma diminuição do conteúdo de etanol na composição global das misturas nos contatos subsequentes. Isto fez com que as frações de etanol e ciclohexano diminuam na fase aquosa e as frações de etanol e água também diminuam na fase orgânica na sequência de equilíbrios. Esse comportamento é observado em todas as proporções.

As solubilidades mútuas deste sistema ternário são maiores do que no sistema formado por água, etanol e hexano. Para o ciclohexano, a Proporção B que tem a menor solubilidade de solvente em fase aquosa e a menor solubilidade de água e álcool em fase orgânica tem, portanto, a maior potencialidade para extração de colesterol.

A menor solubilização de água pelo hexano, também foi observada no trabalho de BUENO (1990) através do exame de capacitação de remoção de água, verificando que o hexano possui menor capacidade de solubilização do que o benzeno e o ciclohexano. Segundo THOMPSON e MEROLA (1993) isto apresenta vantagens na eliminação das

etapas de lavagem da fase superior, uma vez que o álcali não é removido com os insaponificáveis.

No caso do hexano, por exemplo, a solubilidade é menor porque, as moléculas de água e do hidrocarboneto possuem menor contato, e portanto menor polarização do que é observado em ciclohexano.

4.1.2.2) Densidade das Fases

A Tabela 4.20 apresenta a densidade das fases aquosas antes do 1º equilíbrio em todas as proporções usadas (mL de água/ mL de solução etanólica), lembrando que o etanol usado neste sistema foi 96% P.A.. Os desvios-padrões obtidos na determinação de densidade para o sistema água, solução etanólica e ciclohexano foram inferiores a 0,003.

Tabela 4.20: Densidade média da fase aquosa antes do 1º equilíbrio (etanol – 96%).

Solvente: ciclohexano.

Proporção (1/2/3)	SEM KOH		COM KOH	
	Densidades	DP	Densidades	DP
A= 5/10/10	0,893	0,001	0,947	0,001
B= 15/10/10	0,946	0,000	0,978	0,003
C= 5/20/10	0,860	0,002	0,923	0,002
D= 5/10/20	0,893	0,000	0,946	0,001

Média de 9 repetições

A Tabela 4.21 apresenta os valores de densidade da fase aquosa antes e após cada estágio de equilíbrio, juntamente com os valores de desvio-padrão.

Tabela 4.21 : Densidade da fase aquosa antes do 1º equilíbrio e após o 1º, 2º e 3º equilíbrio.

Solvente: ciclohexano.

	Na ausência de KOH				Na presença de KOH			
Proporção (1/2/3)	ρ_0	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}	ρ_0	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}
A= 5/10/10	0,893	0,892	0,892	0,891	0,947	0,942	0,942	0,945
DP	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000
B= 15/10/10	0,946	0,948	0,946	0,946	0,978	0,982	0,979	0,981
DP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
C= 5/20/10	0,860	0,853	0,853	0,853	0,923	0,908	0,907	0,909
DP	0,002	0,000	0,000	0,001	0,002	0,001	0,000	0,001
D= 5/10/20	0,893	0,891	0,893	0,895	0,946	0,945	0,948	0,947
DP	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001

Média de 9 repetições

Os gráficos apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4 são construídos a partir dos dados da Tabela 4.21.

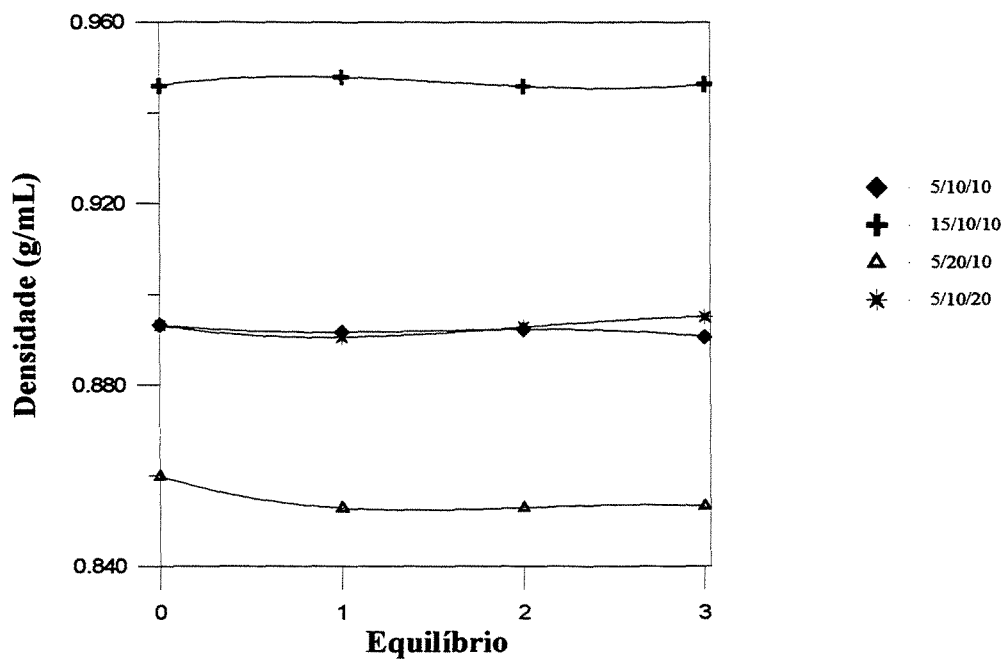


Figura 4.3 – Densidade da fase aquosa sem KOH

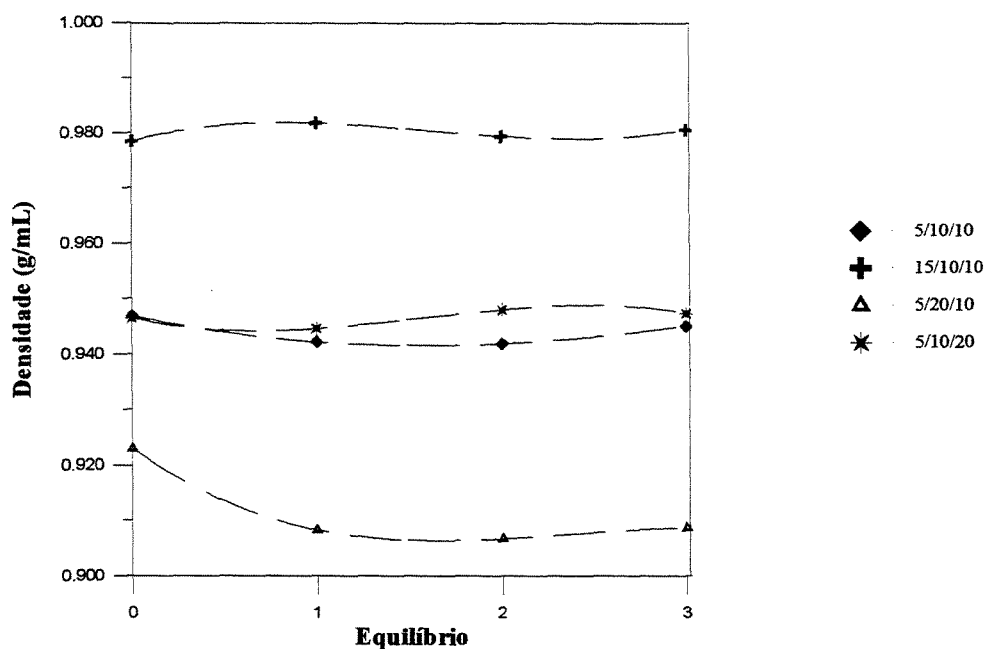


Figura 4.4 – Densidade da fase aquosa com KOH

Uma comparação entre as curvas das Figuras 4.3 e 4.4 e das Figuras 4.1 e 4.2 (com hexano) indica um comportamento idêntico entre os dois sistemas. Em ambos os casos há uma correlação entre a variação de densidade e o conteúdo de solvente na fase aquosa.

A Tabela 4.22 apresenta os dados de densidade da fase orgânica após cada estágio de equilíbrio, juntamente com os valores de desvio-padrão.

Como as densidades do ciclohexano e do etanol são próximas, não se observou variações deste valor nas sucessivas extrações, nem mesmo na Proporção C, que envolve uma maior transferência de etanol. Em diversas situações também se detectou o aparente paradoxo já encontrado com hexano, isto é, fases superiores com média das densidade menor do que a do ciclohexano puro igual a 0,775 g/mL (ver Tabela 3.2).

Tabela 4.22: Densidade da fase orgânica após o 1º, 2º e 3º equilíbrio.

Solvente: ciclohexano.

Proporção (1/2/3)	Na ausência de KOH			Na presença de KOH		
	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}
A= 5/10/10	0,774	0,773	0,772	0,774	0,773	0,773
DP	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000
B= 15/10/10	0,774	0,774	0,784*	0,775	0,772	0,773
DP	0,002	0,001	0,000	0,002	0,001	0,000
C= 5/20/10	0,773	0,773	0,773	0,774	0,773	0,773
DP	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001	0,000
D= 5/10/20	0,774	0,774	0,774	0,774	0,773	0,774
DP	0,002	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000

*separação incompleta das fases (fase turva)

Média de 9 repetições

Ao comparar os resultados da densidade na presença e na ausência de KOH, vê-se pela Tabela 4.22 que não ocorrem alterações significantes, confirmando deste modo, como com hexano, que o KOH deve ter uma influência muito pequena na distribuição de equilíbrio. Durante os ensaios experimentais, a presença do KOH, entretanto, nesse sistema ternário influenciou de modo a facilitar a separação de fases, pois com o eletrólito não houve formação de fase turva na Proporção B.

4.1.2.3) Variação de Volume das Fases na Mistura

O volume antes e após contato das fases no sistema água, solução etanólica e ciclohexano foi determinado de modo igual ao do sistema hexano.

As Tabelas 4.23 e 4.24 correspondem ao volume da fase aquosa e as Tabelas 4.25 e 4.26 correspondem ao volume da fase orgânica.

Tabela 4.23: Volume da fase aquosa antes e após o equilíbrio: água-solução etanólica de KOH (12%)-ciclohexano

Proporção (1/2/3)	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}
A= 5/10/10	15,30	15,83	15,47	15,90	15,50	15,20
DP	0,10	0,12	0,15	0,10	0,17	0,10
B= 15/10/10	24,85	25,25	25,15	25,20	25,20	25,10
DP	0,07	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00
C= 5/20/10	25,25	28,35	27,75	28,40	27,75	27,20
DP	0,35	0,50	0,35	0,57	0,35	0,42
D= 5/10/20	15,35	15,80	15,10	15,80	15,15	14,65
DP	0,07	0,00	0,14	0,00	0,21	0,21

Média de 2 a 4 repetições

Tabela 4.24: Diferença de volume da fase aquosa após e antes do equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-ciclohexano

Proporção (1/2/3)	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{III}
A= 5/10/10	0,60	-0,33	-0,27
B= 15/10/10	0,35	-0,05	-0,05
C= 5/20/10	3,15	-0,6	-0,55
D= 5/10/20	0,45	-0,65	-0,45

Tabela 4.25: Volume da fase orgânica antes e após o equilíbrio água-solução etanólica com KOH (12%)-ciclohexano

Proporção (1/2/3)	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}
A= 5/10/10	9,90	10,00	10,07	9,33	10,33	10,4
DP	0,00	0,10	0,12	0,06	0,12	0,10
B= 15/10/10	9,95	10,25	10,15	9,6	10,3	10,2
DP	0,07	0,07	0,07	0,14	0,00	0,00
C= 5/20/10	9,95	9,95	10,00	6,85	10,60	10,55
DP	0,07	0,07	0,00	0,04	0,01	0,07
D= 5/10/20	20,00	20,05	20,15	19,55	20,75	20,6
DP	0,00	0,07	0,07	0,07	0,21	0,14

Média de 2 a 4 repetições

Tabela 4.26: Diferença de volume da fase orgânica após e antes do equilíbrio água- solução etanólica com KOH (12%) -ciclohexano

Proporção (1/2/3)	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{III}
A= 5/10/10	-0,57	0,33	0,33
B= 15/10/10	-0,35	0,05	0,05
C= 5/20/10	-3,10	0,65	0,55
D= 5/10/20	-0,45	0,70	0,45

Avaliando os valores das Tabelas 4.23 a 4.26, e comparando-se com os resultados dos ensaios realizados com hexano, nota-se a mesma sequência de contrações e dilatação no volume antes e após o equilíbrio, porém a variação é maior quando se usou o ciclohexano como solvente. Isto pode ser decorrente da composição de equilíbrio de fases, onde se pode notar que o etanol possui maior afinidade pelo ciclohexano do que com o hexano, mas também foi encontrado por MORRONE (1994) que determinou um volume de excesso para ciclohexano maior do que para o hexano.

4.1.3 Sistema: Água-Solução Etanólica-Tolueno

4.1.3.1) Composição de Equilíbrio

As composições globais e de equilíbrio de fases para o sistema ternário água (1), etanol (2) e tolueno (3) para o 1º contato de equilíbrio são apresentadas nas Tabelas 4.27 e 4.28; para o 2º equilíbrio nas Tabelas 4.29 e 4.30, e para o 3º equilíbrio nas Tabelas 4.31 e 4.32.

As composições global e de fases não puderam ser calculadas para a Proporção C, pois durante os ensaios para saponificação do óleo não houve separação de fases, formando um sistema homogêneo. Por isso, não foi possível determinar as frações molares nas etapas seguintes, pois se faz necessário o conhecimento do volume e da densidade da fase aquosa após o equilíbrio, como indicado na Seção 3.8.

Tabela 4.27: Fração molar da composição global da 1ª mistura: água-etanol-tolueno

Proporção (1/2/3)	z_1	z_2	z_3
A= 5/10/10	0,5336	0,2992	0,1672
B= 15/10/10	0,7655	0,1505	0,0840
C= 5/20/10	0,4281	0,4470	0,1249
D= 5/10/20	0,4573	0,2564	0,2863

Tabela 4.28: Fração molar da composição das fases após o 1º equilíbrio: água-etanol-tolueno.

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3
A= 5/10/10	0,7289	0,2628	0,0083	0,0231	0,0899	0,8870
B= 15/10/10	0,8611	0,1368	0,0021	0,0136	0,0277	0,9587
C= 5/20/10	0,6223	0,3575	0,0202	0,0370	0,1654	0,7976
D= 5/10/20	0,7451	0,2477	0,0071	0,0215	0,0803	0,8982

Tabela 4.29: Fração molar da composição global da 2ª mistura: água-etanol-tolueno

Proporção (1/2/3)	z_1	z_2	z_3
A= 5/10/10	0,6154	0,2214	0,1632
B= 15/10/10	0,7920	0,1259	0,0821
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO		
D= 5/10/20	0,5933	0,1967	0,2100

Tabela 4.30: Fração molar da composição das fases após o 2º equilíbrio: água-etanol-tolueno

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3
A= 5/10/10	0,7924	0,2031	0,0045	0,0176	0,0554	0,9270
B= 15/10/10	0,8824	0,1160	0,0016	0,0127	0,0211	0,9662
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO					
D= 5/10/20	0,8072	0,1890	0,0038	0,0166	0,0486	0,9348

Tabela 4.31: Fração molar da composição global da 3ª mistura: água-etanol-tolueno

Proporção (1/2/3)	z_1	z_2	z_3
A= 5/10/10	0,6632	0,1700	0,1668
B= 15/10/10	0,8126	0,1068	0,0806
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO		
D= 5/10/20	0,6438	0,1513	0,2049

Tabela 4.32: Fração molar da composição das fases após o 3º equilíbrio: água-etanol-tolueno.

