

GERSON DE FREITAS SILVA VALENTE

REMOÇÃO DE COLESTEROL DA GORDURA DO LEITE POR ADSORÇÃO
EM SÍLICA GEL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

Aos meus pais José Maria e Suzana.
À minha irmã Gislene.
Aos meus familiares.
Aos amigos e companheiros.
À minha querida esposa Luciana Duarte O. Valente.
A Deus, pela felicidade.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pelo Programa de Pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido durante o mestrado.

Ao professor orientador Sebastião César Cardoso Brandão, pelo acompanhamento.

Aos professores conselheiros June Ferreira Maia Parreiras e José Carlos Gomes, pela ajuda.

Ao professor José Antônio, por dispor do seu tempo para discussão do trabalho.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Ao Conselho de Pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora.

Ao corpo docente e técnico administrativo do DTA.

Ao colegas da pós-graduação.

Ao técnico Washington, do Laboratório de Análise de Alimentos.

Aos colegas, Carlos Henrique Baltazar e Luís Sampaio, pela contribuição nas atividades iniciais, no laboratório.

BIOGRAFIA

GERSON DE FREITAS SILVA VALENTE, filho de José Maria e Suzana, nasceu em 15 de dezembro de 1973, em Viçosa-MG.

Em 1993, iniciou o Curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em dezembro de 1997.

Em março de 1998, começou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do professor Sebastião César Cardoso Brandão, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 2000.

CONTEÚDO

	PÁGINAS
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O Colesterol e as gorduras saturadas em alimentos.....	4
2.2. Distribuição do colesterol na gordura do leite	8
2.3. Limitação à produção de alimentos com colesterol reduzido	10
2.4. Redução de colesterol em alimentos	10
2.5. Tecnologias para redução do colesterol do leite	11
2.5.1. Processos biológicos	13
2.5.2. Processos químicos	15
2.5.2.1. Processos de complexação e extração por solventes	15
2.5.3. Processos físicos.....	16
2.5.3.1. Substitutos de gordura.....	16
2.5.3.2. Destilação de vapor à vácuo.....	17
2.5.3.3. Destilação molecular de via curta (Short path distillation) ...	18
2.5.3.4. Extração com fluido supercrítico	18
2.5.4. Cromatografia preparativa	21

2.5.4.1. Fatores importantes em separações por cromatografia preparativa.....	21
2.7. Métodos para análise quantitativa de colesterol.....	22
2.7.1. Cromatografia gasosa	24
2.7.2. Cromatografia líquida de alto desempenho.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Preparação do óleo de manteiga	26
3.1.1. Dispositivo experimental.....	26
3.1.1.1. Delineamento experimental	30
3.2. Metodologia da análise quantitativa de colesterol do óleo de manteiga	31
3.2.1. Análise de colesterol por HPLC.....	31
3.2.2. Análise dos resultados de adsorção do colesterol em leito de sílica	31
3.2.3. Análise de produtos de oxidação do colesterol por HPLC	32
3.2.4. Condições cromatográficas e equipamentos para análise de colesterol e produtos de sua oxidação	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Análise do óleo de manteiga por cromatografia	34
4.1. Curvas de adsorção do colesterol	36
4.2.1. Efeito da Temperatura	36
4.2.2. Efeito da altura do leito.....	40
4.2.3. Efeito da Granulometria da Sílica	44
4.3. Influência das variáveis na quantidade máxima de colesterol adsorvido.....	52
4.4. Efeito dos tratamentos na produção de óxidos de colesterol	56
5. RESUMO E CONCLUSÕES	59
6. RECOMENDAÇÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

VALENTE, Gerson de Freitas Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2000. **Remoção de Colesterol da Gordura do Leite por Adsorção em Sílica Gel**. Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Conselheiros: June Ferreira Maia Parreiras e José Carlos Gomes.

O processo de remoção de colesterol da gordura de leite por adsorção em sílica gel foi avaliado como uma alternativa para a elaboração de produtos lácteos com baixo teor de colesterol. A remoção do colesterol do óleo de manteiga foi estudada em colunas de diâmetro interno de 22 mm, que foram preparadas "in loco" usando 10,0 g, 12,5 g e 15,0 g de sílica, utilizando as temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C para a sílica gel com duas granulometrias, que foram de 5 µm a 40 µm e de 45 µm a 60 µm. Os dados experimentais mostraram que é possível produzir óleo de manteiga com uma redução de até 95% na concentração de colesterol nas primeiras frações da fase móvel. Adsorção de até 10,1 mg de colesterol injetado por grama de sílica foi obtida, equivalente a 3,1 mL de óleo produzido para cada grama do adsorvente para a sílica de menor granulometria. Para a sílica de maior granulometria foi adsorvido até 6,9 mg de colesterol injetado por grama do adsorvente, isto é, uma relação de até 1,7 mL de óleo de manteiga por grama de sílica de maior granulometria. Foi possível verificar que nos tratamentos testados, a concentração de produtos da oxidação do colesterol foram inferiores a 10 µg/g de óleo para o óxido 25-hidroxicolesterol e 5 µg/g de óleo para o óxido 7-β-hidroxicolesterol logo após o processo. Portanto, com base nos resultados,

pode-se afirmar que a técnica é uma alternativa promissora para a remoção de colesterol da gordura do leite.

ABSTRACT

VALENTE, Gerson de Freitas Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, december of 2000. **Removal of Cholesterol of the Milk Fat by Adsorption on Sílica Gel.** Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. Committee members: June Ferreira Maia Parreiras and José Carlos Gomes.

The process of cholesterol removal of milk fat by adsorption on sílica gel was evaluated as an alternative for the "cholesterol-reduced" elaboration of milk products. Cholesterol removal of butter oil was studied in columns of same diameter, with variations in the height of the bed, the temperature and the particles size distribution of the sílica. The columns were prepared "in loco" with 10,0 g, 12,5 g and 15,0 g of sílica, temperatures used were 70°C, 80°C and 90°C and particles size distribution for the sílica was of 5 µm to 40 µm and 45 µm to 60 µm. The experimental data showed that it is possible to produce butter oil with a reduction of up to 95 % in the cholesterol concentration for the first eluated. Adsorption of up to 10,1 mg of injected cholesterol for each gram of sílica or a relationship of up to 3,1 mL cholesterol reduced butter oil produced for each gram of the adsorbent was obtained for the sílica of smaller particle size distribution and a relationship of up to 6,9 mg of injected cholesterol for each gram of adsorbent or a relationship of up to 1,7 mL cholesterol reduced butter oil produced for each gram of the sílica was obtained for the sílica of larger particle size distribution. Analysis by HPLC determined that concentration of cholesterol oxides were below the detector limite (10 µg/g oil for the oxide 25-hidroxicolesterol and 5 µg/g oil for the oxide 7-β-hidroxicolesterol).

1. INTRODUÇÃO

O colesterol é uma pequena molécula que recebeu grande atenção na Biologia. Treze Prêmios Nobel foram dados a cientistas que dedicaram grande parte de suas carreiras ao colesterol. Desde que foi isolado de cálculos biliares, em 1784, o colesterol tem exercido uma fascinação quase hipnótica em cientistas das mais diversas áreas da ciência e da medicina (DEHAL et al., 1991).

Apesar de ser visto como um causador em potencial de danos à saúde, o colesterol é um composto de grande importância biológica nos animais, visto que é um precursor da formação de ácidos biliares, corticosteróides, hormônios sexuais, da vitamina D e atua na regulação da absorção de lipídeos no trato gastrointestinal e na atividade do seu transporte através da membrana. O colesterol é também essencial para o crescimento e a multiplicação de uma grande variedade de células (DEHAL et al., 1991).

A concentração de colesterol, que pode ser considerada benéfica à saúde humana, não deve ultrapassar 200 mg/dL de sangue, sendo que o LDL (lipoproteínas de baixa densidade) deve ser menor que 130 mg/dL (FELDMAN, 1994). Cerca de 33% da população brasileira possui concentração de colesterol no sangue acima desse valor. Nessa condição, as concentrações plasmáticas de lipoproteínas transportadoras de colesterol ou triglicerídeos excedem o limite considerado normal. As complicações decorrentes vão desde o desenvolvimento acelerado de arteriosclerose, podendo levar ao enfarto e à trombose (ROSSI, 1998).

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 1994), no Brasil, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 300 mil óbitos anuais e representam os maiores custos da Previdência Social, resultantes de licenças e aposentadorias. Em 1988, essas doenças causaram 15% das mortes na faixa etária de 15 a 44 anos, atingindo, assim, pessoas jovens em plena fase produtiva. Esses dados evidenciam a magnitude do problema das doenças cardiovasculares no quadro geral das patologias do país.

Medidas isoladas para reduzir a concentração de colesterol no sangue, relacionadas com a dieta, têm sido, freqüentemente, insuficientes. Torna-se necessária a associação destas com drogas hipolipidêmicas, capazes de reduzir a síntese endógena de colesterol ou melhorar a eficiência de sua remoção do plasma. No entanto, efeitos colaterais indesejáveis resultantes do uso de tais medicamentos, aliados ao seu elevado custo associado ao seu uso, têm motivado a procura de novas estratégias nutricionais e, ou, farmacológicas, para prevenção da arteriosclerose (SALVA, 1996).

As principais fontes alimentares de colesterol são de origem animal, como o ovo, os produtos cárneos, e o leite e derivados. Está ocorrendo uma mudança de hábito de consumo de lipídeos animais por vegetais, de manteiga por margarina, de carne vermelha por carne branca e de leite integral por desnatado ou com baixos teores de gordura. Se o colesterol pudesse ser extraído ou reduzido significativamente nesses alimentos, a ingestão e a recomendação desse tipo de alimento seria facilitada frente ao seu alto valor nutricional.

Atualmente, existem várias tecnologias disponíveis para a redução de colesterol em alimentos, entre elas, a destilação de vapor a vácuo, a destilação molecular de via curta, a extração com fluido supercrítico, a aplicação de enzimas, além do uso de complexantes e substitutos de gordura, extração com solventes e o processo de adsorção. Há algumas barreiras, já que alguns métodos impossibilitam a utilização do produto após o tratamento da extração, por exemplo, o leite pode não ser apropriado para a produção de queijo, por não mais ser capaz de coagular. Outro problema é a possibilidade de oxidação do colesterol durante a extração, pois o produto final pode conter substâncias tóxicas, impossibilitando o consumo.

O objetivo geral desta pesquisa foi estudar o efeito de algumas variáveis de processo, temperatura do óleo de manteiga, granulometria e altura do leito de sílica, na remoção do colesterol da gordura do leite por adsorção e também verificar a possível formação de produtos de oxidação do colesterol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro problema associado à presença de colesterol em alimentos é que há indivíduos para os quais existe uma relação direta entre a quantidade de colesterol ingerida e a sua concentração no sangue e, conseqüentemente, com o risco de doenças cardiovasculares. Outro problema diz respeito à toxicidade dos produtos da sua oxidação (SALVA, 1996).

Mais recentemente têm-se encontrado evidências de que vários produtos de autoxidação do colesterol estão também relacionados a doenças coronarianas, além de serem potencialmente citotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos (SALVA, 1996). Produtos da autoxidação do colesterol, como, por exemplo, o 25-hidroxicolesterol, um inibidor da biossíntese do colesterol, foram detectados em ovos desidratados por processo de atomização (spray dryer) (SALVA, 1996).

2.1. O Colesterol e as gorduras saturadas em alimentos

O colesterol (Figura 1) é um esteroide animal extremamente importante, encontrado em todas as células e tecidos animais e humanos. O ser humano adulto médio contém cerca de 150 g de colesterol e sintetiza de 700 mg a 1.500 mg de colesterol diariamente, para repor as perdas fecais e outras. O colesterol tem diversas funções vitais. No intestino, os ácidos biliares (entre os compostos, o colesterol) modulam a absorção de gordura alimentar. Ele é um componente muito importante das membranas celulares e dos nervos. O

colesterol também é o precursor dos hormônios esteróis do córtex da glândula supra-renal, de hormônios sexuais masculinos e femininos, de vitamina D, e é essencial para o crescimento e desenvolvimento de mamíferos jovens (GURR, 1992).

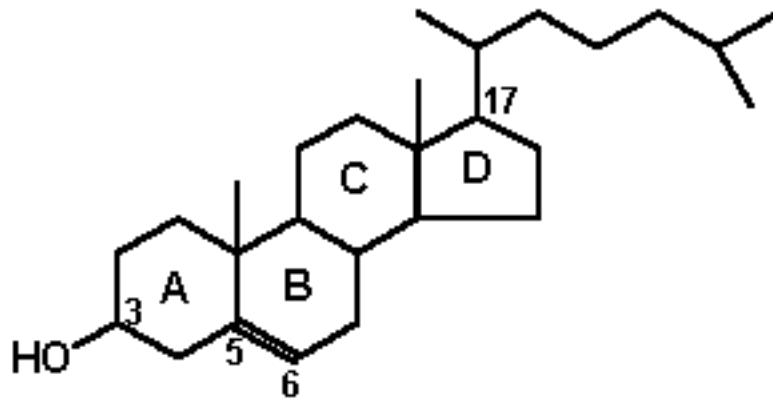


Figura 1 - Estrutura Química do Colesterol.

O colesterol é encontrado em diversos alimentos, em concentrações bem variáveis (Quadro 1). Concentrações altas de colesterol em ovo e em leite tem, por exemplo, induzido a redução do consumo desses alimentos, com as conseqüentes desvantagens nutricionais e a necessidade de adaptações tecnológicas de processos já bem definidos (SALVA, 1996).

O grande interesse no metabolismo de gorduras e óleos desenvolveu-se nos anos 50, quando ocorreram as primeiras descobertas sobre a influência de gordura saturada na dieta e sobre o aumento da taxa de colesterol no plasma, já que a ingestão de gorduras saturadas pode aumentar em até duas vezes o teor de colesterol plasmático, em comparação com as gorduras poliinsaturados (HAYES, 1996).

Quadro 1 - Concentração de colesterol em diferentes alimentos

Alimento		% de Gordura	Concentração de Colesterol (mg/100g do produto)
Leite humano		4,0	25
Leite de vaca		3,8	12,3
Leite desnatado		0,1	3
Queijos:	Brie	27,9	100
	Camembert	22,3	62
	Cheddar	32,3	100
	Roquefort	29,8	88
	Frescal	31,5	103
	Gouda	29,2	114
	Parmesão	25,8	68
	Quark	5,1	17
Ovo Integral		14,4	396
Manteiga		83,2	240
Banha		99,7	86
Carne de vaca	Músculo	1,9	60
Carne de porco	Músculo	1,9	65
	Fígado	5,7	340

Fonte: SIEBER, 1993.

A gordura saturada e os ácidos graxos saturados não são totalmente deletérios, e uma quantidade segura de gordura saturada ingerida pode ser tão benéfica quanto o HDL (*High Density Lipoprotein* – lipoproteína de alta densidade), que remove o excesso de triglicérides do sangue e transporta o colesterol dos tecidos periféricos de volta ao fígado (HAYES, 1996). Os ácidos graxos “trans” não são metabolizados como as gorduras monoinsaturadas e sim como as saturadas, que reduzem o HDL, enquanto aumentam o LDL (*Low Density Lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade), que faz o transporte do colesterol do fígado para as artérias (O'DONNEL, 1993).

As doenças cardíacas coronarianas, principalmente arteriosclerose (Figura 2), despertam a atenção sobre as gorduras. De modo geral, as pessoas acreditam que as gorduras saturadas simplesmente aumentam a taxa de colesterol sangüíneo e que as polinsaturadas reduzem-no. Isso não constitui verdade absoluta, pois os ácidos graxos trans, obtidos por exemplo na hidrogenação de óleos vegetais, induzem a formação de colesterol endógeno, elevando a concentração deste no sangue (HAYES, 1996).

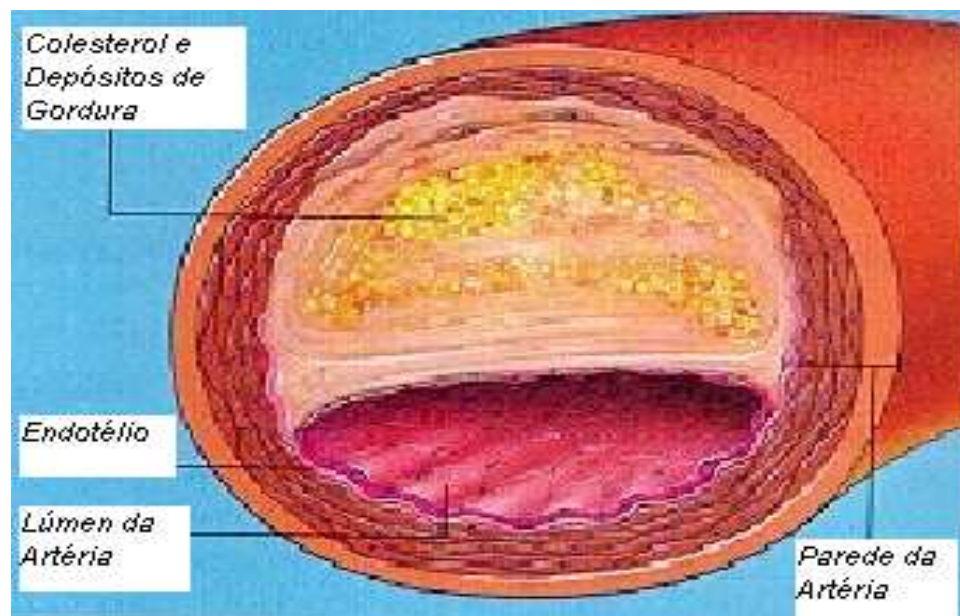


Figura 2 - Representação gráfica da Arteriosclerose.

Na verdade, os ésteres de colesterol vindos da dieta são hidrolisados no trato intestinal, mas a re-esterificação ocorre em grande escala durante a absorção. O colesterol é incorporado nos quilomícrons formados na mucosa intestinal e é transportado pelo sistema linfático até o fígado. Sua absorção é dependente da absorção de gorduras e é estimulada pela presença de ácidos graxos. Assim, o colesterol vai até o fígado ligado nos quilomícrons, que são as lipoproteínas maiores e de mais baixa densidade. Quando os quilomícrons passam pelo fígado, grande parte dos ésteres de colesterol é hidrolisada e o colesterol captado pelo fígado. Uma lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), é formada no fígado e se constitui de partículas ricas em triglicerídeos. O colesterol é transportado do fígado para o plasma através da VLDL. No plasma, o colesterol é transportado como lipoproteína, sendo a proporção mais elevada encontrada nas LDL (lipoproteínas de baixa densidade), formadas a partir das VLDL. Finalmente, a LDL é desdobrada e o colesterol captado pelos tecidos. Somente o colesterol livre é incorporado em membranas. O excesso de colesterol livre deixa a célula e é levado até o fígado ligado a HDL (lipoproteína de alta densidade) plasmática. Parece que a HDL desempenha o papel principal na remoção do excesso de colesterol, evitando seu acúmulo nos vasos sanguíneos (ZACOUR, 1988).

2.2. Distribuição do colesterol na gordura do leite

O leite não é uma emulsão de óleo em água simplesmente, mas muitas de suas propriedades podem ser explicadas por esse modelo. Quase toda a gordura do leite está na forma de pequenos glóbulos de gordura. A gordura consiste de vários componentes que variam de composição entre os próprios glóbulos do leite de uma mesma vaca. Os glóbulos de gordura diferem tanto no tamanho como na sua própria composição química (MULDER e WALSTRA, 1974).

O Quadro 3 exemplifica como a concentração de colesterol em produtos lácteos não é diretamente proporcional ao conteúdo de gordura.

Quadro 3 - Concentração (%) de gordura e colesterol em alguns produtos lácteos

Produto	Gordura	Fosfolípidos	Colesterol	Ácidos graxos livres
Leite	4,0	0,035	0,014	0,008
Leite desnatado	0,06	0,015	0,002	0,002
Creme	40	0,21	0,12	0,06

Fonte: MULDER e WALSTRA, 1974.

O colesterol representa 95% dos esteróis do leite de vaca. Outros esteróis incluem os compostos de vitamina D (o ergocalciferol, o colecalciferol e seus metabólitos 25-hidroxilados) e os hormônios esteróides, que ocorrem em níveis traços (MATILLA e PIIRONEN, 1995).

Os esteróis do leite são encontrados esterificados e livres, constituindo o principal componente da matéria insaponificável da gordura (PINHEIRO e MOSQUIM, s.d). No leite, a maior parte do colesterol está na forma livre. Menos de 10% são encontrados como ésteres de colesterol (KOSIKOWSKI, 1990).

A maior parte do colesterol no leite está na gordura livre e no glóbulo de gordura. Neste último, porém, está distribuído irregularmente entre o colesterol livre no interior e na superfície da lipoproteína e, ainda, uma pequena quantidade na forma de éster (KOSIKOWSKI, 1990).

A camada superficial das lipoproteínas do glóbulo de gordura é rica em colesterol. Esta camada contém em média 2% a 3% do peso do glóbulo de gordura, mas contém cerca de 10% do colesterol do glóbulo (KOSIKOWSKI, 1990).

A concentração de colesterol no leite e seus derivados é bastante variável. Por exemplo, um leite que contenha cerca de 4 mg de colesterol por grama de gordura, usado no processamento de queijo maturado, resulta em um produto com aproximadamente 3 mg de colesterol por grama de gordura, enquanto o creme removido do leite poderia ter até 16 mg de colesterol por grama de gordura. Essa concentração reflete a distribuição irregular no glóbulo de gordura e o efeito do método usado para o processamento (KOSIKOWSKI, 1990).

2.3. Limitação à produção de alimentos com colesterol reduzido

É cada vez maior a preocupação de consumidores com o nível de colesterol em seus alimentos, mas existem algumas barreiras à elaboração de produtos com baixas concentrações de colesterol. Entre elas, pode-se destacar as desvantagens dos métodos atualmente utilizados para a redução de colesterol. Alguns métodos impossibilitam a utilização do produto após o tratamento da extração, por exemplo, o leite pode não ser apropriado para a produção de queijo, por não mais ser capaz de coagular. Outro problema é a possibilidade de oxidação do colesterol durante a extração, pois o produto final pode conter substâncias tóxicas, impossibilitando o consumo (KOSIKOWSKI, 1990).

2.4. Redução de colesterol em alimentos

SCHRODER e BAER (1991) concluíram em um estudo que 44% dos americanos têm mudado os hábitos alimentares em função do colesterol.

Segundo pesquisa realizada em 1990, pelo *Food Marketing Institute* nos Estados Unidos, 60% dos entrevistados eliminaram manteiga de sua dieta e isso implica em uma redução de aproximadamente 1,5 kg/ano per capita nas vendas.

De acordo com a *National Milk Marketing Board*, o consumo por residência caiu 13%, no ano de 1989. As estatísticas de consumo do gênero, em 1990, nos Estados Unidos, foram de 70% para o consumo de margarina e 30% para o consumo de manteiga (SCHRODER e BAER, 1991).

SCHRODER e BAER (1990) associaram a redução no consumo de manteiga aos novos hábitos alimentares, que se caracterizam pela busca de alimentos com ausência ou com níveis reduzidos de colesterol.

Produto com baixíssimas concentrações de colesterol (*cholesterol-free*), tornou-se um rótulo quase que obrigatório em muito alimentos industrializados nos EUA (KOSIKOWSKI, 1990). A venda de alimentos com baixa concentração de colesterol e com baixo teor de gordura foram estimadas em 33 bilhões de dólares, no mesmo país, em 1991 (SCHRODER e BAER, 1991).

2.5. Tecnologias para redução do colesterol do leite

Várias tecnologias têm sido desenvolvidas para reduzir a concentração ou eliminar o colesterol de alimentos processados ou *in natura*. Elas incluem o emprego de substitutos de gordura, modificação genética, a sua extração com solventes, gases, vapores e agentes complexantes e a sua transformação em produtos não-tóxicos pela ação de enzimas. Os processos para redução do colesterol do leite podem ser classificados em biológicos, químicos, e físicos (Quadro 4).

Quadro 4 - Métodos para remoção de colesterol de gorduras

Método	Processo	Mecanismo
Biológico		
Microrganismo*	Rhodococcus Nocardia	Transformação
Enzima*	Colesterol redutase ou oxidase	Transformação
Químico		
Complexação**	β -ciclodextrina Ácidos biliares	Complexação Adsorção
Físico		
Sólido-líquido**	Sílica gel	Adsorção
Sólido-líquido**	Carvão ativo	Adsorção
Destilação**	Destilação por arraste de vapor	Fracionamento
	Destilação <i>Short path</i>	Fracionamento
Cristalização**	Cristalização fracionada	Cristalização fracionada
Extração supercrítica**	Extração com dióxido de carbono	Fracionamento

Fonte: SIEBER, 1993.

* - método aplicado no leite

** - método aplicado no óleo de manteiga

2.5.1. Processos biológicos

Embora os métodos enzimáticos para a redução da concentração de colesterol em alimentos apresentem vantagens, como um baixo investimento para a aquisição de equipamentos e a transformação do produto sem sua recuperação posterior, pode-se considerar que os trabalhos nessa área são ainda iniciais.

Algumas pesquisas, por exemplo, investigam a melhor fonte de colesterol redutase, que converte o colesterol em coprostanol (Figura 3), que tem baixa absorção no trato intestinal (SALVA, 1996)

Diversos pesquisadores isolaram e caracterizaram *Eubactérias ssp.*, a partir de fezes de ratos, macacos e humanos, capazes de efetuar essa conversão. Folhas de pepino, soja, milho e feijão contêm enzimas similares (ANDERSON et. al., 1995).

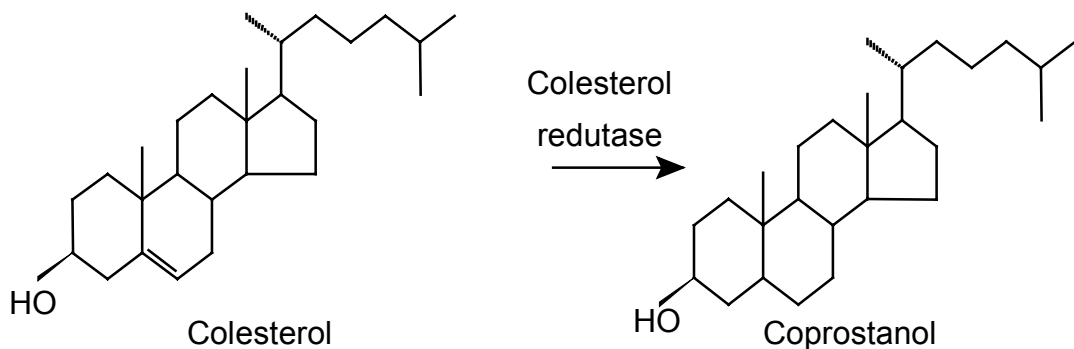


Figura 3 - Transformação de colesterol em coprostanol por colesterol redutase.

Colesterol oxidase, por sua vez, transforma o colesterol em 4-colesten-3-ona (colesteno-3-ona) (Figura 4), sem toxicidade conhecida. Essas enzimas são produzidas por microrganismos isolados do solo, de fezes de rato e de alimentos ricos em gordura como bacon, manteiga e vários tipos de carne (SALVA, 1996).

O principal problema com essas enzimas parece ser a acessibilidade dos seus sítios ativos para o colesterol, que se encontra nos glóbulos de gordura do leite (ANDERSON et al., 1995).

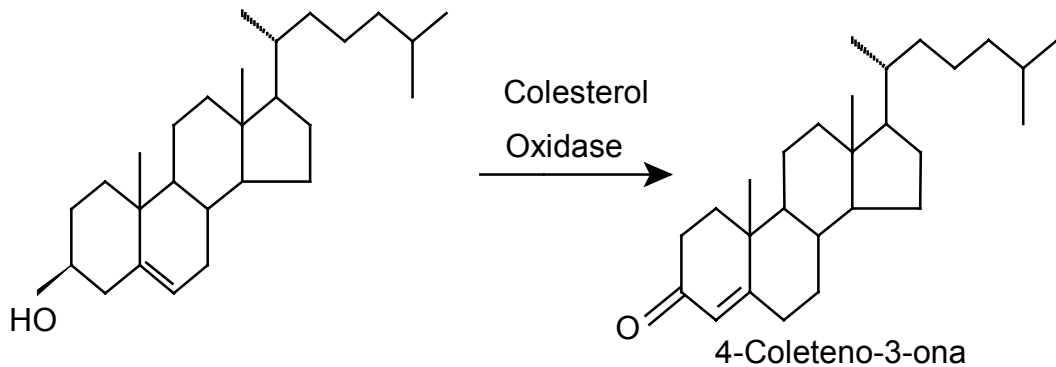


Figura 4 - Transformação do colesterol em colesteno-3-ona por colesterol oxidase.

Uma patente francesa foi credenciada para a remoção de esteróis de filme de gordura por meio da sua incubação com bactérias degradadoras de esteróis, por exemplo, *Nocardia*. Esse procedimento alcançou uma redução de até 89% do conteúdo de esteróis, após um período de 12 horas, a 29°C. A aplicação de enzimas de degradação do colesterol, em larga escala, entretanto, exige o conhecimento da segurança e eficiência da enzima, a transferência do gene responsável para microorganismos aceitáveis, a purificação da enzima e o modo de aplicação, em suporte sólido ou ainda na forma solúvel, diretamente no sistema alimentar (BOUDREAU e ARUL, 1993).

Por fim, há relatos sobre a habilidade do *Lactobacillus acidophilus* em metabolizar o colesterol em produtos lácteos fermentados (ANDERSON et al., 1995).

De acordo com estudos desenvolvidos com bactérias lácticas nos últimos vinte anos, fortes evidências indicam um efeito dessas bactérias na redução do colesterol em produtos fermentados, ou mesmo no colesterol sanguíneo em pessoas que usam esses produtos (THARI et al., 1995; RASIC et al., 1992).

Microorganismos como *L. acidophilus* e o *Bifidobacterium bifidum* são capazes de reduzir o colesterol por mecanismos não totalmente conhecidos

(KLAVER e MEER, 1993; GILLILAND e SPECK, 1977; RASIC et al., 1992; GILLILAND et al., 1985; THARI et al., 1995).

2.5.2. Processos químicos

2.5.2.1. Processos de complexação e extração por solventes

O processo químico de extração do colesterol com ciclodextrina consiste na formação de complexos com o colesterol, com posterior separação. O alto requerimento de ciclodextrina para remover o colesterol e o elevado custo da mesma podem resultar em um método proibitivo (BOUDREAU e ARUL, 1993).

Os processos de complexação com ciclodextrina têm, entretanto, o potencial de serem implementados com equipamentos já disponíveis na indústria de laticínios e com custos operacionais mais baixos. Baixos rendimentos e alteração na qualidade do produto podem ou não acontecer, dependendo da seletividade do agente de separação pelo colesterol e da eficiência do processo utilizado para separar os complexos ou agregados do produto final. Problemas legais deveriam ser mínimos, se agentes de separação de grau alimentício, como a quilaia ou ciclodextrinas, fossem empregados (SUNDFELD, 1996).

Ciclodextrinas foram utilizadas para remoção de colesterol do leite, manteiga e gordura do leite. Um complexo do colesterol com a ciclodextrina é formado em solução aquosa, o qual é removido por centrifugação, resultando em produtos em que até 90% do colesterol originalmente presente foram removidos (SUNDFELD, 1996). Permanecem, entretanto, problemas relacionados à elevada quantidade de complexante necessária e dificuldades na recuperação das ciclodextrinas.

Saponinas de beterraba foram propostas como agentes de remoção de colesterol. As saponinas purificadas são adicionadas ao leite fluido, promovendo-se a formação de complexos insolúveis com o colesterol livre, os quais são removidos por filtração. O produto final tinha sua concentração de colesterol reduzida em até 95%. Entretanto, nada se comenta quanto à disponibilidade comercial de saponinas purificadas e sua situação frente à

legislação de alimentos, eventual presença de saponinas residuais no produto, suas implicações legais e sensoriais e a viabilidade de sua recuperação (SUNDFELD, 1996).

Outras técnicas têm sido baseadas na adsorção do colesterol pelo uso de agentes como o brometo de cálcio ou de magnésio e sais de carbonato insolúveis, que se ligam seletivamente ao colesterol. Contudo, nenhum desses agentes foram provados como satisfatórios (BOUDREAU e ARUL, 1993).

Alternativamente, um procedimento de extração de colesterol pelo uso de solventes orgânicos foi descrito por CZECH et al. (1993). O método consiste essencialmente da passagem de uma mistura da gordura do leite, etanol e propanol em coluna extratora e extração com uma mistura de etanol, água e pequena quantidade de propano em contra-corrente, a 30°C e pressão de 10 bar. A mistura de gordura livre de colesterol, propano e etanol, com baixa concentração de água, é removida no topo da coluna, enquanto uma solução de colesterol e gordura de leite, em uma mistura de etanol, água e propano, é recolhida na base da coluna, sendo que os compostos flavorizantes extraídos com o colesterol podem ser reciclados.

2.5.3. Processos físicos

2.5.3.1. Substitutos de gordura

A retirada ou substituição de toda gordura ou de parte dela e do colesterol em um alimento, com um resultado final no qual as características organolépticas são equivalentes ao produto tradicional, é um desafio, especialmente porque o teor de gordura tem influência significativa nas características físicas e sensoriais.

Dos diferentes sistemas que buscam substituir toda gordura ou parte dela e do colesterol em alimentos, a microparticulação tem grande destaque. A microparticulação proporciona a mesma sensação de fluidos gordurosos pelo fato da nossa língua ter a capacidade de identificar uma partícula em função de seu tamanho (YOKOYAMA, 1996). Normalmente são usados compostos de carboidratos, pectinas e carragenas ou proteínas, como as proteínas do soro de leite (HAUKSSON e HEDETOFT, 1996).

Além da microparticulação, existem os substitutos à base de gorduras, que são gorduras modificadas em sua estrutura (caprenina, olestra, salatrim), de forma que fornecem pouca ou nenhuma energia, podendo até passar sem alterações pelo organismo (SLIKTA, 1996).

Substitutos à base de carboidratos são ingredientes que variam desde amidos e gomas até polidextrose. Funcionam como estabilizantes e espessantes, simulando várias funções das gorduras (SLIKTA, 1996).

Com excelente versatilidade em sistemas congelados e refrigerados, os substitutos, à base de proteínas, são derivados de proteínas lácteas, de ovos e até de milho. Proteínas lácteas concentradas e modificadas são exemplos de maior sucesso (SLIKTA, 1996).

2.5.3.2. Destilação de vapor à vácuo

O colesterol é um composto pouco volátil, porém mais volátil que a maioria dos triglicerídeos do leite. Vapor superaquecido pode ser borbulhado através do óleo de manteiga e este pode ser aquecido indiretamente para fornecer calor latente de vaporização dos componentes destilantes (BOUDREAU e ARUL, 1993).

Destilação do vapor da água e componente de baixa volatilidade, como o colesterol, ácidos graxos livres e aroma ocorrem quando a soma das pressões de vapor do vapor da água e destilados é igual à pressão total. A pressão pode ser reduzida pela aplicação de vácuo, ou, alternativamente, a pressão de vapor d'água pode ser diminuída pelo aumento da temperatura, que, por sua vez, aumenta a pressão de vapor dos componentes destilantes. A temperatura de destilação pode ser diminuída, se necessário, pelo aumento da quantidade de vapor (BOUDREAU e ARUL, 1993).