Proporção (1/2/3)	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3
A= 5/10/10	0,8356	0,1616	0,0028	0,0149	0,0368	0,9483
B= 15/10/10	0,8992	0,0995	0,0013	0,0121	0,0165	0,9714
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO					
D= 5/10/20	0,8478	0,1498	0,0024	0,0142	0,0323	0,9535

Em relação aos contatos de equilíbrio realizados com hexano e ciclohexano, o sistema composto por água, etanol, e tolueno mostrou uma maior variação das frações molares em cada etapa de equilíbrio, principalmente em relação a solubilização de água e etanol na fase orgânica assim como uma maior solubilidade de tolueno em fase aquosa. Isto indica que entre os três solventes utilizados (tolueno, ciclohexano e hexano), o tolueno leva a formação de um sistema onde a miscibilidade mútua entre os componentes é maior.

O comportamento entre os equilíbrios, segue o do hexano e do o ciclohexano, ou seja, as frações de etanol e tolueno em fase aquosa tendem a diminuir a cada equilíbrio e as frações de água e etanol tendem a diminuir em fase orgânica.

4.1.3.2) Densidade das Fases

Inicialmente compôs-se a fase aquosa, com água, etanol (96%) e KOH. Os valores de densidade da fase aquosa antes do equilíbrio já foram apresentados na Tabela 4.20 (etanol – 96%).

A Tabela 4.33 apresenta os valores de densidade para a fase aquosa antes e após cada estágio de equilíbrio com tolueno, e foram usados para construir os gráficos mostrados nas Figuras 4.5 e 4.6.

Tabela 4.33: Densidade da fase aquosa antes do 1º equilíbrio e após o 1º, 2º e 3º equilíbrio. Solvente: tolueno.

Proporção (1/2/3)	Na ausência de KOH				Na presença de KOH			
	ρ_0	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}	ρ_0	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}
A= 5/10/10	0,893	0,893	0,899	0,904	0,947	0,954	0,977	1,005
DP	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000
B= 15/10/10	0,946	0,945	0,948	0,949	0,978	0,981	0,983	0,987
DP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
C= 5/20/10	0,860	0,860	0,861	0,866	0,923	0,908	0,928	1,007
DP	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001	0,000	0,002
D= 5/10/20	0,893	0,898	0,910	0,922	0,946	0,973	1,019	1,057
DP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000

Média de 9 repetições

A miscibilidade das fases é crítica na Proporção C. Embora, ao contrário do que aconteceu na determinação de volume de produtos após a saponificação, houve separação de fases. O volume da fase orgânica obtido é ínfimo, sendo necessário usar quantidades muito grandes de solvente para se obter volume suficiente para as medidas por picnometria, na 1ª extração.

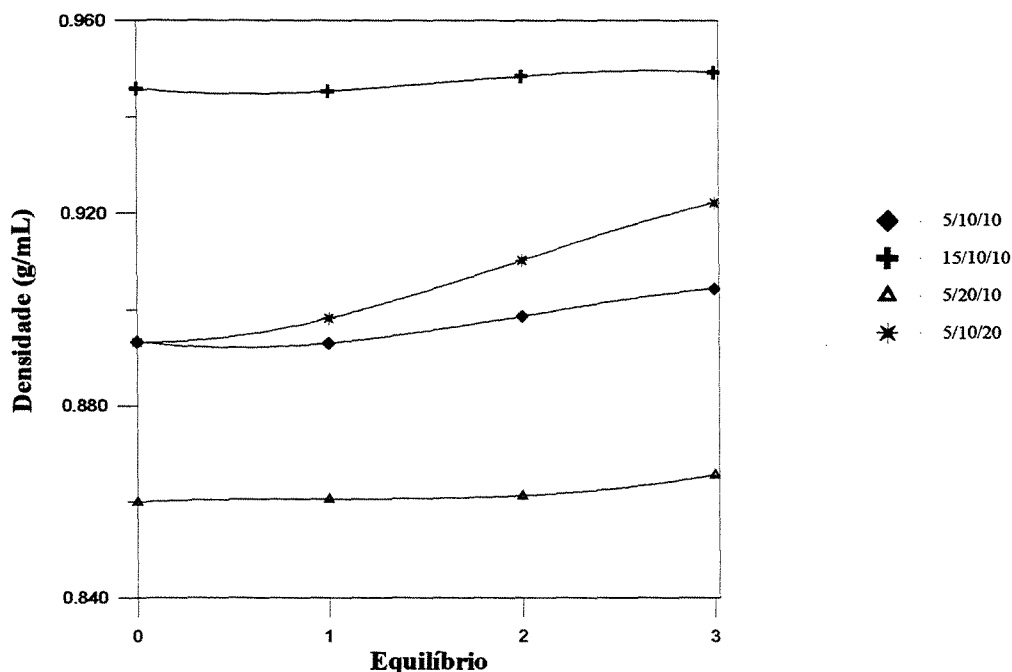


Figura 4.5 – Densidade da fase aquosa sem KOH

A Figura 4.5 indica que os valores de densidade estão de acordo com a variação observada na composição de equilíbrio de fases, isto é, a tendência da fase aquosa de exaurir seu conteúdo de etanol ao longo dos sucessivos contatos concentrando-se em KOH. Isto faz com que a densidade da fase aquosa aumente na seqüência de equilíbrios, o que não aconteceu com os sistemas na presença de hexano e ciclohexano. Observa-se também que a densidade do tolueno (0,862 g/mL) é maior do que a densidade dos outros dois solventes e do etanol (ver Tabela 3.2).

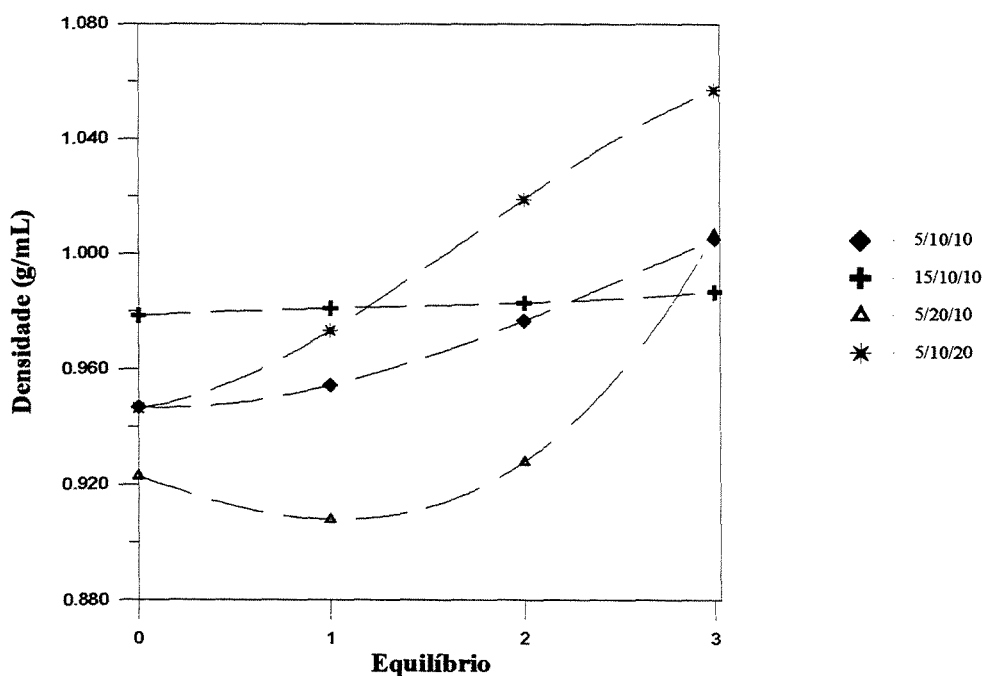


Figura 4.6 – Densidade da fase aquosa com KOH

O efeito do KOH sobre a densidade foi surpreendente. Na Proporção B, a densidade não sofre alteração nenhuma. Mas para as Proporções A e D, a densidade sofreu aumento considerável. Isto indica que o KOH promove uma maior expulsão do etanol da fase aquosa, sobretudo na situação D, que contém maior quantidade de tolueno, sendo esse efeito mais evidente do que nos sistemas compostos por hexano e ciclohexano.

O decréscimo da densidade da fase aquosa na Proporção C, pode ser justificado pela solubilização de tolueno em água, gerando um volume da fase orgânica inferior ao do tolueno adicionado. Assim como nas Proporções A e D, o conseqüente aumento ocorre, provavelmente, pela expulsão de tolueno e etanol.

A Tabela 4.34 apresenta os dados de densidade para a fase orgânica após cada estágio de equilíbrio. Observa-se que em todas as situações nas quais a densidade pode ser medida com confiança, a densidade é menor do que a do tolueno puro, indicando que a fase se enriqueceu com etanol.

Na presença de KOH, as Proporções A e D diminuem um pouco sua densidade em relação ao equilíbrio sem KOH, confirmando uma maior solubilização de etanol. Esse decréscimo é maior para o sistema de Proporção C, confirmando ser a condição de maior solubilidade mútua entre as fases aquosa e orgânica.

Tabela 4.34: Densidade da fase orgânica após o 1º, 2º e 3º equilíbrio. Solvente: tolueno.

Proporção (1/2/3)	Na ausência de KOH			Na presença de KOH		
	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}	ρ_I	ρ_{II}	ρ_{III}
A= 5/10/10	0,856	0,856	0,857	0,851	0,852	0,854
DP	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
B= 15/10/10	0,859	0,873*	0,860*	0,858	0,858	0,860
DP	0,001	0,019	0,000	0,000	0,001	0,000
C= 5/20/10	0,855*	0,854	0,853	0,850	0,850	0,850
DP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
D= 5/10/20	0,856	0,858	0,860	0,852	0,855	0,858
DP	0,000	0,002	0,000	0,001	0,001	0,000

*Separação incompleta das fases (fase turva)

Média de 9 repetições

4.1.3.3) Variação de Volume das Fases na Mistura

Ao contrário do que aconteceu nos sistemas com hexano e ciclohexano, no sistema de fases que usa tolueno como solvente, observou-se que houve variação do volume total antes e após o equilíbrio. Os valores estão apresentados na Tabela 4.35.

Como já foi mencionado anteriormente, nos ensaios de saponificação o sistema água, solução etanólica de KOH (12%) e tolueno correspondente à Proporção C, formaram uma mistura homogênea, não havendo separação de fases.

Tabela 4.35: Volume total antes e após o equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-tolueno

Proporção (1/2/3)	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	V _{TI}	V _{TII}	V _{TIII}	V _{TI}	V _{TII}	V _{TIII}
A= 5/10/10	25,40	25,50	23,40	25,30	25,03	23,20
DP	0,41	0,36	0,57	0,10	0,48	0,28
B= 15/10/10	35,50	35,70	35,30	34,83	35,17	35,00
DP	0,25	0,36	0,36	0,28	0,35	0,20
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO					
D= 5/10/20	35,50	33,35	29,95	35,35	33,40	29,95
DP	0,43	0,07	0,35	0,07	0,00	0,21

Média de 2 a 4 repetições

Pela Tabela 4.35, nota-se que os volumes totais apresentam um comportamento não ideal com uma dilatação do volume logo após a adição do tolueno à mistura de água e etanol, seguida de uma contração após a agitação e decantação, sofrendo pouca alteração ou nenhuma no último estágio de contato. Isto parece indicar que o sistema tem um comportamento não ideal mais pronunciado do que os outros dois sistemas estudados, nos quais o volume total permanecia constante durante as etapas de extração.

As Tabelas 4.36 e 4.37 referem-se ao volume da fase aquosa e as Tabelas 4.38 e 4.39 apresentam volumes da fase tolueno.

Tabela 4.36: Volume da fase aquosa antes e após o equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-tolueno

	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
Proporção (1/2/3)	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}
A= 5/10/10	15,23	15,05	12,23	15,00	12,55	10,35
DP	0,25	0,21	0,05	0,41	0,63	0,52
B= 15/10/10	24,67	24,87	24,43	25,10	24,63	24,30
DP	0,32	0,32	0,40	0,35	0,47	0,36
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO					
D= 5/10/20	15,00	12,55	9,20	15,00	9,80	7,50
DP	0,00	0,35	0,18	0,00	0,40	0,11

Média de 2 a 4 repetições

Tabela 4.37: Diferença de volume da fase aquosa após e antes do equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-tolueno

Proporção (1/2/3)	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{III}
A= 5/10/10	-0,23	-2,50	-1,88
B= 15/10/10	0,43	-0,24	-0,13
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO		
D= 5/10/20	0,00	-2,75	-1,70

Tabela 4.38: Volume da fase orgânica antes e após o equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-tolueno

Proporção (1/2/3)	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}
A= 5/10/10	10,70	10,25	10,60	10,3	12,40	12,03
DP	0,14	0,07	0,14	0,36	0,42	0,15
B= 15/10/10	10,80	10,80	10,87	9,73	10,53	10,47
DP	0,14	0,28	0,15	0,06	0,15	0,11
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO					
D= 5/10/20	20,50	20,80	21,00	20,35	23,60	22,60
DP	0,42	0,42	0,32	0,07	0,40	0,23

Média de 2 a 4 repetições

Tabela 4.39: Diferença de volume da fase orgânica após e antes do equilíbrio água-solução etanólica de KOH (12%)-tolueno

Proporção (1/2/3)	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{III}
A= 5/10/10	-0,40	2,15	1,43
B= 15/10/10	-1,07	-0,27	-0,40
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO		
D= 5/10/20	-1,72	-0,34	-0,50

Devido à considerável variação do volume total, torna-se difícil relacionar os resultados de densidade e composição com as alterações de volume da fase orgânica. O volume da fase aquosa diminuiu em todas as etapas de extração, enquanto o volume da fase orgânica aumenta apenas na Proporção A. A diminuição do volume da fase aquosa pode ser atribuída à expulsão de etanol para a fase superior.

4.1.4 Sistemas com Metanol

Complementando o estudo, procedeu-se a ensaios com hexano como solvente nos quais o etanol foi substituído por outros álcoois. Por ter sido utilizado por alguns pesquisadores (PARKIS e ADDIS, 1986 e MARSCHIELLO *et al.*, 1996), o metanol foi o primeiro a ser avaliado.

Visto que o colesterol apresenta baixa solubilidade em meios muito polares (BAR *et al.*, 1984), o metanol seria um álcool viável, pois promoveria a expulsão do colesterol para a fase superior e apolar. E como pode-se observar pela Figura 2.4, o metanol é muito pouco solúvel em hexano, sendo o único sub-sistema binário álcool-hexano, heterogêneo. Isso evitaria problemas de arraste de compostos orgânicos saponificáveis pela fase hexano como deve ocorrer com 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol.

No entanto, na avaliação do metanol como álcool usado para saponificação, os resultados obtidos foram semelhantes aos verificados por HARTMAN *et al.* (1994), que identificaram a formação de uma fase intermediária entre a fase orgânica e a fase aquosa, sendo ligeiramente turva dependendo da proporção dos componentes usados no equilíbrio. Além disso, outros fatores negativos foram observados durante a reação de saponificação, como a formação de partículas suspensas na solução de óleo saponificado, mas que se solubilizavam após a adição de água e a perda de material saponificado. Com relação a esse último detalhe, constatou-se que nas mesmas condições de reação (15 minutos a 80° C) usando provetas com tampa esmerilhada, houve perda de até 2 mL de amostra saponificada. Nos ensaios equivalentes com etanol não foi registrada nenhuma perda.

Nas Proporções A e D, o volume da fase intermediária atingiu valores próximos a 6 mL e 9 mL, respectivamente. Nos sistemas correspondentes às Proporções B e C, a fase intermediária, tinha volumes inferiores, cerca de 2,3 mL e 0,5 mL respectivamente, mas aparentava-se ser mais viscosa.