Com essa técnica, é possível diminuir de 75% a 95% da concentração de colesterol da gordura de leite anidra. Embora essa remoção não afete as propriedades funcionais e sensoriais dos produtos lácteos, há a possibilidade de formação de produtos de oxidação do colesterol que são tóxicos, principalmente o 7-hidroxicolesterol e o 25-hidroxicolesterol e o colestaneetriol. O investimento inicial e o custo operacional desse processo são muito

elevados, considerando-se o sistema de vácuo necessário para realizar a destilação à temperatura mais reduzida (BOUDREAU e ARUL, 1993).

2.5.3.3. Destilação molecular de via curta (Short path distillation)

Este processo de destilação consiste na evaporação de moléculas em um espaço substancialmente livre de gás (vácuo). A separação mais simples alcançada pelo processo é a destilação de uma substância de baixo peso molecular, desejada ou não, de uma mistura de componentes de maior peso molecular (LANZANI et al., 1994).

O emprego da destilação *short path* reduz o colesterol de 70% a 90% em gordura de leite anidra e constitui um dos melhores métodos de extração, uma vez que não ocasiona mudança na gordura original do leite (LANZANI et al., 1994).

As condições apropriadas para extração envolvem temperatura elevada e tempo longo, numa razão inversamente proporcional entre esses fatores. Somente após quatro destilações do óleo de manteiga, obtém-se uma separação satisfatória do colesterol, podendo ainda ocasionar alterações da composição de lipídeos do produto. O investimento industrial e o custo operacional da destilação molecular são extremamente elevados. Não houve avaliação das perdas de compostos aromáticos e de características sensoriais (LANZANI et al., 1994).

2.5.3.4. Extração com fluido supercrítico

Os fluidos supercríticos são definidos como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão crítica. A temperatura crítica é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura. Acima da pressão crítica, as propriedades do líquido e do gás tornam-se idênticas, e este gás, altamente denso, é denominado fluido supercrítico (ARAÚJO, 1995).

A técnica de extração com fluido supercrítico funciona de forma semelhante à extração com solvente. Neste caso, o CO₂ é utilizado como

solvente de extração à temperatura e pressão próximas e acima do ponto crítico, em substituição aos líquidos normalmente utilizados como cloreto de metileno, hexano, metanol entre outros, sem causar danos às propriedades funcionais de proteínas e de outros constituintes do alimento. A amostra a ser extraída é exposta ao CO₂ supercrítico, que dissolve e remove alguns componentes da amostra original (ARAÚJO, 1995).

Além do uso em laboratórios, a técnica com CO₂ supercrítico é utilizada em escala industrial na descafeinação e extração de lúpulo, na extração e recuperação de aromas e remoção de colesterol e lipídios em carnes, ovos e produtos de laticínios (ARAÚJO, 1995).

O dióxido de carbono destaca-se dos demais fluidos de utilização por ter uma temperatura crítica ligeiramente acima da ambiente (31,1°C), evitando a destruição de substâncias termossensíveis, tem uma pressão crítica fácil de ser obtida, não é inflamável, é inodoro, é quimicamente inerte, está disponível em alta pureza e baixo custo, não representando risco ambiental (ARAÚJO, 1995).

A extração de colesterol da gordura de leite anidra por dióxido de carbono supercrítico tem sido investigada por diversos autores. Em um estudo realizado por KAUFMANN et al. (1982), utilizando CO₂ para extração de colesterol, foram obtidas duas frações do leite (20% líquido e 80% sólido) em uma pressão de 200 bar e temperatura de 80°C, sendo registradas concentrações de 5,5 mg de colesterol por grama de gordura na fração líquida e 2,3 mg/g na fração sólida.

A extração do colesterol em uma fase móvel é determinada pelo balanço de interações tripartidas, triglicerídeos com CO₂, triglicerídeos com colesterol e colesterol com CO₂. Sendo um constituinte menor na gordura do leite, o colesterol provavelmente está associado com triglicerídeos, com os quais ele mantém maior afinidade, principalmente os triglicerídeos de cadeia curta e média e, em alguma extensão, triglicerídeos insaturados de cadeia longa (BOUDREAU e ARUL, 1993).

A afinidade do CO₂ é baixa para o colesterol na pressão de 200 bar e 80°C (baixa concentração de gás), por isso existe menor competição entre os triglicerídeos e o CO₂ para o colesterol. As moléculas de colesterol associadas com triglicerídeos de cadeia média e curta são eluídas na fase gasosa,

enquanto moléculas de colesterol associadas com triglicerídeos de cadeia longa não são eluídas, por causa do seu tamanho, como também ocorre para os ésteres de colesteril (BOUDREAU e ARUL, 1993).

CHAO et al. (1991) estudaram os efeitos das condições que afetam a extração de lipídeos e colesterol em carne usando pressões numa faixa de 103 bar a 310 bar e uma faixa de temperatura de 30°C a 50°C. Eles encontraram que a extração de colesterol com CO₂ supercrítico é mais efetiva a baixa pressões e propõem o uso desta técnica como fonte de colesterol para uso na indústria farmacêutica.

A redução de colesterol junto com o fracionamento de triglicerídeos em óleo de manteiga foi obtido usando um processo combinado de extração com CO₂ supercrítico com adsorção em alumina num equipamento que permitia o controle independente da pressão e temperatura. A concentração de colesterol no óleo de manteiga foi reduzida de 2,5 mg/g para 0,1 mg/g. O óleo de manteiga também foi fracionado em triglicerídeos de baixo, médio e alto peso molecular, o que permite a formulação de uma gordura com propriedades específicas (MOHAMED, 1998).

BHASKAR et al. (1993) usaram um sistema contínuo de extração com CO₂ supercrítico, em escala piloto, para remoção de colesterol do óleo de manteiga. A gordura foi separada em cinco frações, usando uma faixa de pressão de 3,4 MPa a 24,1 MPa numa faixa de temperatura de 40°C a 75°C, conseguindo uma separação de até 400 g/h de gordura do leite.

Embora a remoção do colesterol seja apenas modesta na extração com CO₂ supercrítico com etapa única, níveis superiores podem ser alcançados por processos de estágios múltiplos ou pelo uso de adsorventes em linha (BOUDREAU e ARUL, 1993).

Segundo HUBER et al. (1996), o uso de CO₂ supercrítico para remoção direta do colesterol da gordura de leite anidra, ou mesmo com separadores em série não são métodos práticos, pois a seletividade do colesterol em relação à gordura é relativamente baixa para diversas condições de operação. A solubilidade da gordura anidra é pequena e ainda há perdas de componentes flavorizantes, que são separados junto com o colesterol, devendo destacar ainda o alto custo dos equipamentos e de sua manutenção.

2.5.4. Cromatografia preparativa

A cromatografia preparativa é o método mais usado para isolar e purificar misturas. Essa técnica requer colunas maiores devido à carga elevada de material em separação presente no processo. Da mesma forma que em cromatografia analítica, pode-se conseguir a separação desejada de uma só vez, mas em alguns casos se faz necessário extrações sucessivas. Essas duas circunstâncias podem requerer procedimentos operacionais diferentes, mas em ambos os casos é aconselhável aperfeiçoar a separação e maximizar a carga de amostra em uma coluna pequena. De posse dessas informações, pode-se calcular o tamanho necessário da coluna preparativa para a obtenção da separação desejada, como também a quantidade de material que pode ser injetada nesta para se obter pureza ideal e recuperação (WATERS, 1998).

Após a separação do colesterol, a gordura do leite pode ser reincorporada ao leite desnatado para produzir os mais diversos produtos, incluindo creme (ELLING e DUNCAN, 1996), manteiga (SHUKLA et al., 1993), entre muitos outros.

2.5.4.1. Fatores importantes em separações por cromatografia preparativa

Os fatores determinantes em uma separação preparativa são muito semelhantes aos fatores que influenciam uma separação analítica. Número de pratos teóricos (N), o fator de capacidade (k'), e a seletividade (α), todos irão afetar a resolução. O tamanho da partícula do material de empacotamento e o tamanho da coluna podem afetar a eficiência da coluna e a velocidade da separação. Alterar qualquer um desses parâmetros pode ocasionar efeitos múltiplos na separação. Portanto é de extrema importância o conhecimento sobre como esses fatores podem influenciar o processo de separação (WATERS, 1998).

2.6. FDA (Food and Drug Administration) e o colesterol

O órgão americano responsável pelo controle e inspeção de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos da América propôs o estabelecimento de valores para a determinação e diferenciação de alimentos com níveis baixíssimos de colesterol (sem colesterol), alimentos com baixos níveis de colesterol (baixo colesterol) e alimentos com níveis médios de colesterol (médio colesterol) e alimentos com altos níveis de colesterol (alto colesterol) (FDA, 1986).

Baseado nessa publicação o alimento é considerado “sem colesterol” quando possui índices inferiores a 2 mg de colesterol por porção, enquanto o alimento com “baixo-colesterol” deve estar entre 2 mg e 20 mg de colesterol por porção e, finalmente, o “médio colesterol” deve estar na faixa compreendida entre 20 mg e 25 mg de colesterol por porção. Acima de 25 mg por porção, o produto é considerado “alto colesterol”. O termo porção é definido para cada produto baseado na ingestão diária recomendada. No Quadro 5, são apresentados os efeitos da remoção de 90% do colesterol do óleo de manteiga por métodos, tais como o CO₂ supercrítico e o de destilação, usado na produção de alguns alimentos. Os cálculos nesse Quadro consideram o colesterol presente no leite desnatado.

2.7. Métodos para análise quantitativa de colesterol

Diversos métodos são citados na literatura para se determinar quantitativamente o colesterol e seus óxidos em alimentos. Ultimamente, a redução de custos e a alta qualidade tornaram-se fundamentais na maioria das análises laboratoriais, da mesma forma que a automação dos procedimentos analíticos é essencial para o desenvolvimento de métodos aplicados rotineiramente. Durante as três últimas décadas, a cromatografia teve um desenvolvimento rápido e significativo, sendo hoje umas das técnicas mais freqüentemente usadas para separação, análise qualitativa e quantitativa (COLLINS et al., 1997). Os principais métodos são cromatografia gasosa (NIELSEN et al., 1995; STEWART et al., 1992 e HUBER et al., 1995) e

cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (MANZI et al., 1996).

Quadro 2 - Efeito da remoção de 90% do colesterol do óleo de manteiga, no nível de colesterol e na classificação^(a) do produto final

Produto	Nível de Colesterol e Classificação do Alimento ^(a)				
	% Gordura	Padrão do Produto com Avaliação Comercial		Produto com Óleo de Manteiga Colesterol Reduzido	
		Nível de colesterol por porção	Classificação	Nível ^(b) de colesterol por porção	Classificação
Leite fresco					
Semi-desnatado	2,0	19 mg/244 g	Baixo ^(d)	5,7 mg/244 g	Baixo
Integral	3,3	33 mg/244 g	Alto ^(f)	6,4 mg/244 g	Baixo
Sorvete	10,8	59,9 mg/100 g	Alto	5,5 mg/100 g	Baixo
Creme light	19,3	10 mg/30 g	Baixo	4,1 mg/30 g	Baixo
Creme integral	37,0	21 mg/245 g	Médio ^(e)	4,8 mg/245 g	Baixo
Manteiga	81,1	11 mg/15 g	Baixo	1,5 mg/15 g	Livre ^(c)
Fermentado					
iogurte (fruta)	1,2	5,0 mg/224 g	Baixo	2,5 mg/224 g	Baixo
iogurte natural	1,6	7,0 mg/224 g	Baixo	2,6 mg/224 g	Baixo
Creme	12,0	6,0 mg/15 g	Baixo	0,8 mg/15 g	Livre
Queijo fresco					
Cottage	1,9	9,0 mg/113 g	Baixo	0,7 mg/113 g	Livre
Ricota	7,9	38,0 mg/124 g	Alto	4,1 mg/124 g	Baixo
Mussarela	15,9	16,0 mg/28 g	Baixo	1,5 mg/28 g	Livre
Creme	34,9	31,0 mg/28 g	Alto	2,8 mg/28 g	Baixo

Fonte: FDA, 1990.

(a) De acordo com Classificação citada pela FDA, 1986;

(b) Nível calculado supondo 90% de remoção do colesterol do óleo de manteiga;

(c) Valor menor que 2 mg por porção, segundo FDA, 1986.

(d) 2 mg a 20 mg por porção, segundo FDA, 1986;

(e) Valor entre 20 mg e 25 mg por porção, segundo FDA, 1986;

(f) Valor de 25 mg ou maior por porção, segundo FDA, 1986;

2.7.1. Cromatografia gasosa

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separadas, utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra é injetada em uma coluna contendo a fase estacionária e a temperatura neste local e na coluna deve possibilitar a sua vaporização. De acordo com as propriedades da amostra e da fase estacionária, as substâncias são retidas por tempos determinados, chegando à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dessas substâncias (COLLINS et al., 1997).

Essa técnica pode ser empregada na análise de substâncias voláteis e estáveis termicamente, caso contrário, há necessidade de se realizar a derivatização da amostra, o que nem sempre é viável. A derivatização é necessária, por exemplo, em açúcares, aminoácidos e em algumas análises de ácidos graxos. Os derivativos são substâncias voláteis e termicamente estáveis nas condições de separação utilizadas, permitindo uma melhor separação e resolução dos componentes (ARAÚJO, 1995).

A análise cromatográfica isoladamente é rápida, no entanto, na maioria das vezes, há necessidade de etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências e contaminação da coluna cromatográfica. Às vezes, essa etapa de preparação é longa e complexa, aumentando muito o tempo e o custo da análise.

A cromatografia gás-líquido utilizada na análise de colesterol tem como fase estacionária um líquido pouco volátil recoberto um suporte sólido ou as paredes de colunas capilares. A separação baseia-se em mecanismos de partição das substâncias entre a fase líquida e a fase gasosa. A fase estacionária deve ser termicamente estável e quimicamente inerte às substâncias na temperatura de uso (COLLINS et al., 1997).

2.7.2. Cromatografia líquida de alto desempenho

Diversos métodos desenvolvidos para a determinação de colesterol em manteiga utilizam a técnica de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

HPLC é o mais novo e mais importante membro de uma família inteira de técnicas de separação, que utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados, empregando pequenas colunas preenchidas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é bombeada através da fase estacionária sob altas pressões. A HPLC tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em curto tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. O desenvolvimento de instrumentos controlados por microcomputadores também tem contribuído para melhorar a eficiência dos equipamentos (COLLINS et al., 1997).

Compostos diferenciados em tipo químico ou número de grupos funcionais são facilmente separados por cromatografia líquido-sólido, incluindo ácidos graxos, álcoois, alcalóides, aminas, antioxidantes, barbitúricos, corantes, esteróides, fenóis, lipídeos e vitaminas (COLLINS et al., 1997).

A análise de colesterol por HPLC apresenta a grande vantagem de ser rápida, pois a separação cromatográfica é feita em cerca de seis minutos. Podemos destacar ainda a alta precisão e o desvio padrão para a sua reprodutibilidade que é inferior a 2% (CASIRAGHI et al., 1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Análise de Alimentos e de Cromatografia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Preparação do óleo de manteiga

O óleo de manteiga foi preparado pelo aquecimento de manteiga a 60°C e posterior centrifugação (INTERNATIONAL CENTRIFUGE TACHOMETER, IEC[®]), numa aceleração equivalente a 800 g por 10 minutos. A fase superior, que é o óleo de manteiga, foi analisada por cromatografia líquida de alto desempenho, para determinar a concentração inicial de colesterol. Para cada repetição foi preparado um óleo de manteiga para evitar possível formação dos óxidos de colesterol durante o armazenamento.

3.1.1. Dispositivo experimental

Na Figura 5 é mostrado o esquema usado para estudar o processo de remoção de colesterol em sílica gel. Neste esquema, pode-se observar que a coluna foi preenchida com sílica gel (MERCK[®]) e óleo de manteiga foi injetado em quantidade suficiente para saturar o adsorvente. O nitrogênio foi utilizado para controle do fluxo e a estufa (FANEM[®]) para controle de temperatura.

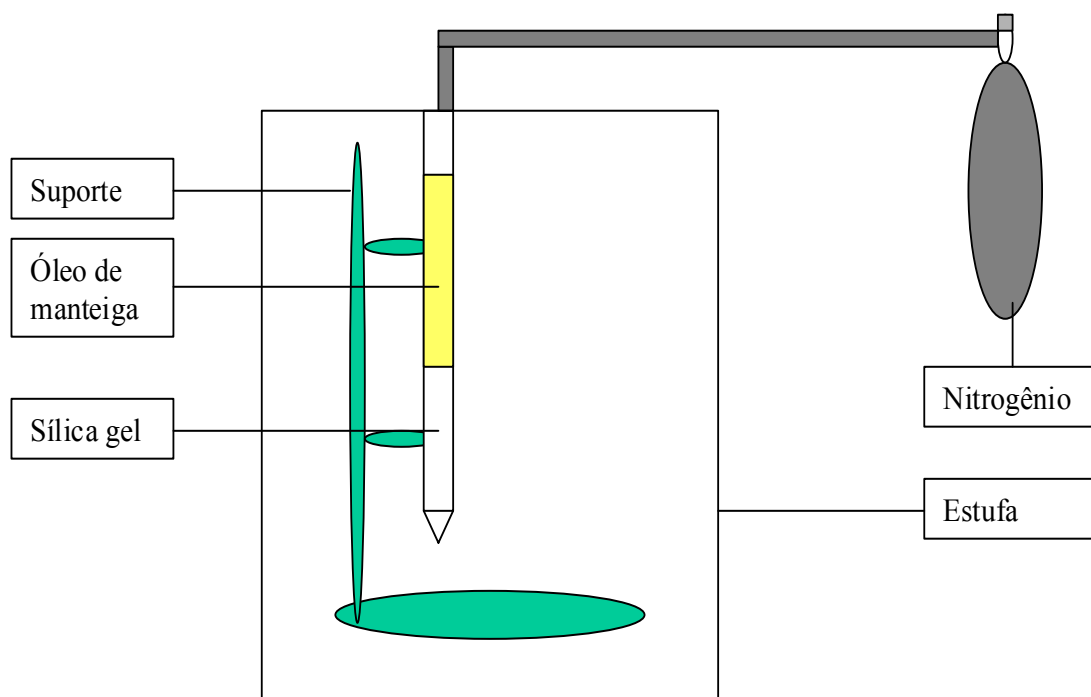


Figura 5 - Esquema da montagem da coluna para estudo do processo de remoção de colesterol em sílica gel.

O fluxograma (Figura 6) representa a metodologia que foi usada para quantificar os efeitos de algumas variáveis de processo na remoção do colesterol da gordura do leite e análise do colesterol e dos produtos da sua oxidação.

A extração de colesterol do óleo de manteiga foi estudada numa coluna de aço inoxidável com diâmetro interno de 22 mm, preenchida manualmente com sílica gel. Uma massa de sílica gel, de acordo com cada tratamento estabelecido, foi colocada na coluna. Fez-se a vibração, colocando o vibrador em contato com as paredes da coluna por 15 minutos para que o preenchimento se tornasse padronizado. A fase móvel foi o óleo de manteiga puro.

O óleo de manteiga foi injetado continuamente na coluna de sílica gel e gás nitrogênio foi usado para controlar o fluxo através do leito. Para a sílica de menor granulometria, o fluxo foi de $0,37 \text{ mL/min} \pm 0,1 \text{ mL/min}$, sendo necessária uma pressão de 3 kgf/cm^2 . Para a sílica de maior granulometria, um

fluxo de 1,50 mL/min \pm 0,3 mL/min, sendo que a pressão foi menor que 0,5 kgf/cm². Frações da fase móvel na saída do leito foram coletadas em função do volume e submetidas à análise quantitativa para a determinação da concentração de colesterol por cromatografia líquida de alto desempenho.

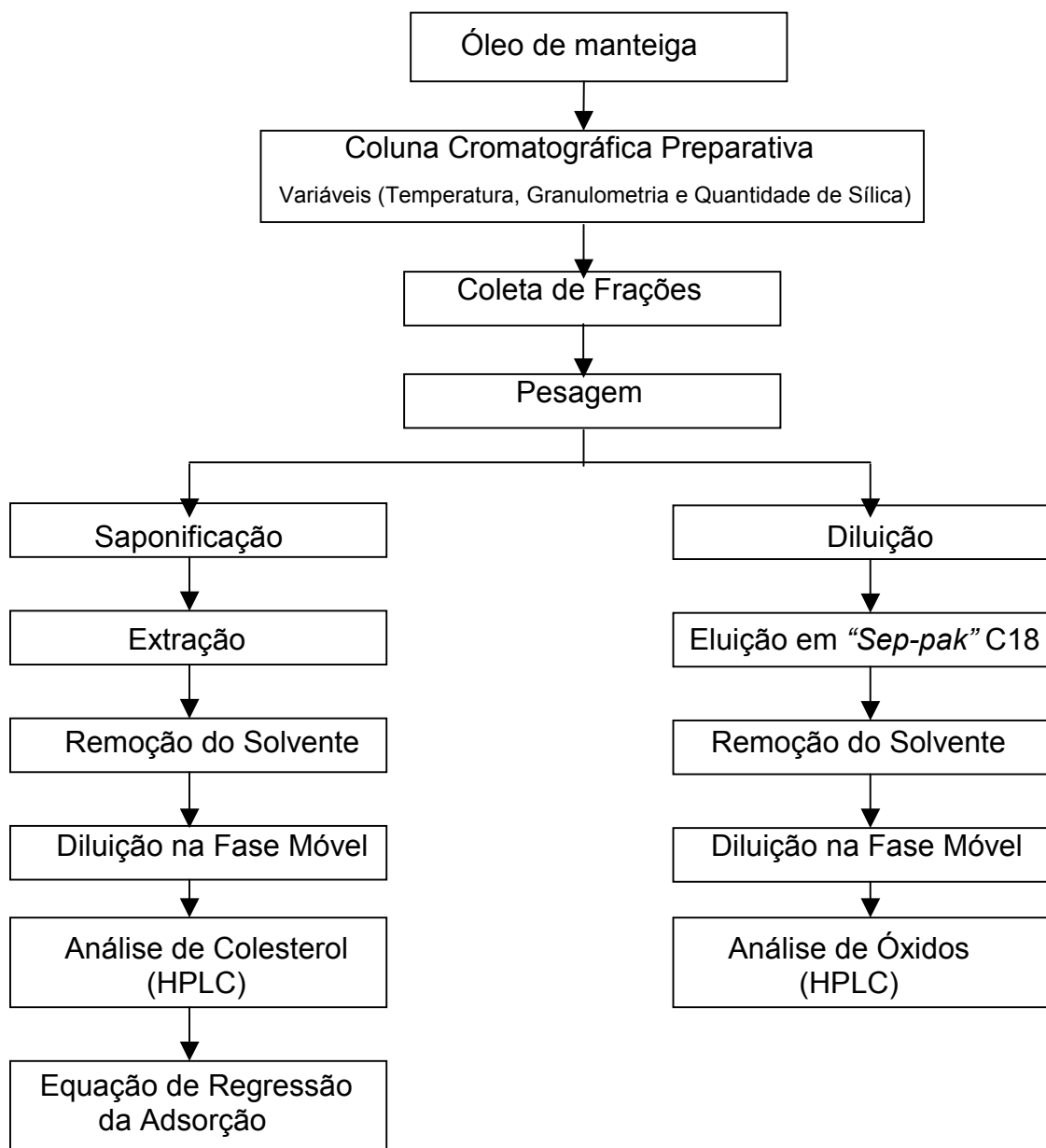


Figura 6 - Fluxograma da metodologia para remoção e análise do colesterol e de produtos da oxidação do colesterol.

3.1.1.1. Delineamento experimental

Os tratamentos (3 níveis de temperatura, 3 níveis de quantidade de sílica e 2 granulometrias da sílica) foram aplicados segundo um esquema fatorial com 3 repetições, num delineamento inteiramente ao acaso (Quadro 6).

Quadro 6 - Esquema do delineamento experimental empregado

Tratamento	Temperatura (°C)	Altura aproximada do leito (mm)	Massa de sílica (g)	Granulometria da sílica
1	70	42	10,0	5 µm a 40 µm
2	80	42	10,0	5 µm a 40 µm
3	90	42	10,0	5 µm a 40 µm
4	70	54	12,5	5 µm a 40 µm
5	80	54	12,5	5 µm a 40 µm
6	90	54	12,5	5 µm a 40 µm
7	70	67	15,0	5 µm a 40 µm
8	80	67	15,0	5 µm a 40 µm
9	90	67	15,0	5 µm a 40 µm
10	70	36	10,0	45 µm a 60 µm
11	80	36	10,0	45 µm a 60 µm
12	90	36	10,0	45 µm a 60 µm
13	70	50	12,5	45 µm a 60 µm
14	80	50	12,5	45 µm a 60 µm
15	90	50	12,5	45 µm a 60 µm
16	70	63	15,0	45 µm a 60 µm
17	80	63	15,0	45 µm a 60 µm
18	90	63	15,0	45 µm a 60 µm

3.2. Metodologia da análise quantitativa de colesterol do óleo de manteiga

3.2.1. Análise de colesterol por HPLC

As amostras de óleo de manteiga original e das frações da fase móvel na saída do leite foram analisadas por HPLC, para se determinar a concentração de colesterol. Para saponificar o óleo de manteiga, foram pesados aproximadamente 200 mg da amostra, que foi dissolvida em 10 mL de etanol (fração de volume de 96%). A essa solução foram acrescentados 2 mL de solução de KOH de concentração 0,50 g/mL. A temperatura foi mantida a 70°C por 8 minutos, sob constante agitação, para promover a saponificação. A amostra já saponificada foi resfriada à temperatura ambiente. A extração foi efetuada com 50 mL de hexano (VETEC[®]) dissolvido em éter dietílico (CHEMCO[®]) (50% em volume) e 30 mL de água sob agitação vigorosa, num funil de separação. Após a separação completa das fases, 25 mL da fase orgânica foram evaporados com o uso de rotavapor a 35^oC e reconstituídos em seguida com 10 mL da fase móvel usada na análise quantitativa (CASIRAGHI et al., 1994).

3.2.2. Análise dos resultados de adsorção do colesterol em leite de sílica

Os resultados da concentração de colesterol na fase móvel na saída do leite foram usados para ajustar uma equação polinomial que descreve o processo de saturação da sílica com colesterol para os tratamentos. As curvas que descrevem o processo de saturação da sílica em função do volume são conhecidas como curvas de ruptura (*breakthrough*). A partir dessas curvas, foi possível determinar a carga máxima de colesterol para atingir uma determinada redução na concentração de colesterol do óleo de manteiga.

Baseado na revisão de literatura, uma redução de 90% na concentração de colesterol é considerada excelente e, portanto, determinou-se a carga máxima para atingir esse nível. Esses dados foram usados para determinar uma equação de regressão que descreve a carga máxima para cada tipo de sílica em função das variáveis temperatura e quantidade de sílica.

O ajuste dos modelos polinomiais e análise estatística dos dados foram feitos através do programa computacional para análise estatística SAS[®], usando um nível de 5% de probabilidade (SAS[®], 1995).

3.2.3. Análise de produtos de oxidação do colesterol por HPLC

Amostras da fase móvel na saída do leito até o início do processo de saturação do adsorvente (óleo de manteiga com baixa concentração de colesterol) foram analisadas por HPLC para determinação da concentração de produtos de sua oxidação. Foram pesados aproximadamente 1,0 g da amostra. Esta foi dissolvida em 1 mL de acetato de etila (MERCK[®]) dissolvido em metanol (CHEMCO[®]) (50% em volume), para reduzir a viscosidade e então aplicado à coluna *Sep-Pak C₁₈*. A coluna *Sep-Pak C₁₈* foi ativada com 10 mL de água destilada, seguido por 10 mL de metanol antes da aplicação da amostra. A maior parte do colesterol e dos triglicerídeos foram eluídos da coluna com 1 mL de acetato de etila dissolvido em metanol (50% em volume). Os produtos da oxidação do colesterol e as impurezas residuais foram eluídos com 10 mL de metanol e 6 mL de acetato de etila dissolvidos em metanol (50% em volume). O solvente foi removido em rotavapor a 40°C e o resíduo dissolvido em 1 mL da fase móvel constituída de isopropanol em hexano (12% em volume). Os óxidos usados como padrões foram 25-hidroxicolesterol e 7-β-hidroxicolesterol (MERCK[®]). As análises foram feitas em triplicata (CHEN et al., 1994).

3.2.4. Condições cromatográficas e equipamentos para análise de colesterol e produtos de sua oxidação

As análises por HPLC foram realizadas usando um Cromatógrafo Líquido (Modelo CG-480C) equipado com válvula de injeção e “loop” de 100 µL, um Detector UV-50 (VARIAN[®]) e uma coluna de sílica gel (Micropak, VARIAN[®]) com granulometria média de 5 µm, diâmetro interno de 4 mm e 30 cm de comprimento. A fase móvel foi a mistura de 2-propanol (VETEC[®]) em hexano (VETEC[®]), 5% em volume para análise de colesterol e 12% em volume

para análise dos produtos da oxidação do colesterol. O fluxo foi de 1,0 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 208 nm com a quantificação das áreas feita em um Registrador-Integrador CG-200. As injeções, em um injetor "Rhodyne 7125", foram de 60 μ L das amostras preparadas, utilizando-se seringa HAMILTON[®] de 100 μ L (CASIRAGHI et al., 1994; PARK e ADDIS, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do óleo de manteiga por cromatografia

Na Figura 7 são apresentados os cromatogramas do óleo de manteiga original, cuja concentração inicial de colesterol foi de $246 \text{ mg} \pm 15 \text{ mg}$ em 100 g de óleo, e do óleo de manteiga na saída do leite até ocorrer a saturação. O tempo de retenção do colesterol nas condições usadas para análise por cromatografia líquida de alto desempenho foi de 4,4 minutos.

Analisando-se esses cromatogramas, pode-se verificar que houve uma redução na área do pico referente ao colesterol no início do processo e que outros picos foram alterados. Isso indica que a sílica adsorve outros compostos da fração insaponificável do óleo de manteiga. Ainda, um mesmo pico apresenta uma área maior no início do processo e depois a sua área vai diminuindo e aumentando; ao final, podendo estar relacionado a possíveis compostos que possuem tempo de retenção muito próximos nas condições de análise, mas tempos de retenção diferentes para a cromatografia preparativa. Isso é observável na seqüência de cromatogramas (a), (b), (c), (d), (e) e (f), indicando uma provável alteração na composição química da fração insaponificável do óleo de manteiga com teor de colesterol reduzido.

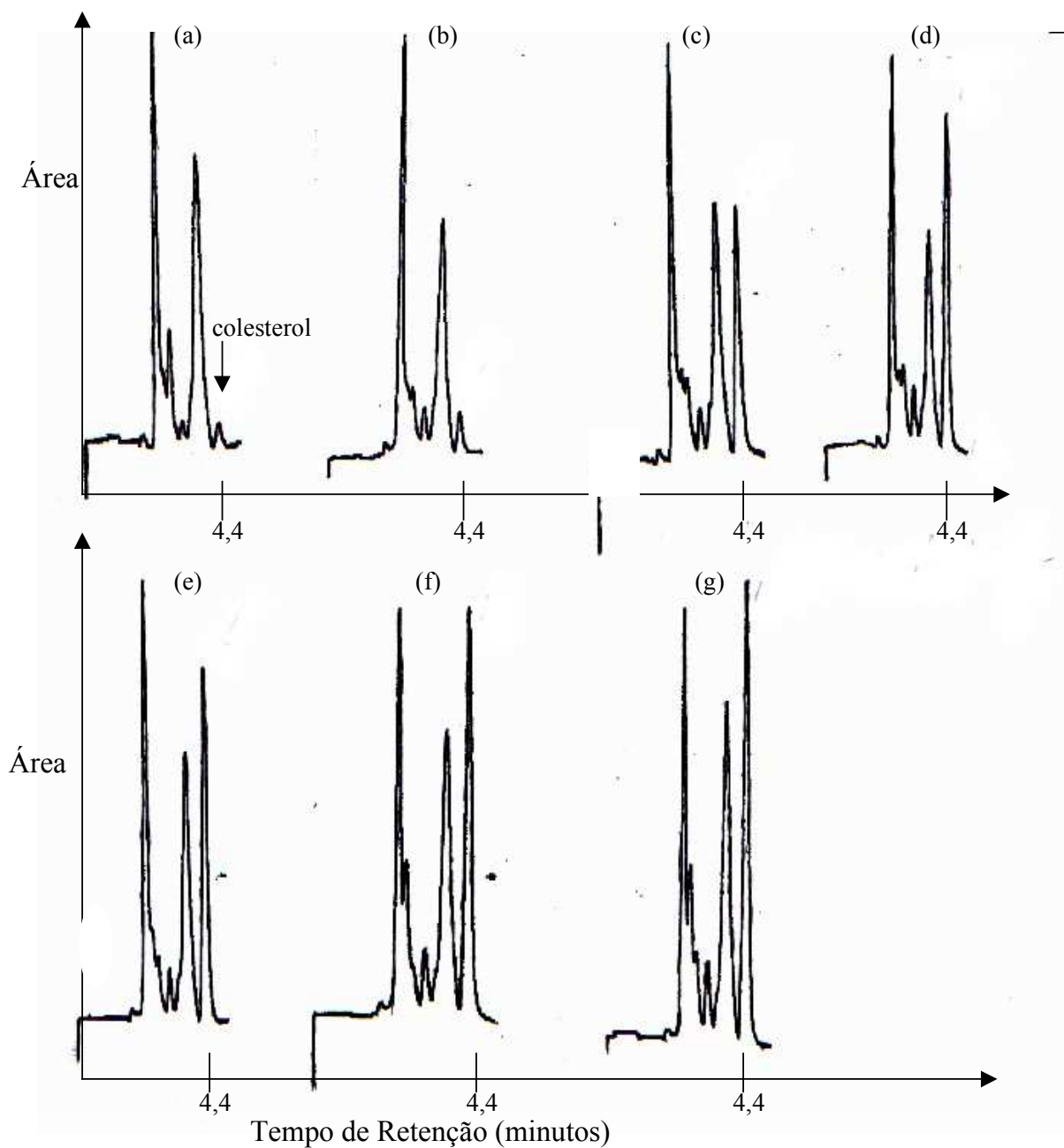


Figura 7 - Cromatogramas representando o pico do colesterol durante o processo de saturação da sílica gel: a) óleo de manteiga nas primeiras frações da fase móvel; b, c, d, e) óleo de manteiga na fase móvel durante a saturação; f) óleo de manteiga na fase móvel com a sílica saturada; e g) óleo de manteiga.

4.2. Curvas de adsorção do colesterol

Em leito fixo, a curva representando a concentração do soluto na fase fluida em função do tempo na saída do leito é denominada curva de ruptura. Essa curva tem a forma de “S” (McCABE et al., 1993). Neste trabalho, foi construída a curva relacionando a razão entre concentração do colesterol no óleo na saída do leito (C) e a concentração inicial (Co) e a quantidade de colesterol injetado (mg) por grama de sílica.