Adotando a sugestão de MARASCHIELLO *et al.* (1996) que substituiu a água destilada por solução de NaCl saturada, houve uma formação mais intensa de emulsão. Em todas as proporções de metanol, água saturada com NaCl e hexano, formou-se uma suspensão logo após a adição de solução aquosa ao meio saponificado com KOH (12%).

Houve a formação de um precipitado de cor leitosa. Após a adição do hexano, esse precipitado formou uma fase intermediária esbranquiçada, criando um sistema trifásico, com interfaces bem definidas.

Para sistemas com metanol, vários autores indicam o uso de éter etílico na extração. Como esclarecido no trabalho de PARK e ADDIS (1986), entretanto, a extração usando este solvente exige sucessivas lavagens com água destilada, o que não se enquadraria na metodologia simplificada definida no presente trabalho.

4.1.5 Sistemas com Propanol e Butanol

Os álcoois 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol têm sido utilizados na saponificação de gorduras, e seu uso na análise de colesterol foi avaliado, apenas com hexano como solvente.

4.1.5.1) Composição de Equilíbrio

Para esses sistemas, apenas a Proporção A foi utilizada.

As Tabelas 4.40 e 4.41, apresentam as composições globais e a de equilíbrio de fases para os três álcoois: 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol, calculado pelo Modelo UNIQUAC. Nessas tabelas, o índice 2 representa o álcool correspondente.

Tabela 4.40: Fração molar da composição global da 1ª mistura. Proporção A: 5/10/10

Álcool	z_1	z_2	z_3
1-propanol	0,5693	0,2739	0,1568
2-propanol	0,5729	0,2693	0,1578
1-butanol	0,6201	0,2091	0,1708

Tabela 4.41: Fração molar da composição de fases após o 1º equilíbrio. Proporção A:

5/10/10

	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
Álcool	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃
1-propanol	0,9352	0,0628	0,0019	0,0550	0,1631	0,7819
2-propanol	0,8540	0,1438	0,0022	0,0314	0,1305	0,8381
1-butanol	0,9932	0,0068	0,0000	0,0201	0,1460	0,8339

Uma análise dos valores das Tabelas 4.40 e 4.41, indica que as solubilidades dos álcoois 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol são significativamente maiores em hexano do que a solubilidade de etanol no mesmo solvente (Tabela 4.2). Esse fato é ainda mais significativo em termos de massa se considerar o maior peso molecular desses álcoois. Dentre os três, o mais solúvel na fase orgânica é o 1-propanol, com uma solubilidade cerca de três vezes superior a do etanol. Essa maior concentração de álcool na fase orgânica influi na solubilização da água nessa fase.

O 1-butanol também se mostrou muito solúvel na fase hexano, concentrando-se nela. A baixa concentração de 1-butanol na fase aquosa não permitiu que o hexano se solubilizasse na mesma. Dentre todas as situações estudadas, o sistema com 1-butanol produziu a fase aquosa mais pura, o que, sob o ponto de vista da partição de colesterol, é extremamente favorável à extração pela fase hexano. Infelizmente, entretanto, a seletividade tende a ser baixa, pois parte dos produtos solúveis em água também poderão ser solubilizados pela fase hexano, rica em água e álcool.

4.1.5.2)- Densidade das Fases

Nos sistemas que empregam propanol e butanol, observa-se uma grande contração de volume da fase aquosa, devido à transferência desses álcoois para a fase hexano. Como a determinação de densidade exige considerável volume de líquido, optou-se por limitar essa determinação à 1ª extração.

A solubilidade mútua entre 1-butanol e água é limitada. Ao se compor a solução aquosa (5 mL de água, 10 mL de 1-butanol), ocorreu a formação de duas fases, uma rica em água e a outra em 1-butanol. A mistura de ambos foi utilizada no contato com hexano, produzindo-se duas novas fases, uma rica em água e outra rica em hexano.

Quando a solução aquosa inicial continha KOH, a separação das fases foi melhor definida, devido ao efeito *salting out*, e houve formação de duas fases nas soluções aquosas de todos os álcoois.

Esta observação dos sistemas binários aquosos corresponde à avaliação de NOVÁK, *et al.* (1987), que afirmam que o sistema binário 1-propanol + água é apenas ligeiramente menos ideal do que o sistema 2-propanol + água, formando mesmo assim um binário homogêneo. Pela Figura 2.4, nota-se que o único sistema álcool-água bifásico é aquele composto por 1-butanol.

A densidade de todas as fases formadas foi determinada, denominando-se ρ_o , a densidade da fase alcóolica, antes da mistura e ρ_{wo} , a densidade da fase aquosa correspondente. A Tabela 4.42 apresenta os valores de densidades referentes à fase aquosa, antes e após o 1º contato de equilíbrio.

Tabela 4.42: Densidade das fases alcóolica e aquosa antes e após o equilíbrio, na presença e ausência de KOH.

	SEM KOH			COM KOH		
Álcool	ρ_o	ρ_{wo}	ρ_I	ρ_o	ρ_{wo}	ρ_I
1-Propanol	****	0,882	0,943	0,863	1,155	1,239
DP	****	0,001	0,002	0,004	0,000	0,000
2-Propanol	****	0,876	0,871	0,837	1,131	1,132
DP	****	0,001	0,001	0,013	0,000	0,000
1-Butanol	0,845	0,986	0,988	0,827	1,153	1,140
DP	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000

Média de 9 repetições

O valor das densidades da fase superior, antes (hexano puro - ρ_o) e após o contato com a solução alcóolica (ρ_I) está apresentado na Tabela 4.43.

Tabela 4.43: Densidade da fase orgânica antes e após o equilíbrio, na presença e ausência de KOH.

		SEM KOH	COM KOH
Álcool	ρ_o	ρ_i	ρ_i
1-Propanol	0,657	0,756	0,741
DP	0,001	0,000	0,001
2-Propanol	0,657	0,683	0,730
DP	0,001	0,001	0,001
1-Butanol	0,657	0,738	0,738
DP	0,001	0,001	0,001

Média de 9 repetições

Uma análise dos valores de densidade da Tabela 4.42, indica que as variações encontradas podem ser justificadas pela grande transferência do álcool para a fase hexano, conforme já identificado pela Tabela 4.41. A densidade da fase aquosa após o equilíbrio é muito próxima à densidade da fase aquosa antes do equilíbrio. Isto significa que nos casos em que a fase álcool se formou, ela é toda absorvida pela fase hexano. Em casos extremos, como com o 1-propanol, uma quantidade considerável do 1-propanol passou para a fase hexano, tanto na presença como na ausência de KOH.

A Tabela 4.43 indica considerável aumento da densidade da fase orgânica, antes e depois do contato, explicado pela absorção de álcool e da água. O KOH não alterou a densidade após contato no sistema contendo 1-butanol, pois a separação água-orgânicos já estava bem definida, sem o eletrólito.

Com o 2-propanol o aumento da densidade da fase superior no contato com a solução de KOH do que sem KOH pode ser atribuída a maior transferência de álcool para essa fase, provocada pelo eletrólito, enquanto que a pequena diminuição da densidade na comparação de sistemas com 1-propanol pode ser devido à manutenção de água na fase aquosa.

4.1.5.3) Variação de Volume das Fases na Mistura

As composições de equilíbrio apresentadas nas Tabelas 4.40 a 4.43, preconizam uma boa recuperação do colesterol, mas com baixa seletividade. Essa situação é prejudicial para a coluna cromatográfica. Isto de fato ocorreu (ver Secção 4.2.5) de modo que apenas a sequência de contato com o 1-propanol foi avaliada em situação precária (sem repetições). Como as medidas de volume são feitas concomitantemente à medida do Coeficiente de Partição, somente a situação do 1-propanol forneceu valores de variação de volume.

Como solvente usou-se o hexano e o ciclohexano. Os resultados das medidas de volume estão nas Tabelas 4.44 a 4.47.

Tabela 4.44: Volume da fase aquosa antes e após do equilíbrio água-solução de 1-propanol de KOH (12%)-solvente

Solvente	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}	SAP _I	SAP _{II}	SAP _{III}
Hexano	14,50	5,00	4,80	5,00	4,80	4,80
Ciclohexano	14,50	5,20	5,10	5,10	5,00	5,00

Tabela 4.45: Diferença de volume da fase aquosa antes e após do equilíbrio água-solução de 1-propanol de KOH (12%)-solvente

Solvente	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{III}
Hexano	-9,50	-0,20	0,00
Ciclohexano	-9,40	-0,20	-0,10

Tabela 4.46: Volume da fase orgânica antes e após do equilíbrio água-solução de 1-propanol de KOH (12%)-solvente

Solvente	Antes do equilíbrio			Após o equilíbrio		
	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}	SOLV _I	SOLV _{II}	SOLV _{III}
Hexano	10,30	10,30	10,20	19,90	10,70	10,20
Ciclohexano	10,70	10,00	10,10	20,20	10,20	10,10

Tabela 4.47: Diferença de volume da fase orgânica após e antes do equilíbrio água-solução de 1-propanol de KOH (12%)-solvente

Solvente	ΔV_I	ΔV_{II}	ΔV_{II}
Hexano	9,60	0,40	0,00
Ciclohexano	9,50	0,20	0,00

Como pode ser observado pelas Tabelas 4.45 e 4.47, confirmou-se que praticamente todo álcool se solubiliza na fase orgânica, sendo a diferença de volumes consideravelmente maior no 1º equilíbrio, e mínima no 2º equilíbrio. Pode-se concluir também que no terceiro equilíbrio já não há presença de 1-propanol em meio aquoso. Por isso, o 1-propanol, assim como o 2-propanol e o 1-butanol que apresentam solubilidades semelhantes, não devem ser adequados para a análise cromatográfica, pois há um arraste de material resultante da saponificação para a fase orgânica, que compromete o funcionamento da coluna capilar. Isto foi comprovado pela coloração escura adquirida pela fase orgânica. Nos ensaios realizados com etanol, a fase superior permanecia incolor em todas as etapas de extração.

4.2 Coeficiente de Partição

A análise de equilíbrio e solubilização entre os componentes do sistema ternário, assim como a operacionalidade da metodologia sugerem ser mais conveniente trabalhar com o hexano, como solvente e o etanol, como álcool. É o sistema que possui menor solubilidade entre as fases aquosa e orgânica, e onde houve menor transferência do álcool para a fase orgânica. Este fato garante que apenas os esteróis sejam extraídos pelo solvente, e que a recuperação dos mesmos seja máxima. Também é o sistema que, em nenhuma das proporções apresentou dificuldades na separação das fases.

No entanto, a conclusão final poderá ser obtida apenas após a análise do Coeficiente de Partição, que será vista nesta secção.

A escolha do sistema que promove a maior recuperação do colesterol foi baseada principalmente, nos resultados dos Coeficientes de Partição (K) e percentagem de recuperação (%Rec).

Os erros correspondentes aos valores dos Coeficientes de Partição foram avaliados pelo método de Propagação de Erros, apresentado no Apêndice D (MICKLEY *et al.*, 1957). Como os sistemas contendo 1-propanol que foram realizados sem repetições, não foi possível calcular o erro inerente dos coeficientes de partição.

Apesar de serem encontradas referências na literatura citando a importância do uso de anti-oxidantes (BOHAC *et al.*, 1988; BRAGAGNOLO, 1992; ULBERTH e REID, 1992; THOMPSON e MEROLA, 1993; PATERSON e AMADÒ, 1997), ao longo do tempo de trabalho em laboratório, manuseando sempre a mesma amostra, não foi percebida a formação de novos picos nos cromatogramas. Se houve oxidação dos componentes do meio de saponificação, os picos não foram detectados pelo cromatógrafo a gás.

As Tabelas 4.48 e 4.49, indicam os dados para os ensaios realizados para determinar o melhor tempo de agitação pelo agitador de tubos.

Tabela 4.48: Área média dos picos dos cromatogramas. Solvente: hexano. Proporção A

Tempo	5α-colestano		colesterol		
	1^a extração	2^a extração	1^a extração	2^a extração	3^a extração
3 min	184696	2944	148284	27743	6787
DP	16552	195	12841	1409	460
5 min	240329	6136	174177	30891	7168
DP	12449	580	6462	2250	287

Média de 18 repetições

Tabela 4.49: Coeficiente de Partição e percentagem de recuperação. Solvente: hexano.

Proporção A

	5 α -colestano			colesterol				
Tempo	K _I	%Rec _I	%Rec _{II}	K _I	K _{II}	%Rec _I	%Rec _{II}	%Rec _{III}
3 min	93,5	98,4	1,6	6,4	6,0	81,1	15,2	3,7
ΔK	16,53			1,04	0,82			
5 min	57,6	97,5	2,5	6,8	6,3	82,1	14,6	3,4
ΔK	9,78			0,89	0,86			

Os resultados de Coeficiente de Partição e percentagem de recuperação foram semelhantes para os dois tempos analisados: 3 e 5 minutos. O único valor diferente é o coeficiente de partição para o padrão interno, 5 α -colestano. Mas como será discutido posteriormente, esse composto tem comportamento diferente do colesterol. Por isso, para simplicidade do método optou-se por realizar os ensaios posteriores adotando o tempo de 3 minutos. Esse tempo já havia sido recomendado por (BRUNHARA, 1997)

Nos trabalhos de BUENO (1990) e MORIYOSHI *et al.* (1988) os tempos de agitação foram superiores a 8 horas. No entanto, pelos valores observados nas Tabelas 4.48 e 4.49, vê-se que, como os limites do erro experimental na determinação cromatográfica são maiores, não haveria necessidade de aumentar esse tempo.

4.2.1 Sistema: Água-Solução Etanólica-Hexano

A Tabela 4.50 apresenta a média das áreas dos picos dos componentes 5 α -colestano e colesterol, obtida com injeções de alíquotas de 5 μ L da fase hexano em equilíbrio com os produtos da saponificação no sistema: água, solução etanólica com KOH (12%) e hexano nas 4 proporções dos componentes. A tabela também inclui os desvios padrões de cada média.

Tabela 4.50: Área média do colesterol e do 5 α -colestano. Solvente: hexano.

Proporção (1/2/3))	5 α -colestano		colesterol		
	1 ^a extração	2 ^a extração	1 ^a extração	2 ^a extração	3 ^a extração
A= 5/10/10	217447	2634	132641	25813	5325
DP	10328	144	6977	1412	202
B= 15/10/10	200804	3804	94435	27176	10606
DP	8815	329	5213	1514	768
C= 5/20/10	295780	9985	96106	44732	22643
DP	12689	591	3921	2599	1610
D= 5/10/20	102958	1264	74798	8772	1211
DP	6002	56	3508	488	110

Média de 18 repetições

Os Coeficientes de Partição calculados segundo Equação 3.6 e 3.7 e a percentagem de recuperação de cada componente (Equação 3.9) estão na Tabela 4.51. Os cálculos são feitos assumindo-se que todo o colesterol e o 5 α -colestano são recuperados nas extrações consideradas.

Tabela 4.51: Coeficientes de Partição e porcentagem de recuperação. Solvente: hexano

Proporção	5 α -colestano			colesterol				
	K _I	%Rec _I	%Rec _{II}	K _I	K _{II}	%Rec _I	%Rec _{II}	%Rec _{III}
A= 5/10/10	122	98,8	1,2	6,3	7,1	81,0	15,7	3,2
ΔK	15,14			0,80	0,78			
B= 15/10/10	130	98,1	1,9	6,1	6,2	71,4	20,6	8,0
ΔK	20,70			0,87	0,88			
C= 5/20/10	75	96,7	3,3	3,6	4,9	58,8	27,4	13,8
ΔK	8,34			0,41	0,72			
D= 5/10/20	61	98,8	1,2	5,6	5,3	88,2	10,3	1,4
ΔK	6,95			0,66	0,81			

O resultado mais importante diz respeito ao comportamento diferenciado desses dois componentes. O padrão interno é mais fácil de ser extraído, visto que foram precisas apenas duas extrações, enquanto que o colesterol ainda estava presente na 3ª extração. Isto é justificado pelo fato de o 5 α -colestano ser insolúvel em água (Apêndice B), enquanto que o colesterol é ligeiramente solúvel nela.