A taxa de transferência de massa para adsorção em leito fixo é obtida pela equação:

$$\varepsilon \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \rho \frac{\partial W}{\partial t} = - u_o \frac{\partial c}{\partial L}$$

O termo ε é a fração do volume do leito não-ocupado pela sílica; $\frac{\partial c}{\partial t}$ é a variação da concentração do colesterol na fase fluida, em função do tempo; ρ é a densidade do adsorvente; $\frac{\partial W}{\partial t}$ é a variação entre a massa de colesterol adsorvido por unidade de massa do adsorvente em função do tempo; u_o é a velocidade superficial da fase fluida; e $\frac{\partial c}{\partial L}$ é a variação da concentração do colesterol na fase fluida em função da altura do leito. O mecanismo de transferência inclui a difusão em torno da partícula e a difusão através dos poros do adsorvente (McCABE et al., 1993).

4.2.1. Efeito da Temperatura

Nas Figuras 8 a 10 são apresentadas as curvas de ruptura para a sílica de menor granulometria (5 μm a 40 μm), representando o efeito da temperatura para as colunas com 10 g, 12,5 g e 15 g, respectivamente.

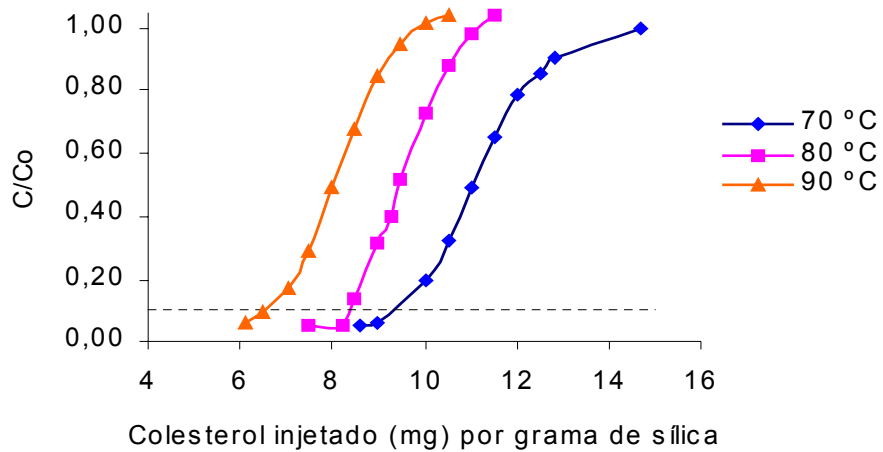


Figura 8 - Curva de ruptura para a coluna com 10 g de sílica gel (granulometria de 5 μm a 40 μm).

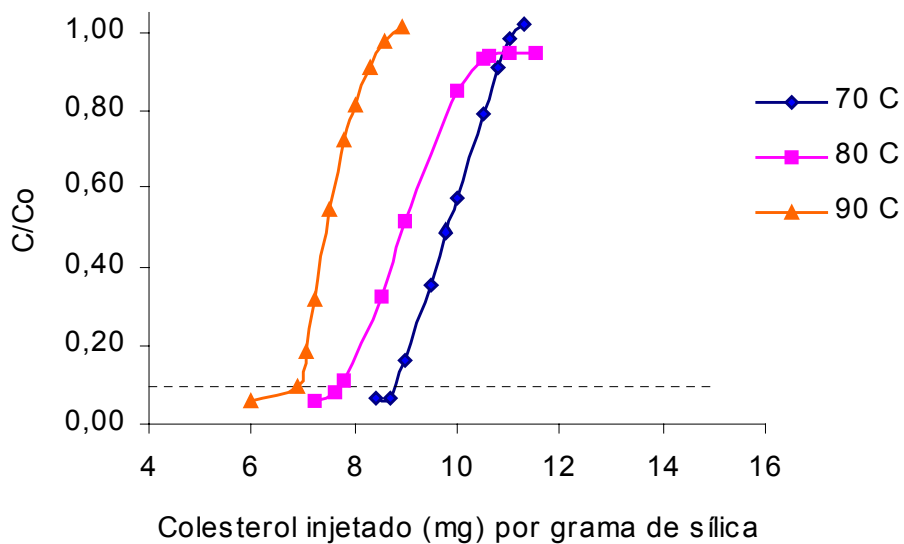


Figura 9 - Curva de ruptura para a coluna com 12,5 g de sílica gel (granulometria de 5 μm a 40 μm).

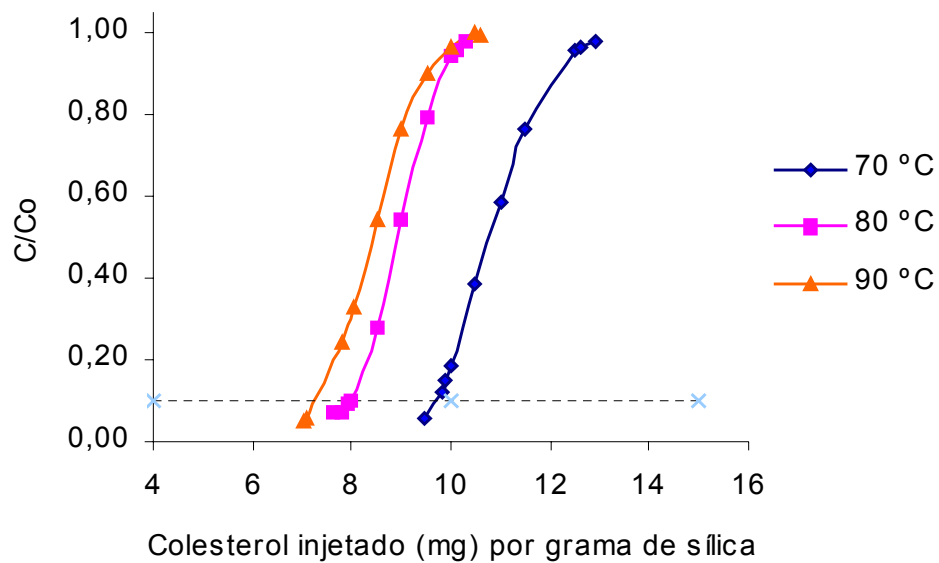


Figura 10 - Curva de ruptura para a coluna com 15 g de sílica gel (granulometria de 5 μm a 40 μm).

Pode-se observar nas Figuras 8 a 10 que o aumento da temperatura provocou uma redução na quantidade de colesterol adsorvido por grama de sílica gel. Essa redução era esperada, pois o aumento da temperatura provoca um aumento na vibração das moléculas que reduz a capacidade do adsorvente reter o colesterol, visto que o processo de adsorção é um fenômeno de superfície.

Nas Figuras 11 a 13 são apresentadas as curvas de ruptura para a sílica de maior granulometria (45 μm a 60 μm), podendo-se observar nestas figuras que o efeito da temperatura não aconteceu, tal como o observado para a sílica de menor granulometria. O aumento da temperatura não provocou uma redução na capacidade da sílica. Uma possível explicação é o maior fluxo para essas colunas, quando comparado com as colunas de sílica de menor granulometria, já que não se conhece a relação de equilíbrio do processo de adsorção (isoterma de adsorção), nem sua porosidade, tamanho dos poros e área para adsorção.

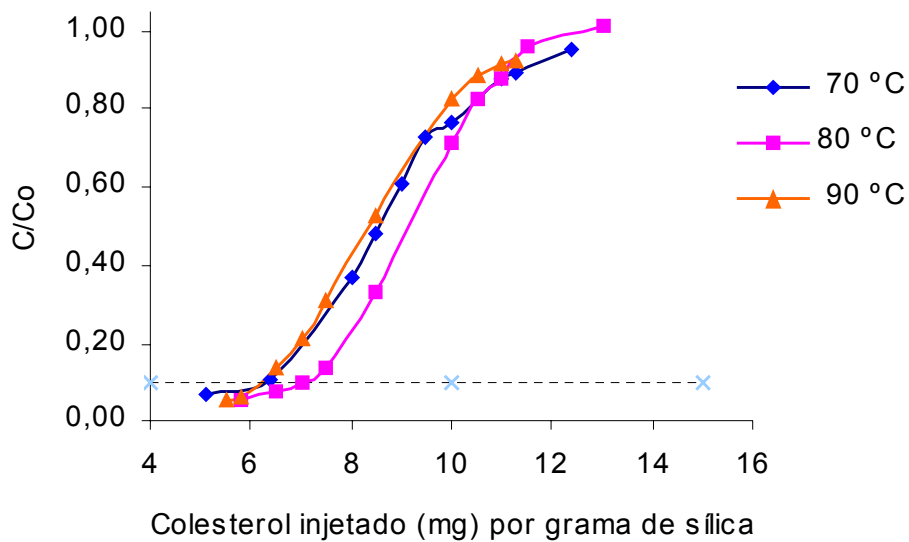


Figura 11 - Curva de ruptura para a coluna com 10 g de sílica gel (granulometria de 45 μm a 60 μm).

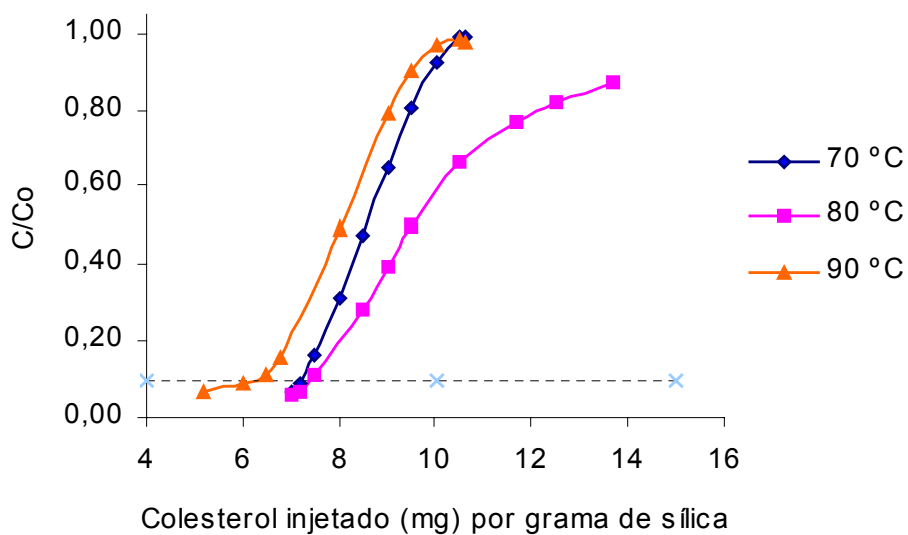


Figura 12 - Curva de ruptura para a coluna com 12,5 g de sílica gel (granulometria de 45 μm a 60 μm).

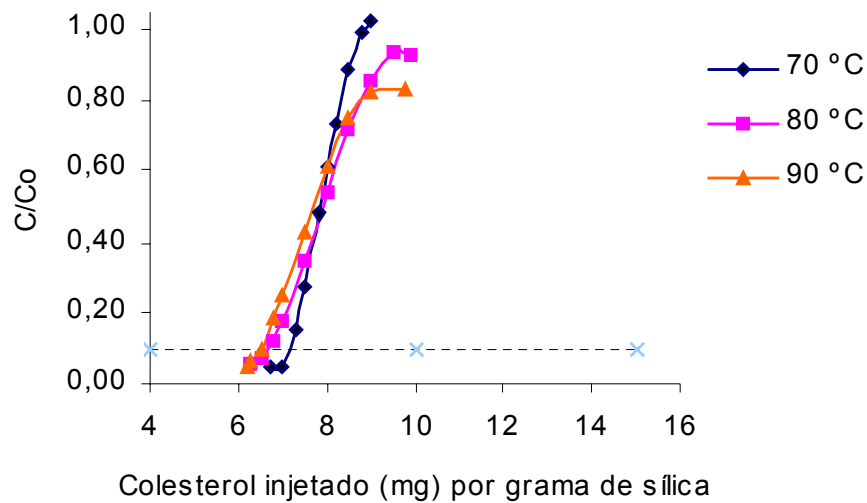


Figura 13 - Curva de ruptura para a coluna com 15 g de sílica gel (granulometria de 45 μm a 60 μm).

4.2.2. Efeito da altura do leito

Nas Figuras 14 a 16 encontram-se as curvas de ruptura para a sílica de menor granulometria (5 μm a 40 μm), para as temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C, respectivamente. Nessas figuras, faz-se a comparação do efeito da altura do leito para cada temperatura.

Observa-se que a altura do leito para a sílica de menor granulometria não apresentou efeito adicional no processo de adsorção do colesterol para as temperaturas utilizadas, ou seja, a diferença, entre as alturas dos leitos em estudo, não provocou nenhuma alteração no processo de adsorção, dado o efeito da dispersão axial do óleo de manteiga.

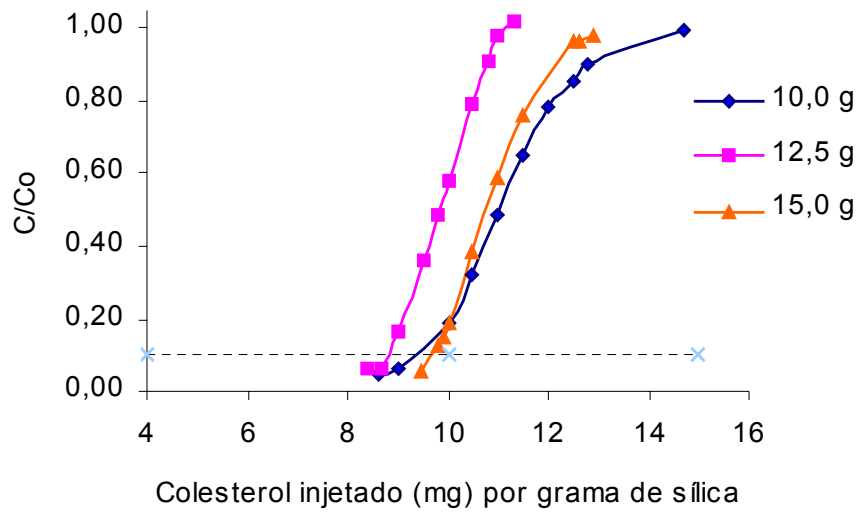


Figura 14 - Curva de ruptura a 70°C (sílica com granulometria de 5 µm a 40 µm).

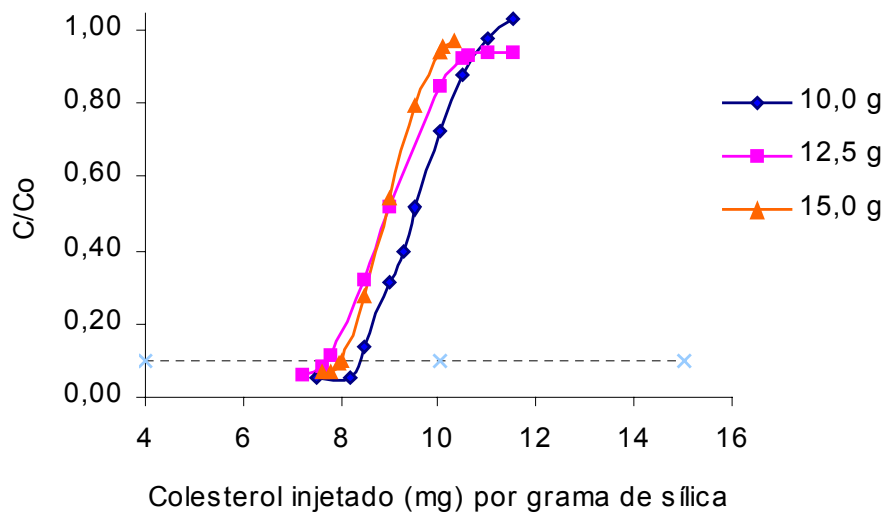


Figura 15 - Curva de ruptura a 80°C (sílica com granulometria de 5 µm a 40 µm).

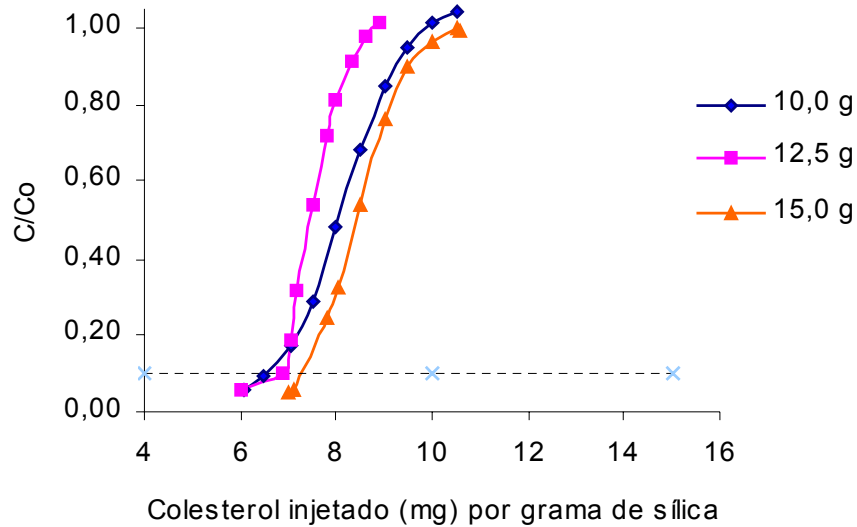


Figura 16 - Curva de ruptura a 90°C (sílica com granulometria de 5 μm a 40 μm).

Nas Figuras 17 a 19, encontram-se as curvas de ruptura para a sílica de granulometria de 45 μm a 60 μm , para as temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C. Nessas Figuras, faz-se a comparação do efeito da altura do leito para cada temperatura. Observa-se, nessas figuras (17,18 e 19), que a altura da coluna para a sílica de maior granulometria não apresentou efeito adicional na quantidade de colesterol adsorvido pela sílica para as temperaturas utilizadas. Pode-se observar que, em algumas colunas, o leito não está sendo usado da mesma forma. Isso é observável à temperatura de 70 e 80°C. Já à temperatura de 90°C essa diferença é reduzida, podendo ser decorrente de uma menor viscosidade do óleo, o que facilita o seu escoamento através do leito. Essa diferença na utilização do leito pode ser proveniente do maior fluxo nessas colunas de sílica de maior granulometria e, principalmente, a dificuldade de se obter um preenchimento manual totalmente uniforme das colunas, apesar de se ter adotado uma padronização para essa etapa. Isso pode ter levado a uma dispersão axial da fase móvel durante o escoamento através do leito.

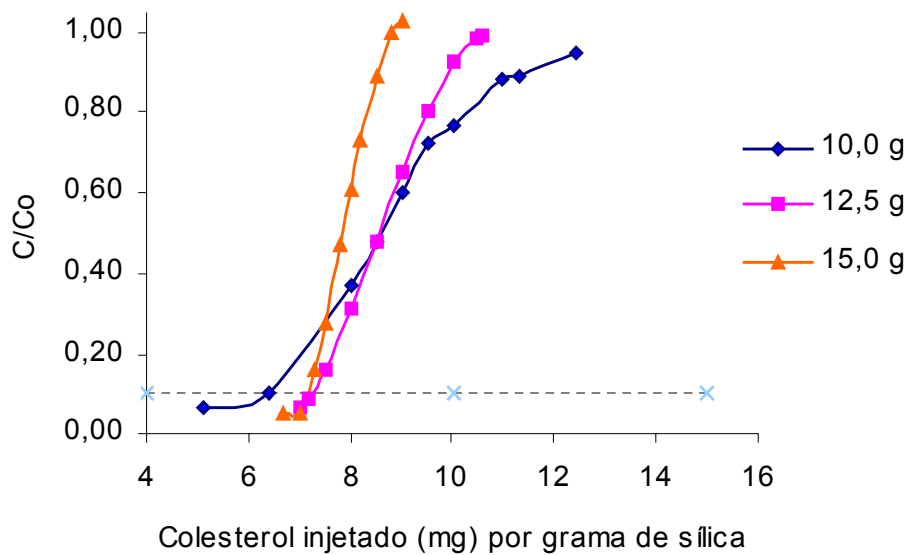


Figura 17 - Curva de ruptura a 70°C (sílica com granulometria de 45 µm a 60 µm).

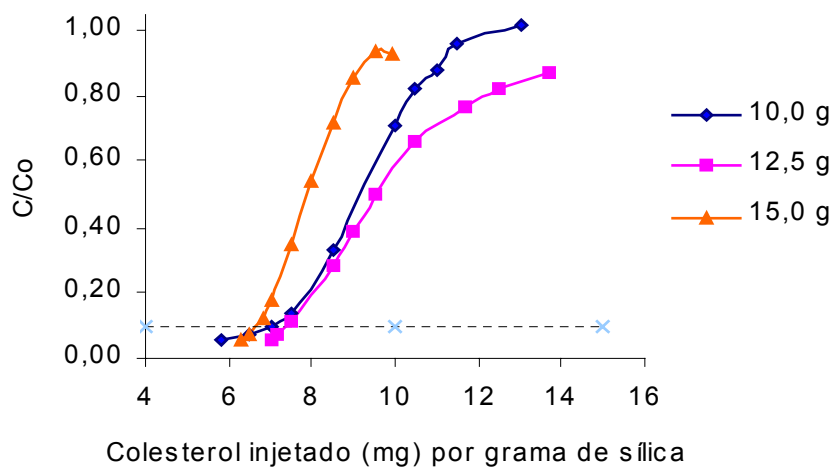


Figura 18 - Curva de ruptura a 80°C (sílica com granulometria de 45 µm a 60 µm).

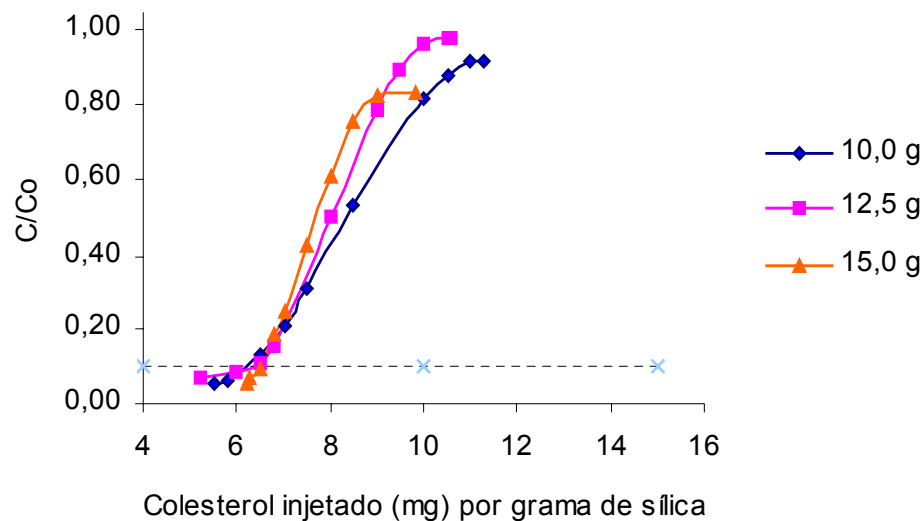


Figura 19 - Curva de ruptura a 90°C (sílica com granulometria de 45 μm a 60 μm).

4.2.3. Efeito da Granulometria da Sílica

O efeito da granulometria da sílica foi representado nas Figuras 20 a 28, nas quais TS1 é a sílica com granulometria de 5 μm a 40 μm e TS2 é a sílica com granulometria de 45 μm a 60 μm .

Nas Figuras de 20 a 22, são representadas as curvas de ruptura para a coluna preenchida com 10 g de sílica, e adsorção às temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C, sendo que o objetivo dessas curvas é comparar o efeito da granulometria da sílica no processo de adsorção.

Para a coluna com 10 g de sílica, observa-se nas Figuras 20 a 22 que o aumento da temperatura aproxima a quantidade de colesterol adsorvido por grama de sílica, para as duas granulometrias utilizadas.

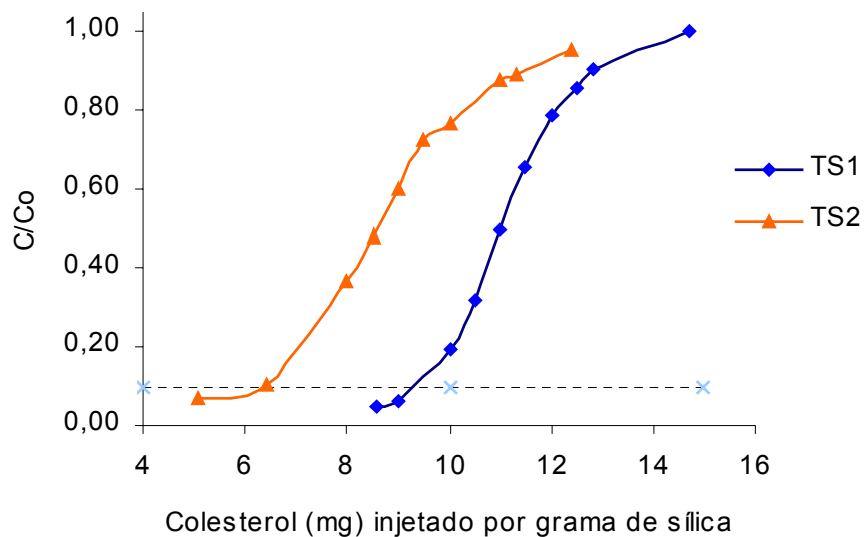


Figura 20 - Curva de ruptura a 70°C para as colunas com 10 g de sílica.

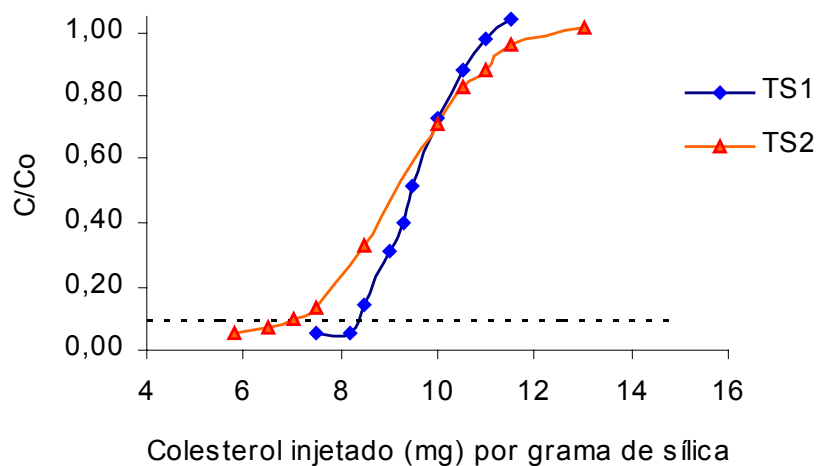


Figura 21 - Curva de ruptura a 80°C para as colunas com 10 g de sílica.

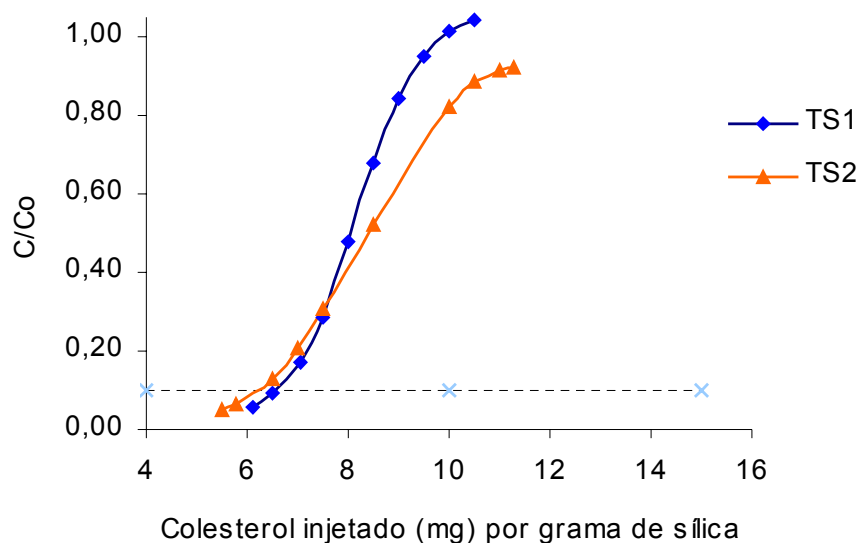


Figura 22 - Curva de ruptura a 90°C para as colunas com 10 g de sílica.

Nas Figuras 23, 24 e 25 são mostradas as curvas de ruptura para as colunas preenchidas com 12,5 g de sílica, e temperaturas de adsorção de 70°C, 80°C e 90°C.

Observa-se nas Figuras 23 a 25 que os resultados apresentados para as colunas preenchidas com 10 g de sílica foram confirmados, ou seja, à medida que se aumenta a temperatura de trabalho, os dois tipos de sílica tendem a ter as curvas de ruptura muito próximas.

Nas Figuras 26, 27 e 28 são mostradas as curvas de ruptura para as colunas preenchidas com 15 g de sílica às temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C.

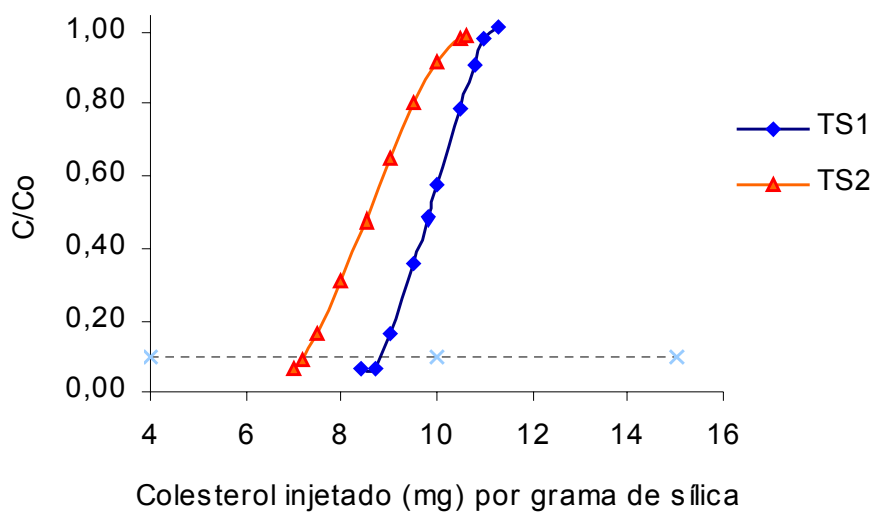


Figura 23 - Curva de ruptura a 70°C para as colunas com 12,5 g de sílica.

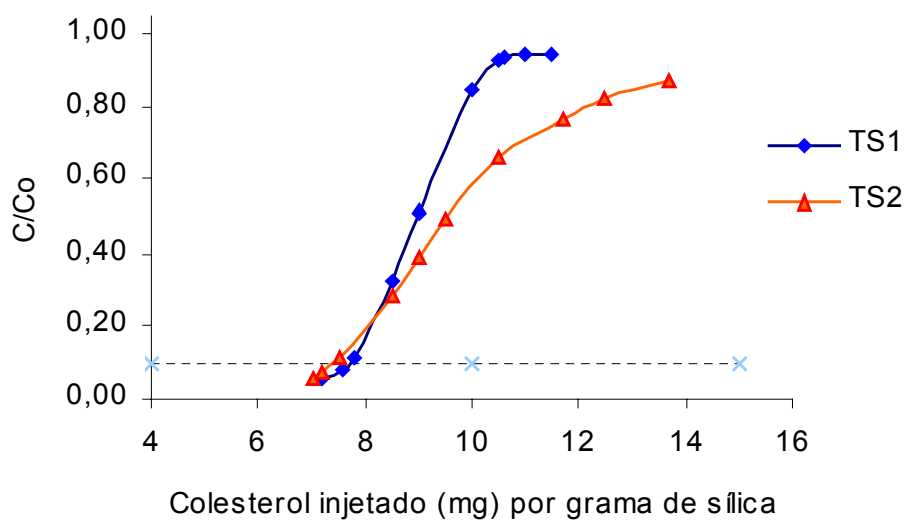


Figura 24 - Curva de ruptura a 80 °C para as colunas com 12,5 g de sílica.

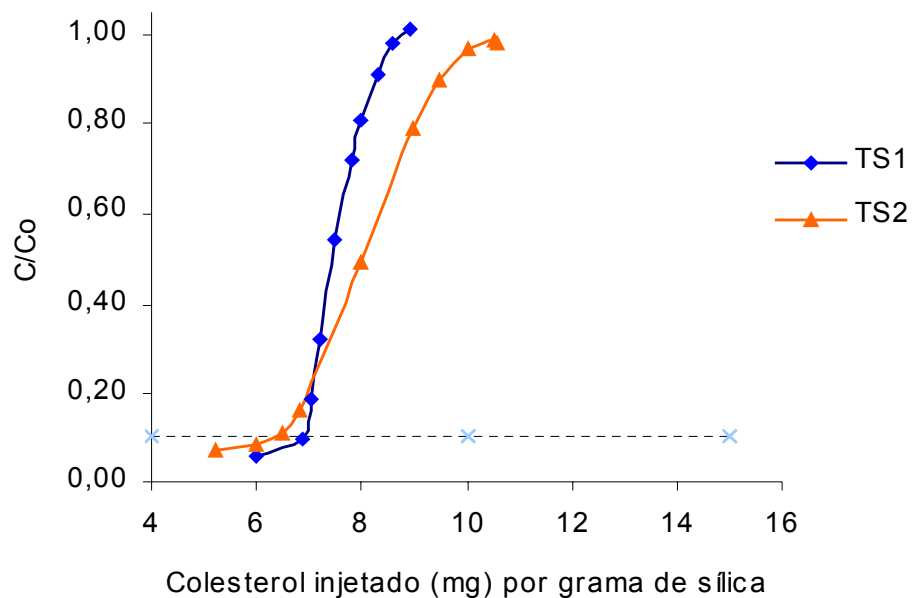


Figura 25 - Curva de ruptura a 90°C para as colunas com 12,5 g de sílica.

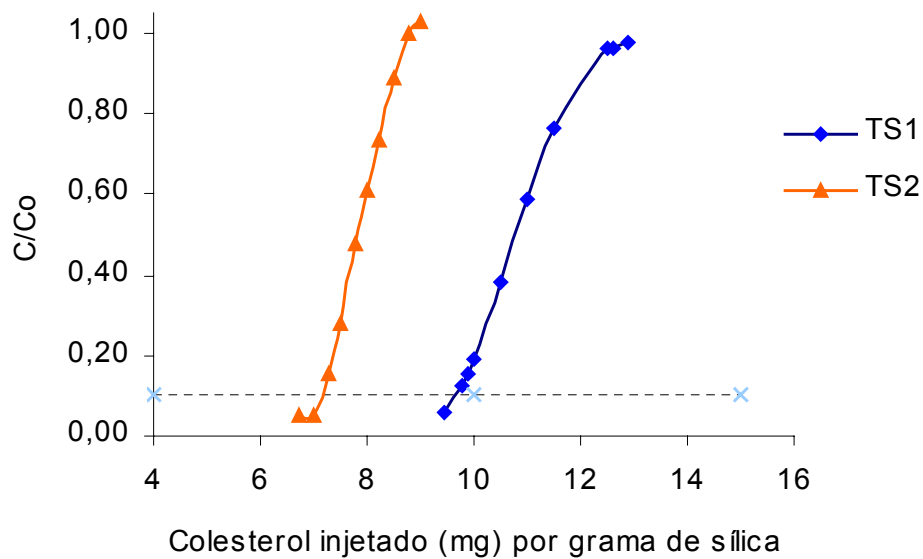


Figura 26 - Curva de ruptura a 70°C para as colunas com 15 g de sílica.