Para o colesterol, a melhor composição do sistema ternário dá-se na Proporção A, com valores de $K_I = 6,3$ (+/- 0,80) e $K_{II} = 7,1$ (+/- 0,78), e 81,0%, 15,7% e 3,2% de percentagens de recuperação nas sucessivas extrações.

Os Coeficientes de Partição do colesterol nos dois equilíbrios têm valores muito próximos o que se explica pela composição semelhante das fases nos sucessivos contatos (Secção 4.1.1) e estatisticamente, a diferença não é significativa. A Proporção C, por sua vez, produziu os valores mais baixos de partição, o que é justificável pela maior contaminação em etanol dessa fase e pelo maior conteúdo de hexano na fase inferior (Tabela 4.2).

A partição do 5 α -colestano também foi reflexo de composição, embora não haja explicação para o baixo valor obtido para a Proporção D. O cálculo de Coeficientes de Partição altos está sujeito a erros maiores, uma vez que ele é computado pela divisão de um número grande por um número muito pequeno (Equação 3.7).

4.2.2 Sistema: Água-Solução Etanólica-Ciclohexano

As Tabelas 4.52 e 4.53 apresentam os resultados para o sistema: água, solução etanólica com KOH (12%) e ciclohexano nas 4 proporções dos componentes, usando o tempo de agitação de Vortex de 3 minutos e de decantação de 30 minutos.

Tabela 4.52: Área média do colesterol e do 5 α -colestano. Solvente: ciclohexano

Proporção (1/2/3)	5 α -colestano		colesterol		
	1 ^a extração	2 ^a extração	1 ^a extração	2 ^a extração	3 ^a extração
A= 5/10/10	236709	3297	132866	23456	4171
DP	35483	381	14469	1850	347
B= 15/10/10	257714	11346	115255	33927	10106
DP	13633	455	3008	807	219
C= 5/20/10	327563	9175	115129	45256	18271
DP	19228	994	5872	2521	857
D= 5/10/20	115993	1324	60135	6213	ND
DP	5486	86	5568	175	ND

ND: não detectável

Média de 18 repetições

Tabela 4.53: Coeficientes de Partição e porcentagem de recuperação. Sistema: ciclohexano

Proporção	5 α -colestano			colesterol				
	K _I	%Rec _I	%Rec _{II}	K _I	K _{II}	%Rec _I	%Rec _{II}	%Rec _{III}
A= 5/10/10	109	98,6	1,4	7,3	8,2	82,8	14,6	2,6
ΔK	31,21			1,52	1,53			
B= 15/10/10	55	95,8	4,2	6,4	8,3	72,4	21,3	6,3
ΔK	5,17			0,32	0,38			
C= 5/20/10	96	97,3	2,7	4,9	6,6	64,4	25,3	10,2
ΔK	17,95			0,61	0,79			
D= 5/10/20	66	98,9	1,1	7,3	ND	90,6	9,4	ND
ΔK	8,16			0,96	ND			

ND: não determinável

Observa-se que resultados obtidos para os dois sistemas ternários com hexano e com ciclohexano apresentam tendências semelhantes, no entanto, os valores de desvio-padrão foram maiores para os ensaios realizados com a mistura contendo o ciclohexano como solvente. Os resultados tornaram a deixar claro que a extração do 5 α -colestano é

mais eficiente do que a do colesterol e de que a Proporção C induz aos coeficientes de partição mais baixos.

A melhor recuperação do colesterol e do padrão interno, 5 α -colestano, para o sistema ternário água, solução etanólica com KOH (12%) e ciclohexano, seguindo as mesmas condições para o solvente hexano, também foi para a composição de 5 mL de água, 10 mL de etanol e 10 mL de ciclohexano.

O valor médio dos Coeficientes de Partição obtidos nas Proporções A e B para o ciclohexano, são ligeiramente superiores aos do hexano. A margem de erro experimental, entretanto, indica que estatisticamente, eles não diferem entre si.

Nas Proporções A, B e C, o valor médio do Coeficiente de Partição do 2º equilíbrio é maior do que o do primeiro. Esse aumento pode ser atribuído à variação na composição que se observa ao longo das extrações, com uma sensível diminuição de conteúdo de ciclohexano na fase inferior. Na Proporção D, o pico do colesterol em SOLV_{III} foi muito pequeno e sua área não pode ser medida.

4.2.3 Sistema: Água-Solução Etanólica-Tolueno

As Tabelas 4.54 e 4.55 apresentam os resultados para o sistema: água, solução etanólica com KOH (12%) e tolueno nas 4 proporções dos componentes, usando o tempo de agitação de Vortex de 3 minutos e de decantação de 30 minutos.

Esse sistema mostrou ser mais suscetível a erros experimentais, com desvios-padrões das áreas médias muito grandes.

Tabela 4.54: Área média do colesterol e do 5 α -colestano. Solvente: tolueno.

Proporção (1/2/3)	5 α -colestano		colesterol		
	1ª extração	2ª extração	1ª extração	2ª extração	3ª extração
A= 5/10/10	213479	4564	14406	2200	ND
DP	19832	691	1870	113	ND
B= 15/10/10	221326	7757	96217	13871	2072
DP	11863	399	13355	718	123
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO DE FASES				
D= 5/10/20	98242	1995	14743	2568	2015
DP	5148	177	1853	234	245

ND: não detectável

Média de 18 repetições

Tabela 4.55: Coeficientes de Partição e porcentagem de recuperação. Solvente: tolueno

Proporção	5 α -colestano			colesterol				
	K _I	%Rec _I	%Rec _{II}	K _I	K _{II}	%Rec _I	%Rec _{II}	%Rec _{III}
A= 5/10/10	54	97,9	2,1	7,5	ND	86,7	13,3	ND
ΔK	17,25			1,92	ND			ND
B= 15/10/10	66	96,6	3,4	14,0	15,2	85,8	12,4	1,8
ΔK	9,06			3,16	2,23			
C= 5/20/10	NÃO HOUVE SEPARAÇÃO DE FASES							
D= 5/10/20	39	98,0	2,0	2,6	1,0	76,3	13,3	10,4
ΔK	5,46			0,51	0,15			

ND: não determinável

O valor médio do Coeficiente de Partição para a Proporção A não difere estatisticamente dos de hexano e ciclohexano. No entanto, a melhor recuperação para esse sistema foi obtida na Proporção B, sendo encontrados valores excepcionalmente altos para os Coeficientes de Partição, e que, estatisticamente diferem dos da Proporção A.

4.2.4 Sistema: Água-Solução de 1-Propanol-Hexano

Para estudar o efeito de outros álcoois realizou-se a saponificação com o 1-propanol em hexano e ciclohexano, para apenas uma das proporções de equilíbrio: 5 mL de água, 10 mL de solução alcóolica e 10 mL de solvente. Os cromatogramas exibiram uma série de picos adicionais, como pode ser visto pela Figura 4.7, e análises com amostras padrões (hexano e colesterol) realizadas posteriormente mostraram que injeções de alíquotas obtidas usando este tipo de álcool danificaram a coluna cromatográfica. Estes fatos são indícios de que este tipo de álcool é inadequado para ser usado na saponificação, pelo menos nos casos em que a quantificação de colesterol é realizada por cromatografia gasosa.

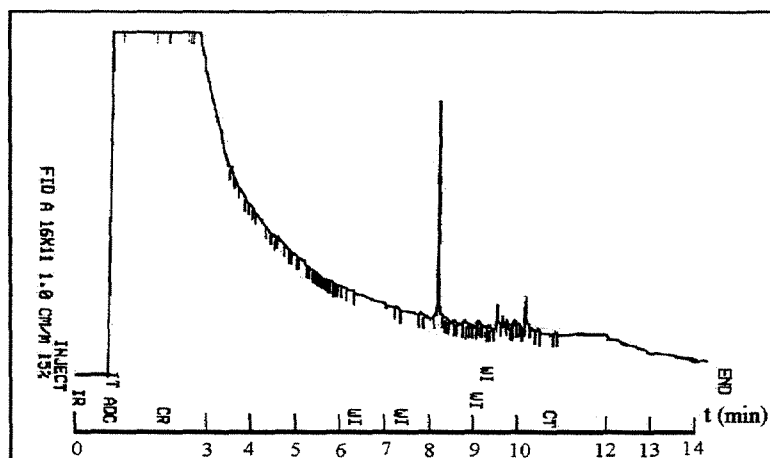


Figura 4.7 – Cromatograma para o sistema : água, 1-propanol e hexano

Testes preliminares feitos com 1-butanol e 2-propanol indicaram um comportamento similar. Por serem mais solúveis em hexano do que em água principalmente na presença de KOH no meio, ou parcialmente solúvel como é o caso do 2-propanol, eles solubilizam na fase orgânica outros componentes resultantes da saponificação, e que possuem características que não são apropriadas para o uso em colunas capilares usadas na detecção de colesterol.

As Tabelas 4.56 e 4.57 apresentam os resultados para o sistema: água, solução etanólica com KOH (12%), hexano e ciclohexano nas 4 proporções dos componentes, usando o tempo de agitação de Vortex de 3 minutos e de decantação de 30 minutos, usando 5 α -colestano como padrão interno.

Os resultados apresentados servem apenas como indicadores preliminares, uma vez que não houve repetições dos ensaios. Confirmam-se coeficientes extremamente baixos, tanto para o colesterol como para o 5α -colestano, mais um motivo contrário ao uso desses álcoois.

Tabela 4.56: Área média do colesterol e do 5α -colestano. Proporção A, com 1-propanol

Solvente	5α -colestano		colesterol		
	1ª extração	2ª extração	1ª extração	2ª extração	3ª extração
Hexano	64747	4145	9511	3198	ND
Ciclohexano	67898	1736	6837	1134	ND

ND= não detectável

Média de 18 repetições

Tabela 4.57: Coeficiente de Partição e porcentagem de recuperação. Proporção A, com 1-propanol

Solvente	5α -colestano			colesterol		
	K_I	%Rec _I	%Rec _{II}	K_I	%Rec _{II}	%Rec _{II}
Hexano	7,3	94,0	6,02	1,4	74,8	25,2
Ciclohexano	19,6	97,5	2,49	3,0	85,8	14,2

4.3 Ajuste de dados (sistemas: hexano e ciclohexano)

No cálculo dos Coeficientes de Partição, assumiu-se que todo o colesterol era extraído em três contatos de equilíbrio, e a soma das percentagens de recuperação, era ajustada a 100%. A razão decrescente das sucessivas percentagens de recuperação indica, entretanto, que em algumas situações, sobretudo nos ensaios com a Proporção C, a quantidade de colesterol remanescente na solução aquosa, após o 3º equilíbrio, não é desprezível.

Como os sistemas que usam etanol-hexano e etanol-ciclohexano, demonstraram melhor operacionalidade e maior confiabilidade, procedeu-se a um ajuste dos dados de extração destas duas situações conforme indicado abaixo.

Utilizando a Equação (2.10), programou-se uma série de iterações, assumindo como valor inicial de K , a média aritmética dos coeficientes calculados com as três extrações. Com hexano para a Proporção A, incluiu-se também os valores da Tabela 4.49 no cálculo da média. O valor experimental do volume das fases do 1º equilíbrio foi mantido. Para os equilíbrios subsequentes, utilizou-se a média dos volumes determinados experimentalmente para o 2º e o 3º equilíbrio.

Calculou-se a percentagem de extração de um número de contatos de equilíbrio, considerando como estágio final aquele no qual a percentagem de extração era inferior a 0,5%. Com esses valores tornou-se a calcular os Coeficientes de Partição.

O processo de cálculo era repetido até uma variação inferior a 0,1 do valor de K . Os resultados estão apresentados na Tabela 4.60.

Tabela 4.60: Ajuste dos valores dos Coeficientes de Partição. Solvente: hexano

Proporção	$K_{\text{médio}}$	K_{ajuste}	%Rec ₁	%Rec ₂	%Rec ₃	%Rec ₄	%Rec ₅
A= 5/10/10	6,5	6,3	79,8	16,4	3,1	***	***
B= 15/10/10	6,2	6,0	70,2	21,1	6,1	1,8	***
C= 5/20/10	4,3	3,6	50,3	29,4	12,0	4,9	2,0
D= 5/10/20	5,4	5,5	87,0	10,9	1,2	***	***

Tabela 4.61: Ajuste dos valores dos Coeficientes de Partição. Solvente: ciclohexano

Proporção	$K_{\text{médio}}$	K_{ajuste}	%Rec ₁	%Rec ₂	%Rec ₃	%Rec ₄	%Rec ₅
A= 5/10/10	7,7	7,2	80,9	15,9	2,7	***	***
B= 15/10/10	7,3	6,3	70,6	21,2	5,9	1,7	***
C= 5/20/10	5,7	4,8	53,3	30,1	10,7	3,8	1,3
D= 5/20/10	7,3	7,3	90,03	9,07	0,82	***	***

A análise das Tabelas 4.60 e 4.61 mostram que as melhores condições são aquelas correspondentes às Proporções A e D, onde se obteve o número mínimo de contatos de equilíbrio igual a três. Já nas Proporções B e C, esse número aumentou para quatro e cinco contatos, respectivamente. Na Proporção B, isto se explica devido à maior retenção de etanol na fase aquosa, e na Proporção C, o aumento do número de estágios de partição

deve-se ao maior volume de etanol, que por consequência, aumenta a solubilidade do solvente em água.

Os valores de Coeficiente de Partição entre as duas proporções são próximos, tanto para hexano como para ciclohexano. Mas não se faz necessário utilizar um volume maior de solvente para atingir a mesma recuperação total, sendo o número de estágios o mesmo.

Como demonstrado na Secção 2.9, onde se indica usar o maior número possível de extrações (n) com o menor volume de extrator (v), nos resultados observou-se que para um mesmo número de extrações, o aumento do volume de solvente adicionado não contribuiu significativamente para o aumento da partição embora a percentagem de recuperação aumente. Esse fato pode ser justificado pelos valores encontrados nas Tabelas 4.2 e 4.15, onde há indicação de que a duplicação de volume de solvente não alterou a composição de equilíbrio.

Estes resultados levam a concluir que a melhor condição para obter recuperação máxima de colesterol, refere-se à Proporção A, sendo aceitável aumentar a proporção de água.

Na escolha em relação ao solvente mais apropriado, vê-se que o hexano apresenta melhores condições de separação do colesterol, pelo fato da solubilidade mútua entre água e hexano ser menor do que entre água e ciclohexano. No entanto, pelos valores de Coeficiente de Partição não foram encontradas diferenças significantes que determinasse a escolha definitiva do solvente.

Por isso, optou-se por fazer a escolha do solvente mais adequado através da avaliação econômica. Já que o custo do hexano é bastante superior, deve-se adotar o ciclohexano como solvente a ser empregado na extração para quantificação de colesterol.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões e Recomendações

Os resultados e a experiência prática adquiridos ao longo do desenvolvimento deste trabalho de tese permitem enumerar as seguintes conclusões.