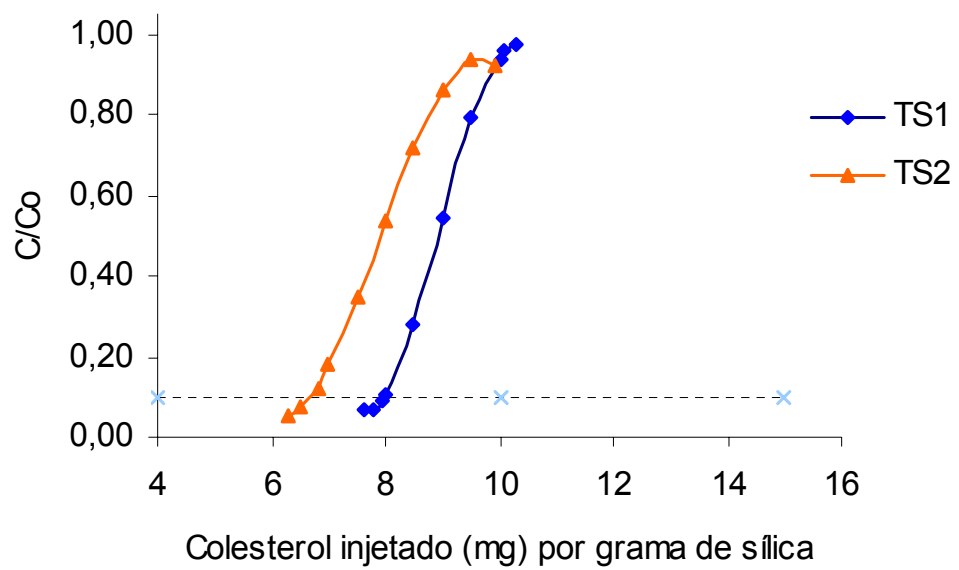


Figura 27 - Curva de ruptura a 80°C para as colunas com 15 g de sílica.

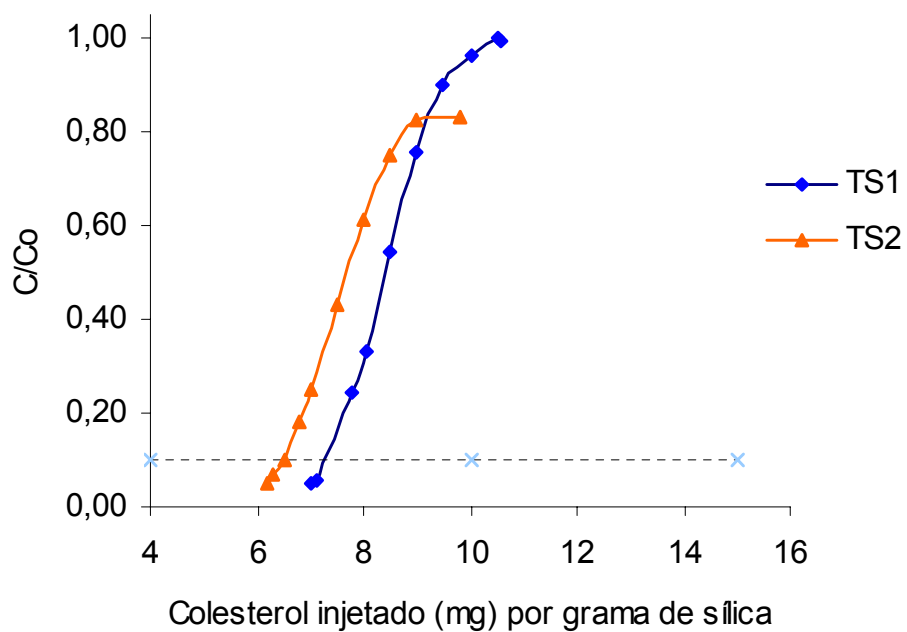


Figura 28 - Curva do ruptura a 90°C para coluna com 15 g de sílica.

Os dados representados nas Figuras 20 a 28 confirmam que o aumento de temperatura para as colunas utilizadas tornam as curvas de ruptura para as diferentes sílicas mais próximas. Isso pode estar relacionado com o aumento da vibração molecular, ou seja, para sílica com granulometria de 45 μm a 60 μm cujo fluxo foi de 1,50 mL/min \pm 0,3 mL/min, maior do que o fluxo para a sílica com granulometria de 5 μm a 40 μm (0,37 mL/min \pm 0,1 mL/min), é compensado pelo aumento de temperatura que provoca o aumento das vibrações moleculares. Mas ainda vale ressaltar que não se conhece a área superficial das sílicas, nem a sua porosidade. O Quadro 7 mostra as equações obtidas por regressão para os tratamentos aplicados e representados graficamente nas figuras anteriores.

O modelo polinomial ajustado aos dados das curvas de ruptura são apresentados no Quadro 7. O termo C/C_0 é a razão entre as concentrações de colesterol na fase móvel na saída do leite e no óleo de manteiga original, X é o colesterol injetado no leite (mg) por grama de sílica. Cada tratamento está definido no Quadro 5.

Quadro 7 - Modelo polinomial ajustado aos dados das curvas de ruptura

Tratamento	Equações	R ²
1	C/Co = - 0,0129X³ + 0,4356X² - 4,6236X + 15,7877	0,9957
2	C/Co = - 0,0427X³ + 1,2252X² - 11,3002X + 33,8989	0,9986
3	C/Co = - 0,0295X³ + 0,7260X² - 5,5892X + 13,8404	0,9986
4	C/Co = - 0,0645X³ + 1,9199X² - 18,5840X + 58,9091	0,9992
5	C/Co = - 0,0296X³ + 0,7989X² - 6,8471X + 18,9565	0,9982
6	C/Co = - 0,0800X³ + 1,8585X² - 13,8130X + 33,2838	0,9769
7	C/Co = - 0,0357X³ + 1,1500X² - 11,9599X + 40,4848	0,9991
8	C/Co = - 0,1090X³ + 2,9305X² - 25,7242X + 74,1686	0,9999
9	C/Co = - 0,0424X³ + 1,0743X² - 8,6698X + 22,6141	0,9981
10	C/Co = - 0,0061X³ + 0,1563X² - 1,1403X + 2,6134	0,9948
11	C/Co = - 0,0046X³ + 0,1257X² - 0,9385X + 2,1080	0,9913
12	C/Co = - 0,0088X³ + 0,2191X² - 1,6007X + 3,6896	1,0000
13	C/Co = - 0,0260X³ + 0,6393X² - 5,3930X + 13,9385	1,0000
14	C/Co = - 0,0041X³ + 0,1160X² - 0,9262X + 2,2884	0,9900
15	C/Co = - 0,0180X³ + 0,4355X² - 3,2096X + 7,5259	0,9991
16	C/Co = - 0,1253X³ + 2,9323X² - 22,2247X + 54,9131	0,9993
17	C/Co = - 0,0362X³ + 0,8488X² - 6,2694X + 14,8762	0,9997
18	C/Co = - 0,0394X³ + 0,8972X² - 6,4526X + 14,9612	0,9986

4.3. Influência das variáveis na quantidade máxima de colesterol adsorvido

A influência das variáveis temperatura (70°C, 80°C e 90°C) e massa de sílica (10,0 g, 12,5 g e 15,0 g) para cada granulometria de sílica utilizada na quantidade máxima de colesterol adsorvido estão representadas nas curvas de ruptura para a remoção de 90% ($C/C_0 = 0,1$) de colesterol do óleo (Quadro 8).

Quadro 8 - Equações relacionando a quantidade máxima de colesterol adsorvido e as variáveis em estudo para redução de 90% da concentração de colesterol do óleo de manteiga

Granulometria da Sílica	Equação	R ²
5 µm a 40 µm	$Z = 38,2400 - 0,1158 X - 3,4553 Y + 0,1411 Y^2$	0,9479
45 µm a 60 µm	$Z = 6,9479$	-----

Pelas equações obtidas no Quadro 6, nas quais X é a temperatura (°C), Y é a quantidade de sílica (g) e Z é o colesterol injetado (mg) por grama de sílica, pode-se verificar que temperaturas mais baixas para a sílica de menor granulometria (5 µm a 40 µm) permite injetar maior massa de colesterol para se obter 90% de redução na concentração de colesterol. Entretanto, a temperatura ideal para a separação cromatográfica precisa ainda ser determinada, dependendo de diversas variáveis, incluindo o nível de redução na concentração de colesterol no óleo, o custo operacional, a limpeza da sílica, entre outros.

Em relação à altura do leito (quantidade de sílica), observa-se uma redução na carga máxima para a coluna com 12,5 gramas, enquanto para as outras colunas mantém valores muito próximos para cada temperatura (Figura 29). Esse comportamento não-esperado pode ser em virtude do preenchimento da coluna, que é a etapa considerada crítica para este processo.

Para a sílica de maior granulometria (45 µm a 60 µm), a temperatura e a altura do leito (quantidade de sílica) não apresentaram nenhum efeito

estatisticamente significativo, a 5% de probabilidade, no processo. Isso permite concluir que, para as condições de trabalho utilizadas, a relação entre o diâmetro da coluna e altura, tem um efeito mínimo sobre a quantidade máxima de colesterol adsorvido. A coluna preenchida com a sílica de maior granulometria tem a vantagem de provocar menor queda de pressão no leito.

Nas Figuras 29 e 30, são representadas graficamente as equações do Quadro 6. Pode-se observar que, para a sílica com menor granulometria, o aumento de temperatura provocou uma redução na quantidade de colesterol adsorvido por grama de sílica e a altura do leito apresentou um ponto de mínimo que não era esperado. Esse comportamento não-esperado provocado pela altura do leito pode estar relacionado com a dificuldade do preenchimento manual. Para a sílica de maior granulometria, tanto a temperatura quanto a altura do leito não apresentaram efeitos na quantidade de colesterol adsorvido pela sílica.

$$Z = 38,2400 - 0,1158 X - 3,4553 Y + 0,1411 Y^2$$

$$R^2 = 0,9479$$

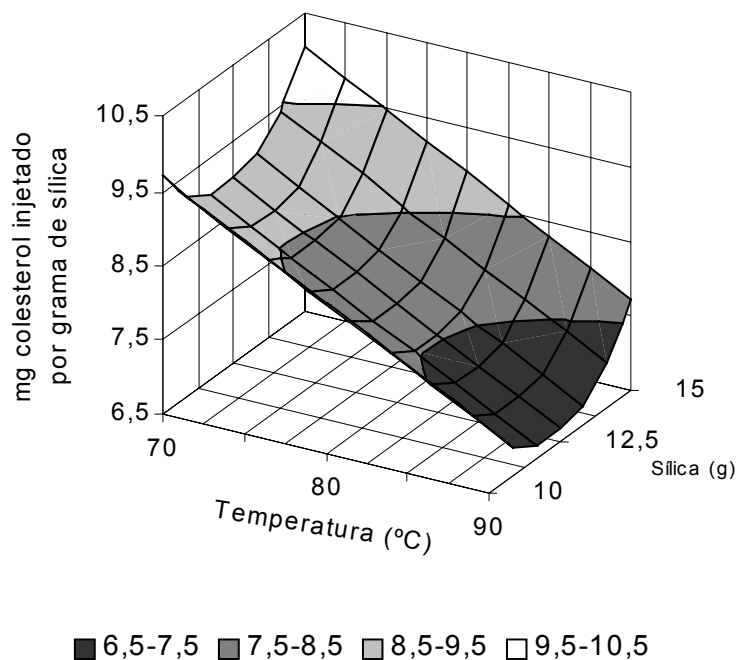


Figura 29 - Efeito da temperatura e da massa de sílica na quantidade máxima de colesterol injetado para redução de 90% da concentração para a sílica gel de menor granulometria.

$$Z = 6,9479$$

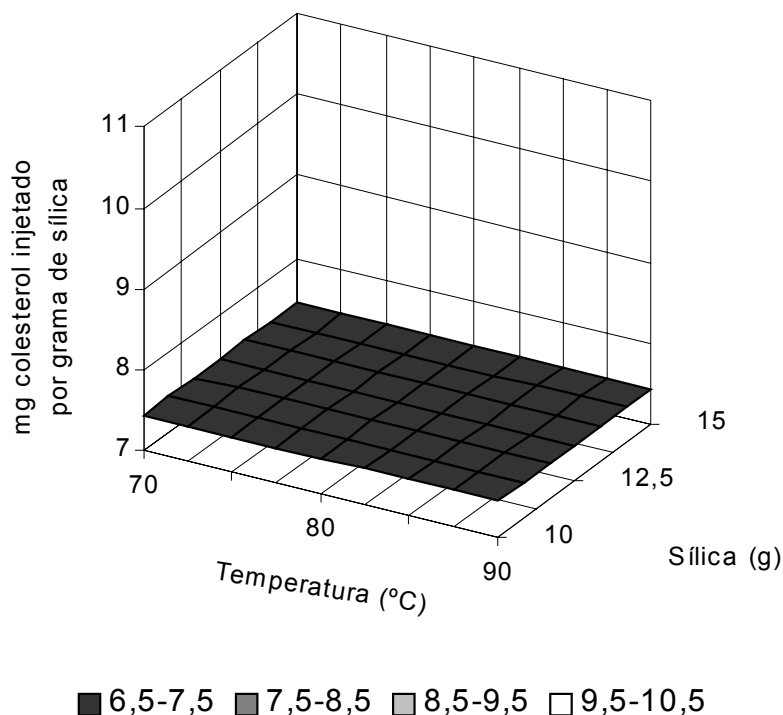


Figura 30 - Efeito da temperatura e da massa de sílica na quantidade máxima de colesterol injetado para redução de 90% na concentração para a sílica gel de maior granulometria.

No Quadro 7, apresenta-se um resumo da quantidade máxima de colesterol injetado por grama de sílica para cada um dos tratamentos, e a quantidade máxima de óleo produzido com 90% de redução na concentração de colesterol. Neste mesmo Quadro, TS1 é a sílica de menor granulometria e TS2 é a sílica de maior granulometria.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho e a quantidade de óleo produzido com concentração de colesterol reduzido por grama de sílica, podemos observar que uma maior altura do leito proporcionou uma maior produção de óleo com concentração de colesterol reduzido, já que houve uma redução no volume intersticial por grama de sílica, portanto uma maior produção de óleo a partir de uma mesma relação de óleo e massa de adsorvente. Isto é observável no Quadro 9 na produção do óleo com 90% de redução na concentração de colesterol para a sílica de maior granulometria.

Apesar da carga máxima admitida ser a mesma, o volume de óleo produzido foi maior para a coluna com maior altura (15 g de sílica).

Quadro 9 - Quantidade máxima de óleo produzido por grama de sílica, com 90% de redução na concentração de colesterol, a partir de um óleo com uma concentração de 246 mg por 100g

T (°C)	Sílica (g)	Colesterol injetado (mg) por grama de sílica		Óleo produzido (mL) por grama de sílica	
		TS1	TS2	TS1	TS2
70	10,00	9,7	6,9	2,7	1,6
70	12,50	9,0	6,9	2,5	1,6
70	15,00	10,1	6,9	3,1	1,7
80	10,00	8,5	6,9	2,2	1,6
80	12,50	7,8	6,9	1,9	1,6
80	15,00	8,9	6,9	2,5	1,7
90	10,00	7,4	6,9	1,6	1,6
90	12,50	6,7	6,9	1,3	1,6
90	15,00	7,7	6,9	2,0	1,7

Segundo KEEN (1991), os principais adsorventes para o processo de remoção de colesterol e seus óxidos da gordura do leite são preferencialmente selecionados de um grupo que consiste de carvão, carvão ativado, carvão impregnado com sais metálicos, silicatos, aluminas e compostos de magnésio. Destaca-se, ainda, a necessidade do uso de grande quantidade de adsorventes para se conseguir uma boa separação. Para um processo contínuo, uma redução de 90% na concentração de colesterol foi atingida quando foi utilizada uma relação de 0,8 mL a 0,3 mL de óleo por grama de adsorvente, que variou de acordo com o tipo de adsorvente utilizado. Neste trabalho, foi possível obter até 3,1 mL de óleo por grama de sílica (5 µm a 40 µm). Para a sílica de maior granulometria, foi possível obter até 1,7 mL de óleo por grama de sílica.

Ainda, vale ressaltar que no trabalho realizado por KEEN (1991), quando carbono era impregnado com sais metálicos, a capacidade para a adsorção do colesterol era aumentada muito significativamente, uma possível alternativa para melhorar a capacidade da sílica.

Considerando os resultados obtidos, esse processo surge como uma alternativa para a elaboração de produtos com baixa concentração de colesterol.

A dieta é um dos muitos fatores que levam ao aumento do colesterol e uma dieta balanceada pode ajudar na redução do colesterol sanguíneo, portanto a produção de alimentos com baixa concentração de colesterol é uma alternativa à competição dos produtos de origem animal com os de origem vegetal.

4.4. Efeito dos tratamentos na produção de óxidos de colesterol

A análise de óxidos de colesterol teve como objetivo verificar se o processo de remoção de colesterol, nas condições do experimento, poderia provocar a formação desses compostos.

Os resultados mostraram que as concentrações dos óxidos 25-hidroxicolesterol e o 7- β -hidroxicolesterol estavam abaixo do limite de detecção do método utilizado neste trabalho (Figuras 31 e 32).