1. O uso do programa computacional do Modelo UNIQUAC, que fornece a composição de fases em equilíbrio, contribuiu para definir com precisão a solubilidade entre os componentes para as diferentes proporções utilizadas;
2. O álcool mais apropriado para a saponificação foi o etanol, uma vez que os demais álcoois possuem grande solubilidade nos solventes, arrastando compostos saponificados que tendem a danificar a coluna cromatográfica. A utilização de metanol torna-se inviável devido à formação de emulsões;
3. O hexano e o ciclohexano apresentaram condições semelhantes de recuperação do colesterol, e apesar do hexano ter menor capacidade de solubilização de água, o baixo custo do ciclohexano, sugere que o emprego deste solvente é mais adequado;
4. O tolueno apresentou um comportamento menos ideal do que os outros solventes, sendo que o volume total da mistura antes e após o equilíbrio não é constante;

5. A Proporção A mostrou ser mais adequada, por apresentar mínima solubilidade entre solvente e água, que permite a máxima extração de colesterol, sem o arraste de produtos resultantes da saponificação;
6. A Proporção C, apresenta maior fração de etanol solúvel na fase orgânica, principalmente em tolueno.
7. Os compostos provenientes da saponificação influenciam o equilíbrio, visto que tornou a mistura água, etanol e tolueno, totalmente miscível, nas condições da Proporção C;
8. O efeito *salting out* do KOH foi verificado nos sistemas contendo os álcoois: 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol. Sua influência foi menor na presença de etanol, promovendo alterações perceptíveis na Proporção C;
9. Os ensaios de densidades foram fundamentais para a análise de solubilidade dos componentes e da influência do KOH;
10. O KOH melhorou a separação de fases em sistemas que, em sua ausência, mostraram-se turvos;
11. Na análise de variação de volume foi possível verificar a contração do volume da fase orgânica e aumento do volume da fase aquosa no 1º contato de equilíbrio;
12. A técnica de cromatografia gasosa atendeu as exigências propostas neste trabalho, provando ser um método preciso e rápido;
13. Comprovou-se que são necessárias no mínimo três extrações para recuperação máxima do colesterol.
14. O padrão interno utilizado, 5 α -colestano foi mais facilmente extraído sendo necessárias apenas duas etapas.

Para o preparo da amostra na determinação do colesterol pelo cromatógrafo a gás, recomenda-se:

1. Usar etanol na saponificação.
2. Usar ciclohexano como solvente na seguinte proporção em volume: água/ etanol 12% de KOH/ ciclohexano : 5/10/10. A quantidade de água (ou de ciclohexano) pode ser aumentada, mas a de etanol deve ser mantida a mais baixa possível.

3. Efetuar três contatos de equilíbrio com separação completa entre as fases, tendo o cuidado de medir o volume total da fase superior obtida.
4. Adicionar o 5 α -colestano na etapa final, após a extração.

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

- ↪ Variar a concentração de hidróxido de potássio, e simultaneamente, utilizar um programa computacional que leve em consideração a presença de eletrólitos;
- ↪ Testar o uso de anti-oxidantes;
- ↪ Análise do 5 α -colestanol como padrão interno, como foi indicado por THOMPSON e MEROLA (1993), que mostraram obter bons resultados.;
- ↪ Comparar os resultados obtidos neste trabalho através da cromatografia gasosa, com outras técnicas, como o HPLC. Seria de muito valor encontrar outra técnica que não apresentasse restrições ao uso de compostos polares, pois isto permitiria o uso de 1-butanol como álcool empregado na saponificação, uma vez que se provou que tem pouca solubilidade em água, permitindo a extração total de colesterol;
- ↪ Fazer uso de soluções de solvente saturadas de álcool e soluções de álcool saturadas de solvente, assim como no trabalho de NOTA *et al.* (1998), para verificar a influência da variação de volume nos valores de coeficiente de partição;
- ↪ Verificar a influência do tamanho da amostra lipídica, como indicado por FENTON e SIM (1991), e juntamente com esses resultados obter a quantidade de glicerol;
- ↪ Traçar diagramas ternários individuais. Deste modo, poder-se-ia conhecer a influência de cada componente sobre os demais e ter a possibilidade de aprimorar as condições de extração do colesterol, assim como dos insaponificáveis de modo geral;
- ↪ Quantificar o colesterol utilizando o “Padrão de Referência Certificado” através das melhores condições de recuperação determinadas neste trabalho, e comparar os resultados com os valores obtidos de trabalhos anteriores.

APÊNDICE A

Diagramas de Equilíbrio Ternário Líquido-Líquido

Neste Apêndice são coletados vários diagramas ternários assim como o sistema água-etanol-hexano, levantado por MORIYOSHI *et al.* (1988) e já apresentado no Capítulo 2.

Todos os diagramas apresentados têm a composição em fração molar, com exceção dos sistemas água-etanol-heptano e água-etanol-benzeno, que são plotados em frações mássicas.

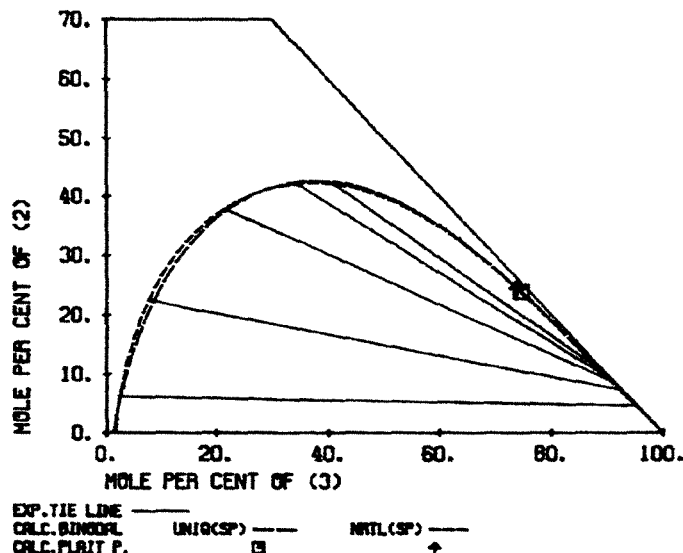


Figura A.1: Sistema Água-1-Propanol-Hexano a 37,80°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

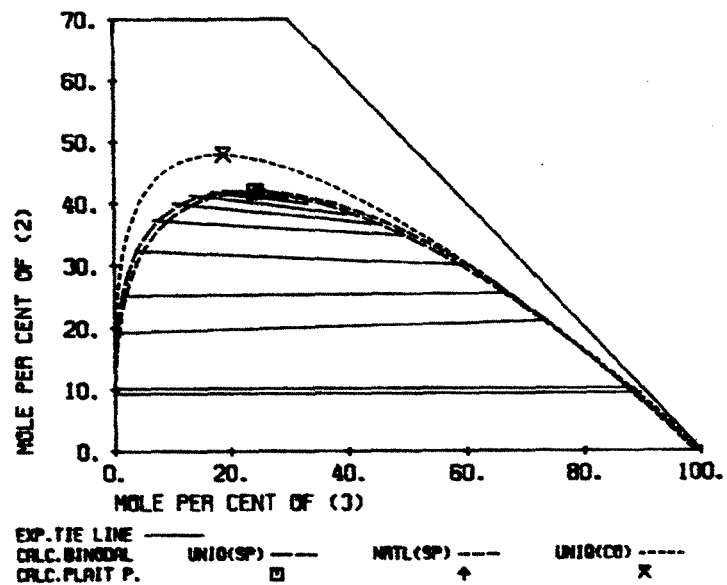


Figura A.2: Sistema Água-2-Propanol-Hexano a 25°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

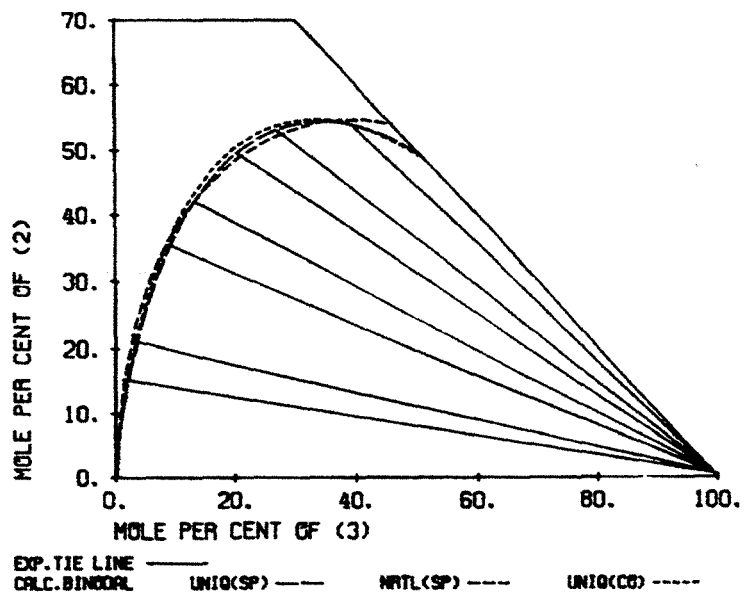


Figura A.3: Sistema Água-1-Butanol-Hexano a 25°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

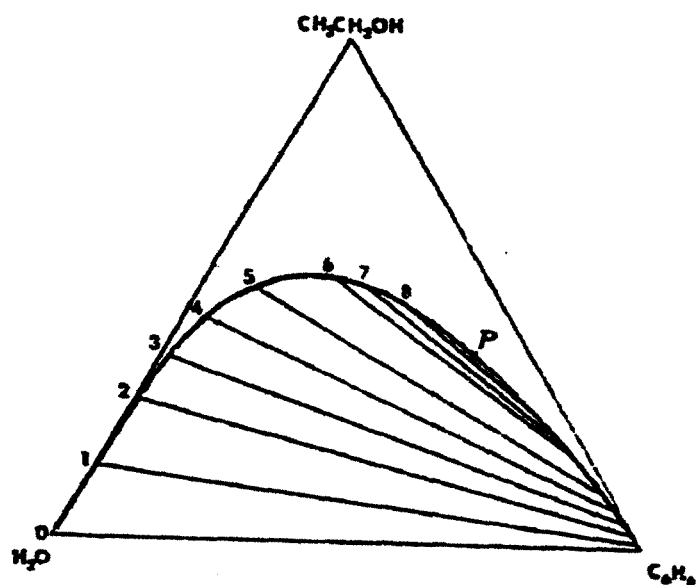


Figura A.4: Sistema Água-Etanol-Benzeno a 20°C (ROSS e PATTERSON, 1979)

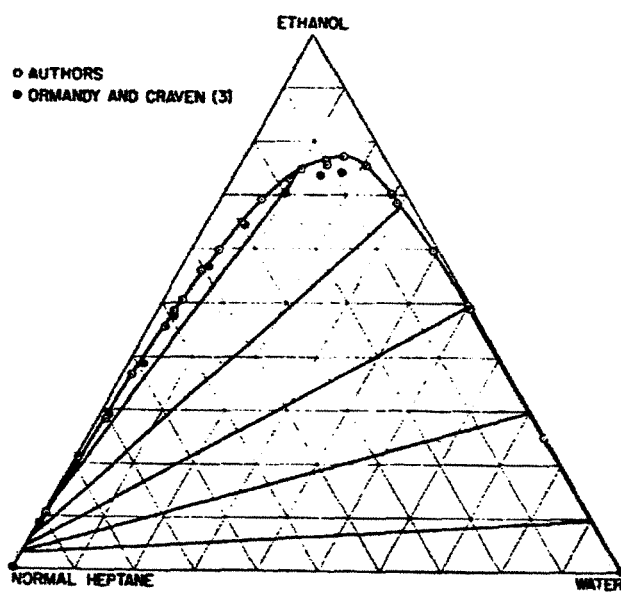


Figura A.5: Sistema Água-Etanol-Heptano a 30°C (SCHWEPPE e LORAH, 1954)

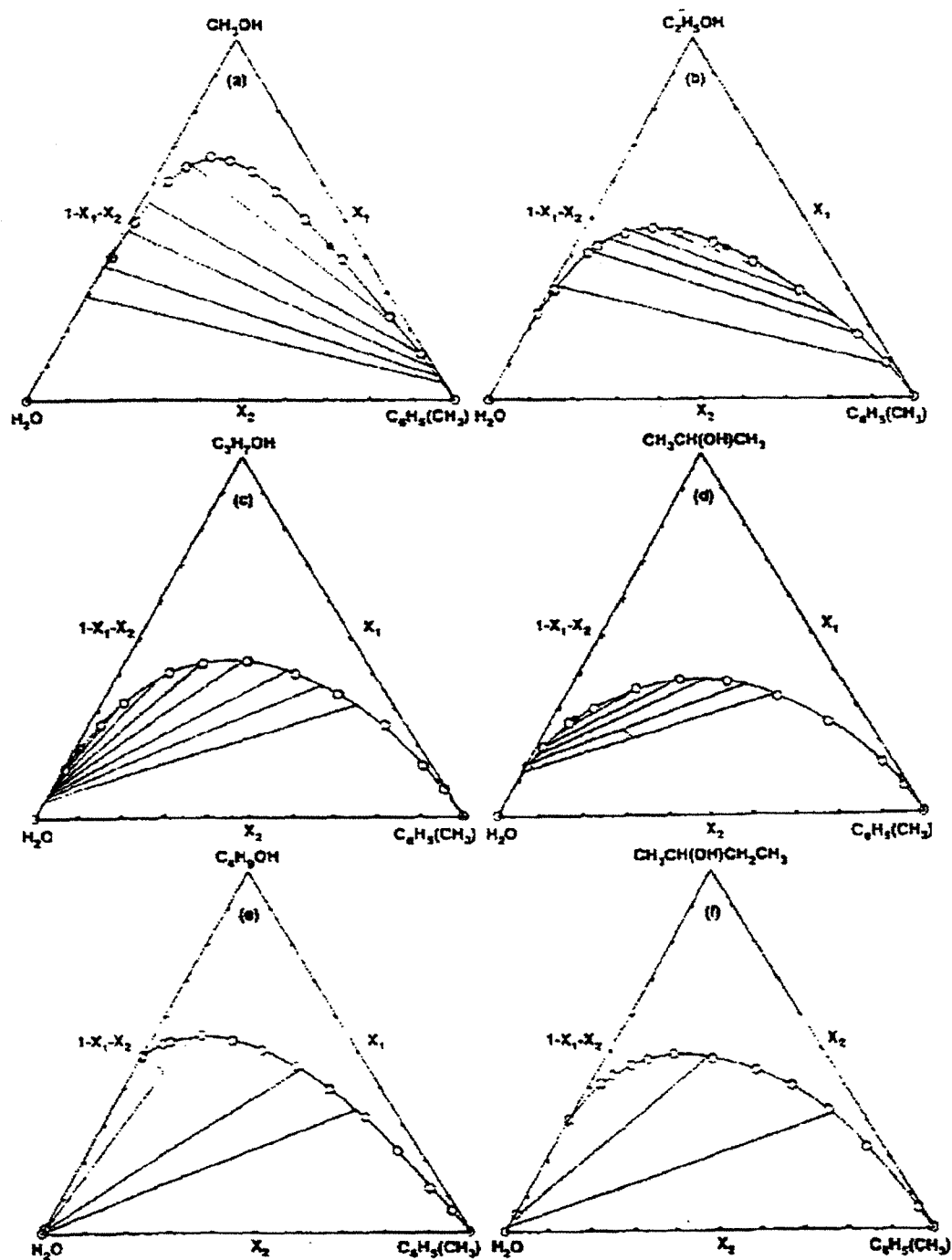


Figura A.6: Sistema Água-Álcool (metanol, etanol, propanol, 2-propanol, butanol, 2-butanol) -Tolueno a 25°C (LETCHER e SISWANA, 1992)

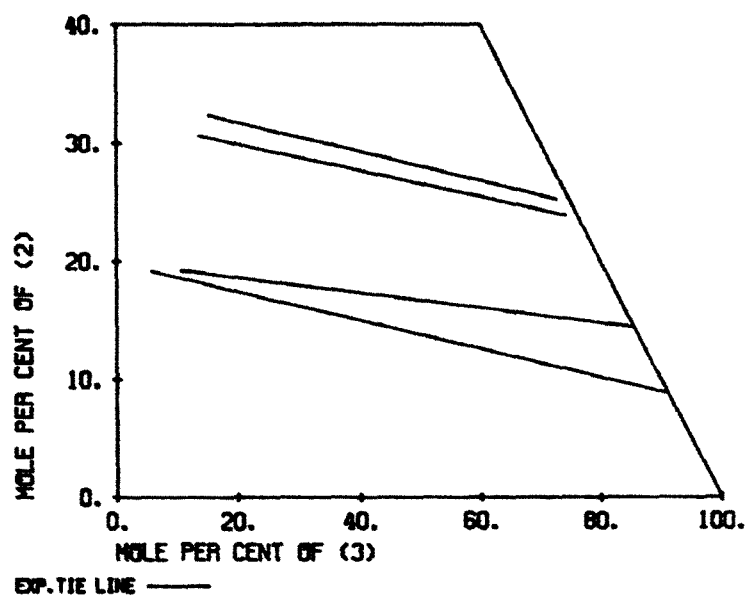


Figura A.7: Sistema Água-1-Propanol-Heptano a 37,8°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

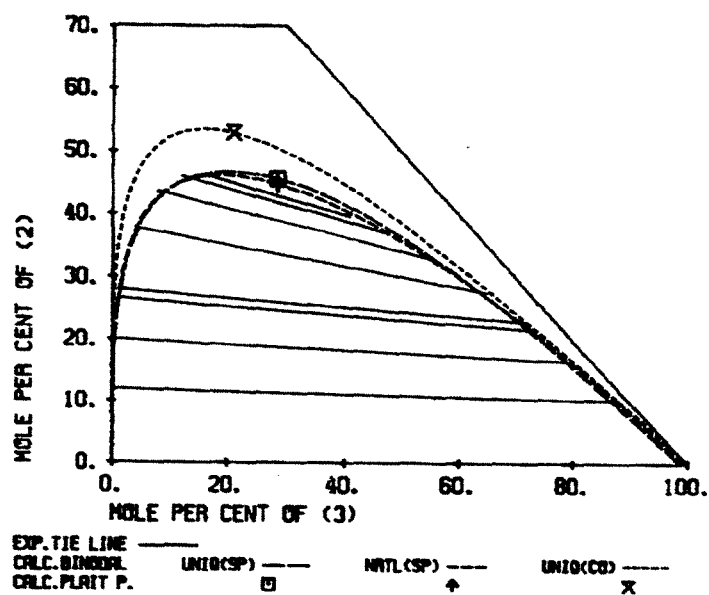


Figura A.8: Sistema Água-2-Propanol-Heptano a 25°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

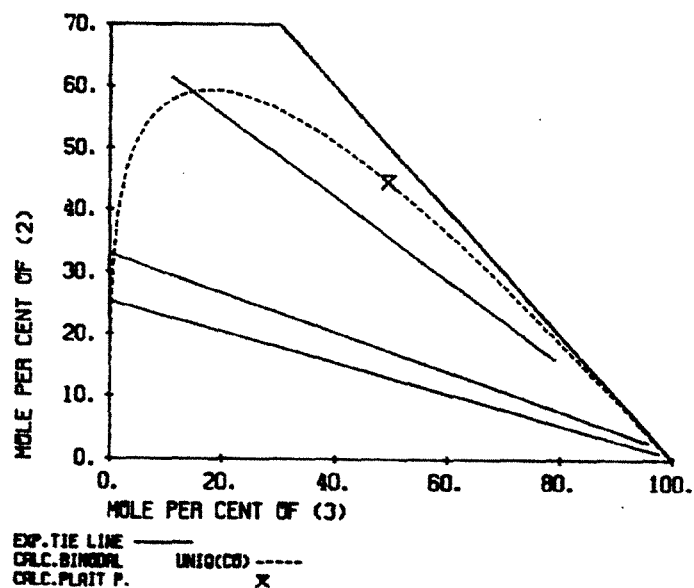


Figura A.9: Sistema Água-Etanol-Ciclohexano a 25°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

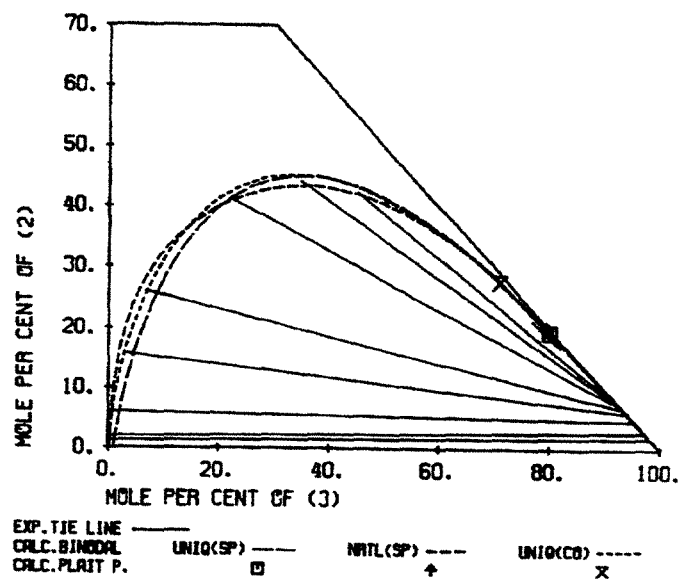


Figura A.10: Sistema Água-1-Propanol-Ciclohexano a 25°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

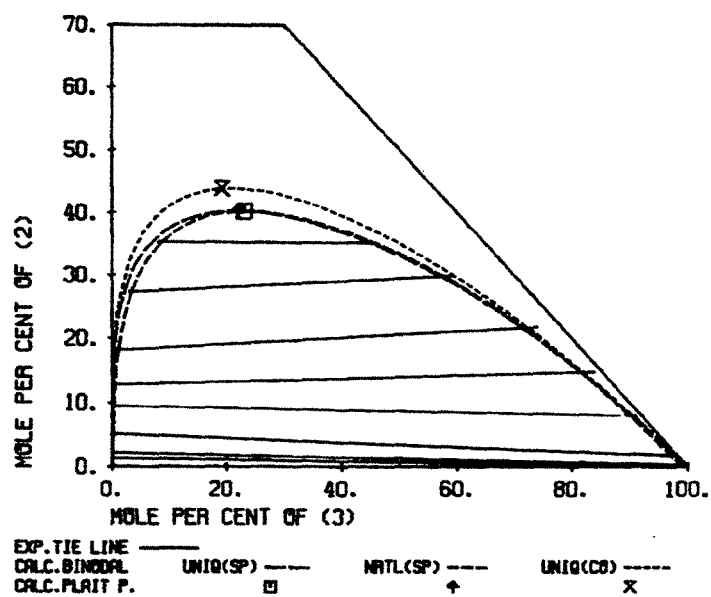


Figura A.11: Sistema Água-2-Propanol-Ciclohexano a 25°C (SORENSEN e ARLT, 1980)

APÊNDICE B

Propriedades Físicas dos Compostos

Nas Tabelas B.1 e B.2 estão listadas as propriedades físicas dos compostos utilizados nos ensaios experimentais deste trabalho, usando-se como referência PERRY e GREEN (1998) e WEAST *et al.* (1965).

Os dados compreendem valores de temperatura de fusão (Tf), temperatura de ebulição (Te) ambas dadas em °C, densidades (ρ) em g/mL, massa molecular (PM) em g/gmol, e a solubilidade definida como a quantidade de substância anidra que é solúvel em 100 g de água ou solvente.

Os algarismos em sobrescritos indicam a temperatura de referência que foram medidas as propriedades físicas.

Esses dados foram usados como consulta para discussão dos resultados obtidos experimentalmente, principalmente aqueles relacionados à solubilidade.

Tabela B.1- Propriedades físicas do hidróxido de potássio.

Composto	PM (g/gmol)	ρ (g/mL)	Tf (°C)	Te (°C)	Solubilidade		
					Água fria	Água Quente	Observações
KOH	56,10	2,044	380	1320	97 (0°C)	178 (100°C)	Muito solúvel em etanol 95%, solúvel em éter etílico e insolúvel em NH ₃

Tabela B.2- Propriedades físicas dos compostos orgânicos e da água

Composto	PM (g/gmol)	ρ (g/mL)	Tf (°C)	Te (°C)	Solubilidade		
					Água	Álcool	Éter
Etanol	46,07	0,789 ^(20/4)	-112	78,4	infinita	****	infinita
Metanol	32,04	0,792 ^(20/4)	-97 / -98	64,7	infinita	infinita	infinita
1-Propanol	60,09	0,804 ^(20/4)	-127	97,8	infinita	infinita	infinita
2-Propanol	60,09	0,789 ^(20/4)	-85,8	82,5	infinita	infinita	infinita
1-Butanol	74,12	0,810 ^(20/4)	-79,9	117	9 ¹⁵	infinita	infinita
Hexano	86,17	0,659 ^(20/4)	-94	69	0,014 ¹⁵	50 ³³	infinita
Ciclohexano	84,16	0,779 ^(20/4)	6,5	80 / 81	Insolúvel	infinita	infinita
Tolueno	92,13	0,866 ^(20/4)	-95	110,8	0,05 ¹⁶	solúvel	infinita
Glicerol	*92,09	*1,260 ^(50/4)	*17,9	*290	*infinita	*infinita	*insolúvel
Colesterol	*386,66	1,067	149/51	Sublima	0,26 ²⁰	1,1 ¹⁷	18
		*1,067 ^{20/4}	*148,5	*360 (decompõe)	ligeiramente solúvel *	ligeiramente solúvel *	*muito solúvel
Colestano	*372,65	*0,9090 ⁸⁸	*80	*250	*insolúvel	ligeiramente solúvel *	*muito solúvel
Água	18,016	1,00 ⁴ (líq.) 0,915 ⁰ (gelo)	0	100		infinita	ligeiramente solúvel

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. (1998), *WEAST *et al.* (1965).

APÊNDICE C

Parâmetros de Ajuste do Modelo UNIQUAC

Como foi indicado no Capítulo 3, usou-se um programa computacional baseado no Modelo de UNIQUAC para a determinação da composição de equilíbrio de fases, cujos parâmetros são obtidos pelo ajuste aos dados da literatura e estão indicados nas Tabelas C.1 a C.6.

O Apêndice C descreve as informações necessárias e a aplicação do Modelo UNIQUAC, obtidos de SANDLER (1989) e NOVÁK *et al.* (1987).

O modelo UNIQUAC baseia-se na teoria de mecânica estatística podendo-se determinar as composições locais a partir das diferenças de tamanho e energia entre as moléculas na mistura. O resultado é a expressão dada pela equação abaixo:

$$\frac{G^{ex}}{RT} = \frac{G^{ex}(combinatorial)}{RT} + \frac{G^{ex}(residual)}{RT} \quad (C.1)$$

onde o primeiro termo considera as diferenças de tamanho e forma, enquanto as diferenças de energia são considerados no segundo termo. Estes termos, para um sistema de multicomponentes pode ser escrito conforme as expressões:

$$\frac{G^{ex}(combinatorial)}{RT} = \sum_i x_i \ln \frac{\varphi_i}{x_i} + \frac{z}{2} \sum_i x_i q_i \ln \frac{\theta_i}{\varphi_i} \quad (C.2)$$

$$\frac{G^{es}(residual)}{RT} = -\sum x_i q_i \ln\left(\sum \theta_j \tau_{ji}\right) \quad (C.3)$$

Sendo: r_i = parâmetro volumétrico para a espécie i

q_i = parâmetro de área superficial para a espécie i

$$\theta_i = \text{fração de área para a espécie } i = \frac{x_i q_i}{\sum x_j q_j}$$

$$\phi_i = \text{fração do segmento ou do volume da espécie } i = \frac{x_i r_i}{\sum x_j r_j}$$

$$\ln \tau_{ij} = \frac{(u_{ij} - u_{ji})}{RT}$$

com u_{ij} sendo a energia de interação média entre espécies i e espécies j e z sendo o número de coordenada média, comumente adotado como 10. Combinando as Equações C.1, C.2 e C.3 tem-se as expressões usadas para coeficientes de atividade:

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i(\text{combinatorial}) + \ln \gamma_i(\text{residual}) \quad (C.4)$$

$$\ln \gamma_i(\text{combinatorial}) = \ln \frac{\phi_i}{x_i} + \frac{z}{2} q_i \ln \frac{\theta_i}{\phi_i} + l_i - \frac{\phi_i}{x_i} \sum_j x_j l_j \quad (C.5)$$

$$\ln \gamma_i(\text{residual}) = q_i \left[1 - \ln \left(\sum_j \theta_j \tau_{ji} \right) - \sum_j \frac{\theta_j \tau_{ij}}{\sum_k \theta_k \tau_{kj}} \right] \quad (C.6)$$

$$\text{com } l_i = \frac{(r_i - q_i) * z}{2} - (r_i - l)$$

Ao invés de listar os parâmetros de volume (r) e de área superficial (q) para cada espécie molecular com o objetivo de usar o modelo UNIQUAC, estes parâmetros são avaliados por um método de contribuição de grupo. A idéia principal é que uma molécula pode ser considerada como uma conjunto de grupos funcionais, e que o volume R_i e a área superficial Q_i do grupo i são aproximadamente o mesmo em qualquer molécula que possui tal grupo.

Deste modo, os parâmetros de volume e área superficial r e q de uma molécula será obtida de uma soma de seus grupos funcionais de parâmetros R e Q . A vantagem desta

abordagem de contribuição de grupos é que, de posse de um número relativamente pequeno de grupos funcionais, pode-se determinar as propriedades de uma ampla variedade de moléculas.

O modelo UNIQUAC é bastante adequando para misturas de espécies muito diferentes, tais como compostos polares ou compostos que se associam (por exemplo, álcoois e outros oxi-hidrocarbonetos) em solventes não-polares (por exemplo, hidrocarbonetos), assim como para espécies que são parcialmente solúveis e formam sistemas bifásicos.

No caso de sistemas bifásicos, a equação UNIQUAC tem somente dois parâmetros ajustáveis para cada sub-sistema binário, que são encontrados para sub-sistemas binários heterogêneos a partir de dados de solubilidade mútua e para sub-sistemas binários homogêneos que podem ser obtidos a partir de dados de equilíbrio líquido-vapor.

Todas as características descritas acima, mostram que a escolha para se adotar este modelo para o sistema água-álcool-hidrocarboneto é apropriada.

Para a descrição dos dados de equilíbrio e parâmetros de ajuste, adotou-se a seguinte nomenclatura.

Fase 1= fase aquosa

Fase 2= fase orgânica

x= fração molar

subscritos: 1 = água

2 = álcool

3 = hidrocarboneto

$A_{ij} \neq A_{ji}$ = parâmetros que caracterizam as interações entre moléculas i e j.