Para as condições de análise, a concentração do óxido 25-hidroxicolesterol no óleo foi menor que 10 $\mu\text{g/g}$ e o óxido 7- β -hidroxicolesterol foi menor que 5 $\mu\text{g/g}$. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por CSIKY (1982) que encontrou 2,6 μg do óxido 25-hidroxicolesterol por grama de óleo em manteiga. NIELSEN et al (1996) encontraram 0,26 μg do óxido 7- β -hidroxicolesterol por grama de óleo.

KEEN (1991) conclui que colunas empacotadas com adsorventes podem ser usadas para redução do colesterol e seus óxidos em gordura de leite anidra. Em seu trabalho, usando carvão como adsorvente, os óxidos analisados foram completamente removidos nas primeiras frações da fase móvel e, entre estes, o 5,6- α -epoxicolesterol. Portanto, considerando os resultados obtidos por KEEN (1991) e que o óxido 25-hidroxicolesterol é um dos mais tóxicos, o processo de adsorção é um processo que pode ser usado tanto para reduzir o colesterol quanto seus óxidos.

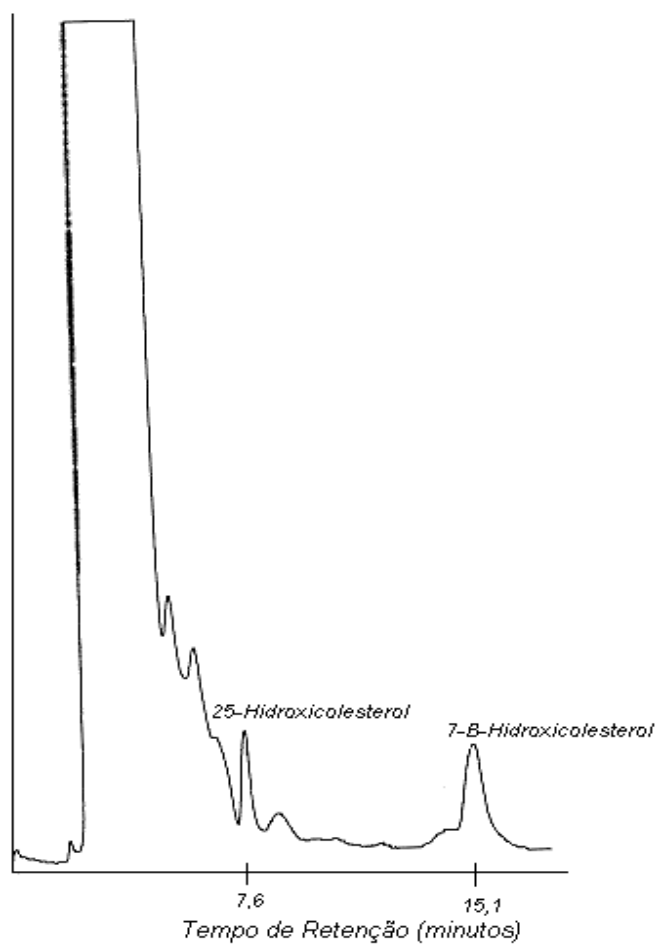


Figura 31 - Óleo de manteiga adicionado de 4 μg do óxido 25-hidroxicolesterol e 0,8 μg do óxido 7- β -hidroxicolesterol. Condições de análise (fase móvel de 12% de isopropanol em hexano com fluxo de 1 mL/min, com detector a 208 nm).

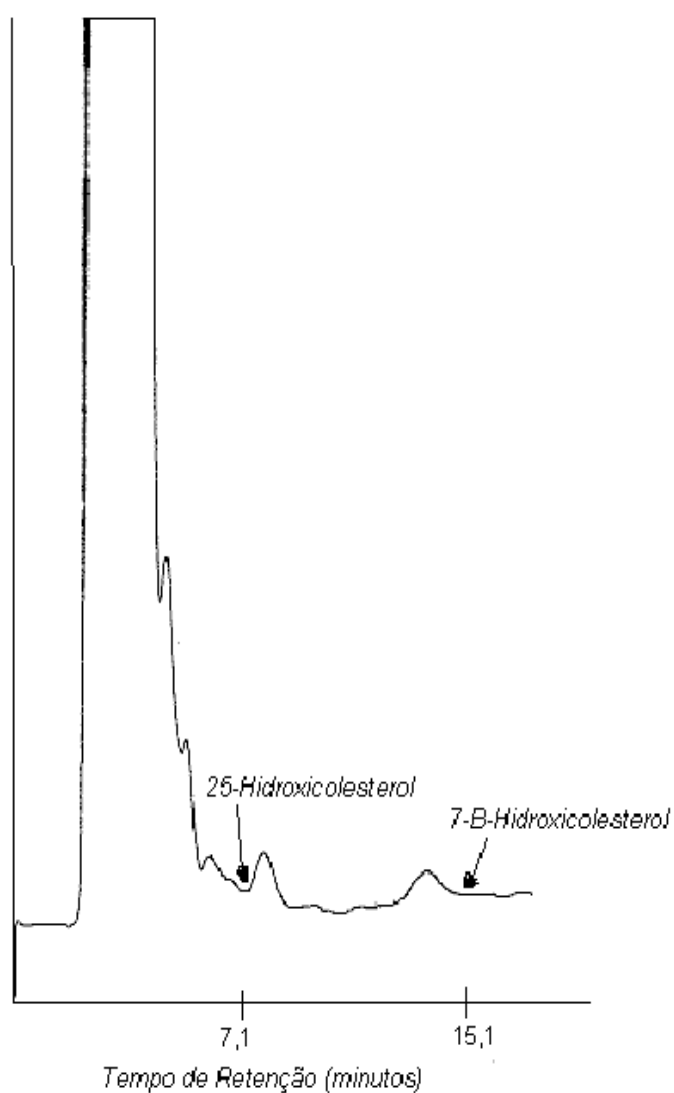


Figura 32 - Óleo de manteiga. Condições de análise (fase móvel de 12% de isopropanol em hexano com fluxo de 1 mL/min, com detector a 208 nm). Óleo de manteiga original (óxidos abaixo do limite de detecção).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Avaliou-se o processo de remoção de colesterol da gordura de leite por adsorção em coluna cromatográfica com sílica gel em função da temperatura, altura do leito (quantidade de sílica) e granulometria.

Usando óleo de manteiga com uma concentração inicial média de 246 mg por 100 g, obteve-se uma redução de até 95% na concentração para as primeiras frações da fase móvel.

Para a sílica de menor granulometria, foi possível injetar uma quantidade máxima de 10,1 mg de colesterol por grama de sílica para atingir a redução de 90% na concentração de colesterol no óleo. A redução de temperatura resultou num aumento da quantidade máxima de colesterol adsorvido pelo adsorvente. A altura do leito não alterou a quantidade máxima de colesterol adsorvido, mas provocou uma redução no volume intersticial por unidade de massa do adsorvente, portanto um aumento na quantidade de óleo produzido quando se utiliza uma mesma relação de óleo e adsorvente. Foi possível produzir até 3,1 mL de óleo com uma redução de 90% na concentração de colesterol por grama de adsorvente.

Para a sílica de maior granulometria, a temperatura não apresentou efeito significativo, e a altura do leito somente reduziu o volume intersticial do leito por unidade de massa de sílica, da mesma forma que a sílica de menor granulometria. A quantidade máxima de colesterol admitida foi de 6,9 mg, com uma produção de até 1,7 mL de óleo por grama de sílica.

Apesar da sílica de menor granulometria ter apresentado uma carga máxima maior por unidade de massa do adsorvente, os resultados mostraram que o efeito de um fluxo menor pode ter alterado os resultados, já que não se conhece a porosidade, nem a área superficial. Em temperaturas mais altas, a quantidade máxima de colesterol adsorvido apresentou uma diferença menor entre as duas sílicas.

Foi verificado que os tratamentos não provocaram aumento, além da capacidade de detecção, na concentração dos óxidos, imediatamente após o processo, ou, pelo menos, estavam em concentrações inferiores a 10 µg/g de óleo para o óxido 25-hidroxicolesterol, e 5 µg/g de óleo para o óxido 7-β-hidroxicolesterol.

6. RECOMENDAÇÕES

Existem diversas propriedades físicas e variáveis operacionais que influenciam o processo de adsorção em leito fixo. Especificamente, para o colesterol, serão estabelecidas algumas sugestões de pesquisas que visem contribuir com os dados já existentes, como se segue abaixo:

- Fazer estudo da relação de equilíbrio (isoterma de adsorção).
- Verificar o efeito da porosidade e área superficial na quantidade máxima de colesterol adsorvido.
- É necessário fazer um estudo sobre a cinética de adsorção do colesterol na sílica gel, com o objetivo de verificar como o fluxo através do leito pode alterar o valor da quantidade máxima de colesterol adsorvido.
- Verificar o comportamento do processo em temperaturas menores, entre 40°C e 70°C.
- Determinar a possibilidade de recuperação do adsorvente com o uso de solventes.
- Verificar a estabilidade quanto aos aspectos físico-químicos e sensoriais dos produtos elaborados com o óleo de manteiga contendo baixa concentração de colesterol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, H.; BOSAEUS, I.; ELLEGARD, L. Effect of low-fat milk on cholesterol absorption and excretion in ileostomy subjects. **European Journal Clinical Nutrition**, v.49, p.274-281, 1995.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos**. 1.ed. Viçosa: UFV, 1995. 335p.
- BHASKAR, A.R.; RIZVI, S.S.H.; SHERBON, J.W. Anhydrous milk fat fractionation with continuous countercurrent supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Science**, v.58, p.748-752, 1993.
- BOUDREAU, A.; ARUL, J. Cholesterol reduction and fat fractionation technologies for milk fat: an overview. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1772-1781, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Doenças cardiovasculares no Brasil. **Ciência Hoje**, v.103, 1994. Informe publicitário.
- CASIRAGHI, E.; LUCISANO, M.; POMPEI, C. DELLEA, C. Cholesterol determination in butter by high performance chromatography. **Milchwissenschaft**, v.49, p.194-196, 1994.
- CHAO, R.R.; MULVANEY, S.J.; BAILEY, M.E.; FERNANDO, L.N. Supercritical CO₂ conditions affecting extraction of lipid and cholesterol from ground beef. **Journal of Food Science**, v. 56, p.182-187, 1991.
- CHEN, B.H.; CHIU, C.P.; CHEN, B.H. Determination of cholesterol oxides in heated lard by liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.50, p.53-58, 1994.
- COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: UNICAMP. 1997. 279p.

- CSIKY, I. Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 24, p. 381-389, 1982.
- CZECH, B.; PETER, S; WEIDNER, E. The reality of cholesterol-free butter. **Dairy Industry International**, v.58, p.25-27, 1993.
- DEHAL, S.; FREIER, T.A.; YOUNG, J.W.; HARTMAN, P.A.; BEITZ, D.C. A novel method to decrease the cholesterol content of foods. **Dairy Processing and Formulation**, v.12, p.203-220, 1991.
- ELLING, J.L.; DUNCAN, S.E. Physical properties of 20% milk fat reformulated creams manufactured from cholesterol reduced butteroil. **Journal of Food Science**, v.61, p.375-378, 1996.
- FDA. Food labelling. Definitions of terms, cholesterol-free, low cholesterol and reduced cholesterol; Tentative Final Rules. **U.S. Food and Drug Administration**. Fed. Register (July19), v.55, pág. 29456, 1990.
- FDA. Proposals for cholesterol-free from milk fat using supercritical and low cholesterol foods. **U.S. Food and Drug Administration**. Fed. Register (Nov. 25), v.51, pág. 42584, 1986.
- FELDMAN, E.B. Nutrition and diet in management of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Modern Nutrition in Health and Disease**, v.2, p.1298-1316, 1994.
- GILLILAND, S. E.; NELSON, C. R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.377-381, 1985.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.15-18, 1977.
- GURR, M. I. Dietary lipids and coronary heart disease: old evidence, new perspective. **Progress in Lipid Research**, v.31, p.195-243, 1992.
- HAUKSSON, H.; HEDETOFT, S. Tecnologia para redução de colesterol em alimentos: uso de pectinas como substitutos de gordura. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996. Campinas-SP. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, 1996. Paginação irregular.
- HAYES, K.C. Designing a cholesterol-removed fat blend for frying and baking. **Food Technology**, April. p.92-97, 1996.
- HUBER, W.; MOLERO, A.; DE LA OSSA, M. Determination of cholesterol in milk fat by supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.715, p.333-336, 1995.

- HUBER, W.; MOLERO, A.; PEREYRA, C. Dynamic supercritical CO₂ extraction for removal of cholesterol from anhydrous milk fat. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.143-151, 1996.
- KAUFMANN, V.G.; BIERNOTH, G.; FREDE, E.; MERK, W.; PRECHT, D.; TIMMEN, H. Fraktionierung von butterfett durch extraktion mit überkritischem CO₂. **Milchwissenschaft**, v. 37, p.92, 1982.
- KEEN, A.R. **Method of producing a substantially sterol free fat or oil**. United States Patent (1991) US 5039541, 11pág.
- KLAVER, F.A.M.; MEER, R. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1120-1124, 1993.
- KOSIKOWSKI, F.V. "Cholesterol-Free" milks and milk products: Limitations in production and labeling. **Food Technology**, p.130-140, November 1990.
- LANZANI, A.; BONDIOLI, P.; MARIANI, C.; FOLEGATI, L.; VENTURINI, S. FEDELI, E. BARRETEAU, P. A new short-path distillation system applied to the reduction of cholesterol in butter and lard. **Journal of American Oil Chemists Society**, v.71, p.609-614, 1994.
- MANZI, P.; PANFILI, G.; PIZZOFERRATO, L. Normal and reversed phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinols, carotenes and sterols in dairy products. **Chromatographia**, v.43, p.89-93, 1996.
- MATILLA, P. H.; PIIRONEN, V. I. Contents of cholecalciferol, ergocalciferol, and their 25-hydroxylated metabolites in milk products and raw meat and liver as determined by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2394-2399, 1995.
- MCCABE, W.L.; SMITH, J.C.; HARRIOT, P. **Unit operations of chemical engineering**. 5.ed. USA : McGraw-Hill, 1993. 1130 p.
- MOHAMED, R.S.; NEVES, G.B.M.; KIECKBUSCH, T.G. Reduction in cholesterol and fractionation of butter oil using supercritical CO₂ with adsorption on alumina. **International Journal of Food Science and Technology**, v.33, p.445-454, 1998.
- MULDER, H. ; WALSTRA, P. **The milk fat globule** : emulsion science as applied to milk products and comparable foods. Wageningen : PUDOC, 1974. 296 p.
- NIELSEN, J.H.; OLSEN, C.E.; DUEDAHL, C.; SKIBSTED, L.H. Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.101-113, 1995.

- NIELSEN, J.H.; OLSEN, C.E.; JENSEN, C.; SKIBSTED, L.H. Cholesterol oxidation in feta cheese produced from high-temperature bleached and from non bleached butter oil from bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v.63, p.615-621, 1996.
- O'DONNEIL, J.A. Future of milk fat by production or processing: integration of nutrition, food science, and animal science. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1797-1801, 1993.
- PARK, S.W.; ADDIS, P.B. HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. **Journal of Food Science**, v.50, p.1437-1441, 1985.
- PINHEIRO, A.J.R.; MOSQUIM, M.C.A.V. **Processamento de leite de consumo**. Viçosa: UFV., s.d. Paginação irregular.
- RASIC, J.L.; VUJICIC, I.F.; SKRINJAR, M. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Biotechnology Letters**, v.14, p. 39-44, 1992.
- ROSSI, E. A. **Revista Época**. São Paulo : Globo, nº 3, p.130, maio 1998.
- SALVA, T.J.G. Tecnologia para redução de colesterol em alimentos: métodos enzimáticos. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996. Campinas-SP. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, 1996. Paginação irregular
- SAS.EXE. Versão 6.0. System for Analyses Statistics: SAS Institute Inc. SAS®, 1985.
- SCHRODER, B.; BAER, R. Consumer evaluation of reduced-cholesterol butter. **Food Technology**, October. p.104-107, 1991.
- SCHRODER, B.; BAER, R. Utilization of cholesterol-reduced milk fat in fluid milks. **Food Technology**, November. p.145-1150, 1990.
- SHUKLA, A.; BHASKAR, A. R.; RIZVI, S.S.H.; MULVANEY, S. J. Physicochemical and rheological properties of butter made from supercritically fractionated milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 45-54, 1993.
- SIEBER, R. Cholesterol removal from animal food – Can it be justified? **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v.26, p.375-387, 1993.
- SLIKTA, M.J.C. Tecnologia para redução de colesterol em alimentos: alimentos com baixo teor de gordura. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996. Campinas-SP. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, 1996. Paginação irregular

- STEWART, G.; GOSSELIN, C.; PANDIAN, S. Selected ion monitoring of tert-butyltrimethylsilyl cholesterol ethers for determination of total cholesterol of foods. **Food Chemistry**, v.44, p.377-380, 1992.
- SUNDFELD, E. Tecnologia para redução de colesterol em alimentos: utilização de saponinas e ciclodextrinas. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996. Campinas-SP. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, 1996. Paginação irregular.
- THARI, K.K.; CROCIANI, J.; BALLONGE, J. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.149-151. 1995.
- WATERS CORPORATION. Chromatography. Disponível: <http://www.waters.com/>. 1998.
- YOKOYAMA, S. Tecnologia para redução de colesterol em alimentos: microparticulação em alimentos. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996. Campinas-SP. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, 1996. Paginação irregular
- ZACOUR, A.C. **Efeito da quitina na dieta sobre a absorção e o metabolismo do colesterol**. 1988. p.9-11. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.