Parâmetros de Ajuste para água-etanol-hexano

$r_1 = 0,920000$	$r_3 = 4,046400$	$A_{21} = -3500,00$
$q_1 = 1,400000$	$q_3 = 3,240000$	$A_{23} = -62,4001$
$r_2 = 2,105500$	$A_{12} = -1013,90$	$A_{31} = -2050,35$
$q_2 = 1,972000$	$A_{13} = 1615,093$	$A_{32} = -232,952$

Tabela C.1- Dados da literatura para água-etanol-hexano (BUENO, 1990)

T (K)	x_1 (fase1)	x_2 (fase1)	x_1 (fase2)	x_2 (fase2)
298,15	0,7373	0,2619	0,0017	0,0210
298,15	0,6482	0,3483	0,0034	0,0303
298,15	0,5541	0,4371	0,0033	0,0434
298,15	0,4322	0,5431	0,0064	0,0678
298,15	0,3217	0,6224	0,0125	0,1081
298,15	0,2562	0,6549	0,0152	0,1463
298,15	0,1817	0,6564	0,0295	0,2239
308,15	0,7395	0,2594	0,0013	0,0267
308,15	0,6481	0,3482	0,0021	0,0366
308,15	0,5542	0,4363	0,0037	0,0536
308,15	0,4366	0,5366	0,0088	0,0821
308,15	0,3205	0,6138	0,0144	0,1293
308,15	0,2516	0,6403	0,0219	0,1784
308,15	0,1709	0,6206	0,0436	0,2949
318,15	0,7419	0,2570	0,0022	0,0315
318,15	0,6511	0,3452	0,0037	0,0476
318,15	0,5554	0,4333	0,0044	0,0637
318,15	0,4385	0,5310	0,0105	0,0977
318,15	0,3179	0,6045	0,0189	0,1610
318,15	0,2455	0,6217	0,0340	0,2277
318,15	0,2102	0,6148	0,0451	0,2775

Parâmetros de Ajuste para água-1-propanol-hexano

$r_1 = 0,920000$	$r_3 = 4,499800$	$A_{31} = 823,7600$
$q_1 = 1,400000$	$q_3 = 3,856000$	$A_{21} = -5,19970$
$r_2 = 2,779900$	$A_{12} = 165,0900$	$A_{23} = -126,270$
$q_2 = 2,512000$	$A_{13} = 184,9300$	$A_{32} = 399,2800$

Tabela C.2- Dados da literatura água-1-propanol-hexano (SORENSEN e ARLT, 1980)

T (K)	x₁ (fase1)	x₂ (fase1)	x₁ (fase2)	x₂ (fase2)
310,95	0,95340	0,04590	0,02303	0,06213
310,95	0,92588	0,07289	0,08293	0,22368
310,95	0,91031	0,08791	0,21834	0,37729
310,95	0,90464	0,09331	0,34035	0,42270
310,95	0,89195	0,10542	0,40774	0,42179

Parâmetros de Ajuste para água-2-propanol-hexano

$r_1 = 0,920000$	$r_3 = 4,499800$	$A_{21} = -15,3550$
$q_1 = 1,400000$	$q_3 = 3,856000$	$A_{23} = -181,030$
$r_2 = 2,779100$	$A_{12} = -453,040$	$A_{31} = 792,5700$
$q_2 = 2,508000$	$A_{13} = 474,5800$	$A_{32} = -67,0220$

Tabela C.3- Dados da literatura água-2-propanol-hexano (SORENSEN e ARLT, 1980)

T (K)	x_1 (fase1)	x_2 (fase1)	x_1 (fase2)	x_2 (fase2)
298,15	0,90513	0,09384	0,00923	0,09401
298,15	0,89695	0,10202	0,01375	0,10168
298,15	0,80027	0,19294	0,05139	0,21179
298,15	0,73281	0,25170	0,07440	0,25517
298,15	0,63925	0,32348	0,10654	0,30038
298,15	0,56053	0,37289	0,15832	0,34758
298,15	0,49847	0,40023	0,18482	0,36643
298,15	0,45393	0,41405	0,22068	0,38259
298,15	0,41315	0,41849	0,26805	0,39976
298,15	0,39097	0,42021	0,29534	0,40754

Parâmetros de Ajuste para água-1-butanol-hexano

$r_1 = 0,920000$	$r_3 = 4,499800$	$A_{21} = -16,3970$
$q_1 = 1,400000$	$q_3 = 3,856000$	$A_{23} = -151,160$
$r_2 = 3,454300$	$A_{12} = 285,5100$	$A_{31} = 1318,100$
$q_2 = 3,052000$	$A_{13} = 633,8300$	$A_{32} = 374,4000$

Tabela C.4- Dados da literatura água-1-butanol-hexano (SORENSEN e ARLT, 1980)

T (K)	x_1 (fase1)	x_2 (fase1)	x_1 (fase2)	x_2 (fase2)
298,15	0,99340	0,00660	0,01332	0,15400
298,15	0,99290	0,00710	0,02810	0,21180
298,15	0,99200	0,00800	0,08820	0,35470
298,15	0,99100	0,00900	0,13330	0,42070
298,15	0,98980	0,01020	0,20750	0,49420
298,15	0,98800	0,01200	0,27000	0,53110
298,15	0,98710	0,01290	0,39180	0,54130

Parâmetros de Ajuste para água-etanol-ciclohexano

$r_1 = 0,9200$	$r_3 = 4,0460$	$A_{21} = -185,30$
$q_1 = 1,4000$	$q_3 = 3,2400$	$A_{23} = -95,392$
$r_2 = 2,1055$	$A_{12} = -167,38$	$A_{31} = 1247,30$
$q_2 = 1,9720$	$A_{13} = 540,36$	$A_{32} = 385,65$

Tabela C.5- Dados da literatura água-etanol-ciclohexano (SORENSEN e ARLT, 1980)

T (K)	x_1 (fase1)	x_2 (fase1)	x_1 (fase2)	x_2 (fase2)
298,15	0,74341	0,25301	0,01470	0,01096
298,15	0,66714	0,32844	0,01594	0,02778
298,15	0,27403	0,61347	0,04780	0,16074

Parâmetros de Ajuste para água-etanol-tolueno

$r_1 = 0,9200$	$r_3 = 3,9228$	$A_{21} = -235,67$
$q_1 = 1,400$	$q_3 = 2,968$	$A_{23} = -32,362$
$r_2 = 2,1055$	$A_{12} = -107,71$	$A_{31} = 678,16$
$q_2 = 1,972$	$A_{13} = 272,30$	$A_{32} = 103,87$

Tabela C.6- Dados da literatura água-etanol-tolueno (SORENSEN e ARLT, 1980)

T (K)	x_1 (fase1)	x_2 (fase1)	x_1 (fase2)	x_2 (fase2)
298,15	0,95320	0,04621	0,00356	0,00398
298,15	0,91360	0,08538	0,00506	0,01385
298,15	0,87856	0,11990	0,00703	0,02552
298,15	0,82021	0,17712	0,01150	0,05210
298,15	0,77323	0,22245	0,01796	0,08849
298,15	0,72623	0,26547	0,02007	0,09905
298,15	0,69166	0,29572	0,02425	0,11970
298,15	0,64420	0,33500	0,03111	0,14779
298,15	0,59615	0,37191	0,03719	0,16672

APÊNDICE D

Propagação de Erros

A análise de Propagação de Erros foi feita segundo MICKLEY *et al.* (1957). Entende-se que, se Q é uma quantidade medida indiretamente a partir de outras variáveis, os erros nas quantidades medidas diretamente levam a um erro na quantidade calculada Q .

Com os valores de cada variável e seus respectivos erros, pode-se estimar os erros característicos de Q .

Podendo escrever Q , como uma função da seguinte forma:

$$Q = f(q_1, q_2, \dots, q_n) \quad (D.1)$$

sua derivada é dada por:

$$dQ = \frac{\partial f}{\partial q_1} dq_1 + \frac{\partial f}{\partial q_2} dq_2 + \dots + \frac{\partial f}{\partial q_n} dq_n \quad (D.2)$$

e substituindo os diferenciais dq_n por incrementos Δq_n , tem-se:

$$\Delta Q = \frac{\partial f}{\partial q_1} \Delta q_1 + \frac{\partial f}{\partial q_2} \Delta q_2 + \dots + \frac{\partial f}{\partial q_n} \Delta q_n \quad (D.3)$$

A Equação (D.3) fornece o erro da variável Q , onde Δq_n é o erro de cada variável q_n .

Especificamente para este trabalho, para se calcular o desvio-padrão de K_I e K_{II} , dados pelas Equações (3.15) e (3.16), tem-se:

$$K_I = \frac{x_1 \times x_4}{x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7} \quad (D.4)$$

$$K_{II} = \frac{x_2 \times x_5}{x_3 \times x_7} \quad (D.5)$$

onde: x_1 : Área_I
 x_2 : Área_{II}
 x_3 : Área_{III}
 x_4 : SAP_I
 x_5 : SAP_{II}
 x_6 : SOLV_I
 x_7 : SOLV_{II}

Definidas as variáveis x_i , tem-se as derivadas de K_I e K_{II} , em relação a cada uma das variáveis :

$$\frac{\partial K_I}{\partial x_1} = \frac{x_4}{x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7} \quad (D.6)$$

$$\frac{\partial K_I}{\partial x_2} = \frac{x_1 \times x_4 \times (-x_6)}{(x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7)^2} \quad (D.7)$$

$$\frac{\partial K_I}{\partial x_3} = \frac{x_1 \times x_4 \times (-x_7)}{(x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7)^2} \quad (D.8)$$

$$\frac{\partial K_I}{\partial x_4} = \frac{x_1}{x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7} \quad (D.9)$$

$$\frac{\partial K_I}{\partial x_6} = \frac{x_1 \times x_4 \times (-x_2)}{(x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7)^2} \quad (D.10)$$

$$\frac{\partial K_I}{\partial x_7} = \frac{x_1 \times x_4 \times (-x_3)}{(x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7)^2} \quad (D.11)$$

$$\frac{\partial K_{II}}{\partial x_2} = \frac{x_5}{x_3 \times x_7} \quad (D.12)$$

$$\frac{\partial K_{II}}{\partial x_3} = \frac{x_2 \times x_5 \times (-1)}{x_3^2 \times x_7} \quad (D.13)$$

$$\frac{\partial K_{II}}{\partial x_5} = \frac{x_2}{x_3 \times x_7} \quad (D.14)$$

$$\frac{\partial K_{II}}{\partial x_7} = \frac{x_2 \times x_5 \times (-1)}{x_7^2 \times x_3} \quad (D.15)$$

Substituindo as Equações (D.6) a (D.15) nas Equações (D.4) e (D.5), determina-se os erros para K_I e K_{II} .

No intuito de obter o máximo erro possível, o sinal de Δx_2 , Δx_3 , Δx_6 , Δx_7 para ΔK_I e Δx_3 e Δx_7 para ΔK_{II} , deve ser negativo e podemos escrever as expressões para ΔK_I e ΔK_{II} , da seguinte maneira:

$$\begin{aligned} \Delta K_I = & \frac{x_4 \times \Delta x_1 + x_1 \times \Delta x_4}{x_2 \times x_6 + x_3 x_7} + \\ & + \frac{x_1 \times x_4 \times x_6 \times \Delta x_2 + x_1 \times x_4 \times x_7 \times \Delta x_3 + x_2 \times x_1 \times x_4 \times \Delta x_6 + x_1 \times x_4 \times x_3 \times \Delta x_7}{(x_2 \times x_6 + x_3 \times x_7)^2} \end{aligned} \quad (D.16)$$

$$\Delta K_{II} = \frac{x_5 \times \Delta x_2 + x_2 \times \Delta x_5}{x_3 x_7} + \frac{x_2 \times x_5 \times \Delta x_3}{x_3^2 \times x_7} + \frac{x_2 \times x_5 \times \Delta x_7}{x_7^2 \times x_3} \quad (D.17)$$

Os valores das variáveis e dos desvios-padrões para os coeficientes de partição para o colesterol e 5 α -colestano, estão listados nas Tabelas D.1 e D.2, respectivamente,

Tabela D.1: Erros dos Coeficientes de Partição do colesterol para os sistemas contendo água-etanol-solvente.

Solvente	Proporção	x_1	Δx_1	x_2	Δx_2	x_3	Δx_3	x_4	Δx_4
Hexano (3 min de agitação)	A=5/10/10	148284	12841	27743	1409	6787	460	15,5	0,14
Hexano (5 min de agitação)	A= 5/10/10	174177	6461	30891	2450	7168	287	15,50	0,14
Hexano	A=5/10/10	132641	6977	25813	1412	5325	202	15,50	0,14
	B=15/10/10	94435	5213	27176	1514	10606	768	24,95	0,21
	C=5/20/10	96106	3921	44732	2599	22643	1610	27,45	0,21
	D=5/10/20	74798	3508	8772	488	1211	110	15,35	0,07
Ciclohexano	A=5/10/10	132866	14469	23456	1851	4171	347	15,90	0,10
	B=15/10/10	115255	3008	33927	807	10106	219	25,20	0,00
	C=5/20/10	115129	5872	45256	2521	18271	857	28,40	0,56
	D=5/10/20	60135	5568	6213	175	ND	ND	15,80	0,00
Tolueno	A=5/10/10	14406	1871	2200	113	ND	ND	15,00	0,40
	B=15/10/10	96217	13355	13871	718	2072	123	25,10	0,35
	D=5/10/20	14743	1853	2568	234	2015	245	15,00	0,00

Tabela D.1: Erros dos Coeficientes de Partição do colesterol para os sistemas contendo água-etanol-solvente (cont.).

Solvente	Proporção	x_5	Δx_5	x_6	Δx_6	x_7	Δx_7	K_1	ΔK_1
Hexano (3 min de agitação)	A=5/10/10	15,17	0,05	10,42	0,13	10,30	0,14	6,4	1,04
Hexano (5 min de agitação)	A= 5/10/10	15,17	0,05	10,42	0,13	10,30	0,14	6,8	0,89
Hexano	A=5/10/10	15,17	0,05	10,42	0,13	10,30	0,14	6,3	0,80
	B=15/10/10	24,90	0,14	10,15	0,21	10,15	0,07	6,1	0,87
	C=5/20/10	26,85	0,21	10,70	0,00	10,65	0,07	3,6	0,41
	D=5/10/20	14,85	0,07	20,50	0,14	20,55	0,07	5,6	0,66
Ciclohexano	A=5/10/10	15,50	0,17	10,33	0,11	10,40	0,10	7,3	1,52
	B=15/10/10	25,20	0,00	10,30	0,00	10,20	0,00	6,4	0,32
	C=5/20/10	27,75	0,35	10,60	0,01	10,55	0,07	4,9	0,61
	D=5/10/20	15,15	0,21	20,75	0,21	20,60	0,14	7,3	0,96
Tolueno	A=5/10/10	12,55	0,63	12,40	0,42	12,03	0,15	7,5	1,92
	B=15/10/10	24,63	0,47	10,53	0,15	10,47	0,12	14	3,16
	D=5/10/20	9,80	0,40	23,60	0,40	22,60	0,23	2,6	0,51

Tabela D.1: Erros dos Coeficientes de Partição do colesterol para os sistemas contendo água-etanol-solvente (cont.).

Solvente	Proporção	K_{II}	ΔK_{II}
Hexano (3 min de agitação)	A=5/10/10	6,0	0,82
Hexano (5 min de agitação)	A= 5/10/10	6,3	0,86
Hexano	A=5/10/10	7,1	0,78
	B=15/10/10	6,2	0,88
	C=5/20/10	4,9	0,72
	D=5/10/20	5,3	0,81
Ciclohexano	A=5/10/10	8,2	1,53
	B=15/10/10	8,3	0,38
	C=5/20/10	6,6	0,79
	D=5/10/20	ND	ND
Tolueno	A=5/10/10	ND	ND
	B=15/10/10	15,2	2,23
	D=5/10/20	1,0	0,15

Tabela D.2: Erros dos Coeficientes de Partição do 5 α -colestano para os sistemas contendo água-etanol-solvente.

Solvente	Proporção	x_1	Δx_1	x_2	Δx_2	x_4	Δx_4	x_5	Δx_5
Hexano (3 min de agitação)	A=5/10/10	184696	16512	2944	195	15,50	0,14	15,17	0,05
Hexano (5 min de agitação)	A= 5/10/10	240329	12449	6136	580	15,50	0,14	15,17	0,05
Hexano	A=5/10/10	217447	10328	2634	143	15,50	0,14	15,17	0,05
	B=15/10/10	200804	8815	3804	329	24,95	0,21	24,90	0,14
	C=5/20/10	295780	12689	9985	591	27,45	0,21	26,85	0,21
	D=5/10/20	102958	6002	1264	56	15,35	0,07	14,85	0,07
Ciclohexano	A=5/10/10	236709	35483	3297	381	15,90	0,10	15,50	0,17
	B=15/10/10	257714	13633	11346	455	25,20	0,0	25,20	0,00
	C=5/20/10	327563	19228	9175	994	28,40	0,56	27,75	0,35
	D=5/10/20	115993	5486	1324	86	15,80	0,00	15,15	0,21
Tolueno	A=5/10/10	213479	19832	4564	691	15,00	0,40	12,55	0,63
	B=15/10/10	221326	11863	7757	399	25,10	0,35	24,63	0,47
	D=5/10/20	98242	5148	1995	177	15,00	0,00	9,8	0,40

Tabela D.2: Erros dos Coeficientes de Partição do 5 α -colestano para os sistemas contendo água-etanol-solvente (cont.).

Solvente	Proporção	x_6	Δx_6	K_I	ΔK_I
Hexano (3 min de agitação)	A=5/10/10	10,42	0,13	93,5	16,53
Hexano (5 min de agitação)	A= 5/10/10	10,42	0,13	57,6	9,78
Hexano	A=5/10/10	10,42	0,13	122	15,14
	B=15/10/10	10,15	0,21	130	20,70
	C=5/20/10	10,70	0,00	75	8,34
	D=5/10/20	20,50	0,14	61	6,95
Ciclohexano	A=5/10/10	10,33	0,11	109	31,21
	B=15/10/10	10,30	0,00	55	5,17
	C=5/20/10	10,60	0,01	96	17,95
	D=5/10/20	20,75	0,21	66	8,16
Tolueno	A=5/10/10	12,40	0,42	54	17,25
	B=15/10/10	10,53	0,15	66	9,06
	D=5/10/20	23,60	0,40	39	5,46

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKADIROVA, K. S. e KHOKHLACHEV, S. P.. Prediction of phase equilibria in hydrocarbon + near-critical solvent systems. *Fluid Phase Equilibria*, v.140 n. 1-2, p. 73-85, 1997.

ADAMS, M. L.; SULLIVAN D. M.; SMITH, R. L.; RICHTER, E. F.. Evaluation of direct saponification method for determination of cholesterol in meats. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v. 69, n. 5, p. 844-846, 1986.

AL-HASANI, S. M.; HLAVAC, J.; CARPENTER, M. W.. Rapid determination of cholesterol in single and multicomponent prepared foods. *Journal of AOAC International*, v. 76, n. 4, p. 902-906, 1993.

ALONSO, L.; LOZADA, L.; FONTECHA, J.; JUÁREZ, M.. Determination of cholesterol in milk fat by gas chromatography with direct injection and sample saponification. *Chromatographia*, v. 41 n. 1/2, p. 23-28, 1995.

AOAC Official Methods of Analysis. 12th Edition. Supl. 2. 1976.

AOAC Official Methods of Analysis. 16th Edition. v. 2. 1997.

BAR, L. K.; GARTL, N.; SARLG, S.; BAR, R.. Solubilities of cholesterol, sistosterol, and cholesteryl acetate in polar organic solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*. v. 29, n. 4, p. 440-443, 1984.

BELOUSOV, V. P. e PANOV, M. Y.. *Thermodynamic properties of aqueous solutions of organic substances*. Translated from the Russian by Nicholas N. Bobrov. London: CRC Press, 1994, 368p.

BERRY, R. S.; RICE, S. A.; ROSS, J. *Physical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1980, 1264p.

BEYER, J. D.; MILANI, F. X.; DUTELLE, M. J.; BRADLEY JR, R. L.. Gas chromatographic determination of cholesterol in eggs products. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v. 72 n. 5, p. 746-748, 1989.

BITMAN, J. e WOOD, D. L.. Cholesterol and cholesteryl esters of eggs from various avian species. *Poultry Science*, v. 59 n. 9, p. 2014-2023, 1980.

BOHAC, C. E.; RHEE, K. S.; CROSS, H. R.; ONO, K.. Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. *Journal of Food Science*, v. 53, n. 6, p. 1642-1644, 1988.

BRAGAGNOLO, Neura. *Determinação dos teores de colesterol em carnes, ovos e massas com ovos*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 1992. 105p. Tese (Mestrado).

BRAGAGNOLO, Neura. *Fatores que influenciam o nível de colesterol, lipídios totais e composição de ácidos graxos em camarão e carne*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 1997. 123p. Tese (Doutorado).

BRUNHARA, Susicler. S. *Otimização do processo de extração de colesterol do óleo de manteiga utilizando extrato de quilaia saponaria*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 1997. 89p. Tese (Mestrado).

BUENO, Sônia Maria Alves. *Equilíbrio líquido-líquido de misturas ternárias água-etanol-hexano*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 1990. 234p. Tese (Mestrado).

CHOU, T.; TANIOKA, A.; TSENG, H.. Salting effect on the liquid-liquid for the partially miscible systems of n-propanol-water and i-propanol-water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 37, n. 5, p. 2039-2044, 1998.

- CHRISTIE, W. W.. *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. 1st ed.. Scotland: The Oily Press, 1989, 307p.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 5 ed.. Campinas: Editora da UNICAMP, 1993, 279p.
- DOMANSKA, U.; KLOFUTAR, C.; PALJK, S.. Solubility of cholesterol in selected organic solvents. *Fluid Phase Equilibria*. v. 97, p. 191-200, 1994.
- FENTON, M. e SIM, J.S.. Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 540, n. 1-2, p. 323-329, 1991.
- FIESER, L. F. e FIESER, M.. *Química orgânica fundamental*. Rio de Janeiro.. Editorial Reverté, S.A., 1967, 376p.
- FLYNN, G.L.; SHAH, Y.; PRAKONGPAN, S.; KWAN, K. H.; HIGUCHI, W. I.; HOFMANN, A. F.. Cholesterol solubility in organic solvents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 68, n. 9, p. 1090-1097, 1979.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H.. A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. v. 226, p. 497-509, 1957.
- FOSTER, B.W.; ROBESON, J.; TAGATA, N.; BECKERDITE, J.M.; HUGGINS, R. L.; ADAMS JR, E.T.. Self-association of cholesterol in nonaqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry*. v. 85, n. 24, p. 3715-3720, 1981.
- GLASSTONE, S.. *Textbook of physical chemistry*. 1st. New York: D. Van Nostrand Company, 1940, 1289p.
- GOMIS, V.; RUIZ, F.; SAQUETE, M. D.. Salts effects in extraction of ethanol from aqueous solution: 2-ethylhexane + sodium chloride as the solvent. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. v. 37, n. 2, p. 599-603, 1998.
- GORÁLSKI, P.. Volumetric manifestation of van der Waals interactions between cholesterol and organic solvents of linear structure. *Fluid Phase Equilibria*. v. 167, n. 2, p. 207-221, 2000.

HARPER, H. A.; RODWELL, U. W.; MAYES, P. A.. *Manual de Química Fisiológica*. 5ª ed.. São Paulo: Ateneu Editora São Paulo Ltda. 1977. 600p.

HARTMAN, L.; VIANA, H. S.; FREITAS, S. Modified method for the determination of unsaponifiable matter in oils and fats. *Analyst*. v. 119, n. 8, p. 1793-1795, 1994.

HILDEBRAND, H. J. e SCOTT, R. L. *The solubilities of nonelectrolytes*. 3rd. New York: Dover Publications, 1964, 488p.

JIANG, Z.; FENTON, M.; SIM, J. S.. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination. *Poultry Science*, v. 70, n. 4, p. 1015-1019, 1991.

KARKALAS, J.; DONALD, A. E.; CLEGG, K. M.. Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymic and gas-liquid chromatography methods. *Journal of Food Technology*, v. 17, n. 2, p. 281-283, 1982.

KOVACS, M. I. P.; ANDERSON, W. E.; ACKMAN, R. G. A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. *Journal of Food Science*, v. 44, n. 5, p. 1299-1301, 1979.

LETCHER, T. M.; BRICKNELL, B.C.. Liquid-liquid equilibria for mixtures of an alkanol + hept-1-ene + water at 25° C. *Journal of Chemical and Engineering Data*. v. 39, n. 2, p. 320-323. 1994.

LETCHER, T. M. e SISWANA, P. M.. Liquid-liquid equilibria for mixtures of na alkanol + water + a methyl benzene at 25° C. *Fluid Phase Equilibria*. v. 74, p. 203-217., 1992.

MARASCHIELO, C.; DIAZ, I. e REGUEIRO, J. A. G.. Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 19, n. 3, p. 165-168, 1996.

MARCILLA, A.; RUIZ, F.; GARCÍA, A.N.. Liquid-liquid-solid equilibria of the quaternary system water-ethanol-acetone-sodium chlorine at 25° C. *Fluid Phase Equilibria*. v. 112, n. 2, p. 273-289. 1995.

MAURICE, D.V.; LIGHTSEY, S. F.; HSU, K. T.; GAYLORD, T. G.; REDDY, R. V.. Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC. *Food Chemistry*, v. 50, n. 4, p. 367-372, 1994.

- MERTSLIN, R. V.; NIKURASHINA, N. I.; PETROV, V. A.. Properties of the heterogeneous region in ternary systems incorporating a dominant binary system. III. *Russian Journal of Physical Chemistry*, v. 35, n. 12, p. 1369-1372, 1961.
- MICKLEY, H. S.; SHERWOOD, T. K.; REED, C. E.. *Applied mathematics in chemical engineering*. 2nd. McGraw-Hill Book Company, 1957, 413 p.
- MORIYOSHI, T; UOSAKI, Y.; MATSUURA, H.. Liquid-liquid equilibria of water-ethanol-n-hexane from 0,1 to 200 Mpa at 298.15K. *J. Chem. Thermodynamics*. v. 20, n. 5, p. 551-557, 1988.
- MORRONE, Simone Ribeiro. *Determinação experimental do volume excesso de soluções de Ciclohexano/ 2-propanol, Ciclohexano/ 2-butanol, N-hexano/ 2-propanol e N-hexano/ 2-butanol a 298,15 K e a 288,15 K e aplicação do modelo ERAS*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 1994. 80p. Tese (Mestrado).
- NOTA, G.; NAVIGLIO, D.; ROAMNO, R.; SABIA, V.; MUSSO, S. S.. Evaluation and improvement of transesterification methods of triglycerides. *Analytical Letters*. v. 31, n. 14, p. 2499-2512. 1998
- NOVÁK, J. P.; MATOUS, J. e PICK, J.. *Liquid-liquid equilibria*. Czechoslovakia: Elsevier, 1987, 321 p.
- OLAYA, M. M.; CONESA, J. A.; MARCILLA, A.. Salt effect in the quaternary system water + ethanol + 1-butanol + potassium chloride at 25° C. *Journal of Chemical and Engineering Data*. v. 42, n. 5, p. 858-864. 1997.
- PARK, S. W. e ADDIS, P. B.. Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 34, n. 4, p. 653-659, 1986.
- PATERSON, E.; AMADÒ, R.. Simplified method for the simultaneous gas chromatographic determination of fatty acid composition and cholesterol in food. *Lebensm. -Wiss. U. -Technol.* v. 30, n. 2, p. 202-209. 1997.
- PERRY, R. H. & GREEN, D. W.. *Perry's Chemical Engineer's Handbook*. 7th Edition. McGraw-Hill International Editions. 1998

PESSOA FILHO, Pedro de Alcântara. *Equações de estado para compostos auto-associativos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 1998. 164 p. Tese (Mestrado).

PUNWAR, J. K.. Gas-liquid chromatographic determination of total cholesterol in multicomponent foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. V. 58, n. 4, p. 804-810, 1975.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E.. "Properties of gases and liquids". 4th ed.. New York: McGraw-Hill International Editions, 1987, 741p.

RHEE, K. S.; DUTSON, T. R.; SMITH, G. C.; HOSTETLER, R. L.; REISER, R.. Cholesterol content of raw and cooked beef longissimus muscles with different degrees of marbling. *Journal of Food Science*, v. 47, n. 3, p. 716-719, 1982.

RODRIGUES-PALMERO, M.; de la PRESA-OWENS, S.; CASTELLOTE-BARGALLO, A.I.; SABATER, M. C. L.; RIVERO-URGELL, M.; de la TORRE-BORONAT, C.. Determination of sterol content in different food samples by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 672, n. 1/2, p. 267-272. 1994.

ROSS, S. e PATTERSON, R. E.. Surface and interfacial tensions of conjugates solutions in ternary systems. *Journal of Chemical and Engineering Data*. v. 24, n. 2, p. 111-115, 1979.

SANDLER, S. I.. *Chemical and engineering thermodynamics*. 2nd. New york: John Wiley & Sons, 1989, 622p.

SCHWEPPE, J. L. e LORAH, J. R.. Ternary system ethyl alcohol-n-heptane-water at 30° C. *Industrial and Engineering Chemistry*. v. 46, n. 11, p. 2391-2392, 1954.

SLOVER, H. T.; THOMPSON Jr.; R. H. e MEROLA, G. V.. Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 8, p. 1524-1528, 1983.

SOLOMONS, T. W. G.. *Organic chemistry*. 5th. New York: John Wiley & Sons, 1992, 1198 p.

SORENSEN, J. e ARLT, W.. *Liquid-liquid equilibrium data collection*. Dechema Chemistry Data Series. v. 5. Parte 2 e 3. Frankfurt, 1980.

STRINGUETO, K.. Sirva-se com o melhor. *Istoé*. n. 1555, p. 130-133, 1999.

TAN, T. C.; ARAVINTH, S.. Liquid-liquid equilibria of water/acetic acid/1-butanol system – effects of sodium (potassium) chloride and correlations. *Fluid Phase Equilibria*. v. 163, n. 2, p. 243-257. 1999.

THOMPSON, R. H.; MEROLA, G. V.. A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multicomponent foods. *Journal of AOAC International*. v. 76, n. 5, p. 1057-1068. 1993.

TREYBAL, R. E.. *Liquid extraction*. 1st. New York: McGraw-Hill Book Company, 1951. 422p.

ULBERTH, F. e REICH, H.. Gas chromatography determination of cholesterol in processed foods. *Food Chemistry*. v. 43, n. 5, p. 387-391, 1992.

VAN ELSWYK, M. E.; SCHAKE, L. S.; HARGIS, P. S.. Research note: evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol. *Poultry Science*. v. 70, n. 5, p. 1258-1260, 1991.

WEAST, R. C.; SELBY, S. M. e HODGMAN, C. D.. *Handbook of chemistry and physics: a ready reference book of chemical and physical data*. 46th. Ohio. Chemical Rubber Publishing Company, 1965.

ZAK, B. Cholesterol methodologies: a review. *Clinical Chemistry*, v. 23, n. 7. p.1201-1214, 1977.

ZERRES, H. e PRAUSNITZ, J. M.. Thermodynamics of phase equilibria in aqueous-organic systems with salt. *AIChE Journal*, v. 40, n. 4, p. 676-691, 1994.