

JANAÍNA TELES DE FARIA

**PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DE SAPONINA DE *Quillaja* E
 β -LACTOGLOBULINA: EFEITOS DO pH, DA FORÇA IÔNICA E
DAS CONDIÇÕES DE HOMOGENEIZAÇÃO**

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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F224p
2015

Faria, Janaína Teles de, 1986-
Propriedades emulsificantes de saponina de *Quillaja*
e β -lactoglobulina : efeitos do pH, da força iônica e das
condições de homogeneização / Janaína Teles de Faria. -
Viçosa, MG, 2015.
xviii, 114f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Luis Antônio Minim.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Emulsões.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664

JANAÍNA TELES DE FARIA

**PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DE SAPONINA DE *Quillaja* E
β-LACTOGLOBULINA: EFEITOS DO pH, DA FORÇA IÔNICA E
DAS CONDIÇÕES DE HOMOGENEIZAÇÃO**

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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de Fevereiro de 2015.

Prof^a. Dr^a. Valéria Paula Rodrigues Minim
(Coorientadora)

Prof. Dr. Eduardo Basílio de Oliveira
(Coorientador)

Prof. Dr. Álvaro Vianna Novaes de
Carvalho Teixeira

Prof. Dr. Sérgio Henriques Saraiva

Prof. Dr. Luis Antônio Minim
(Orientador)

Aos dois maiores e melhores professores da minha vida: meus pais, Antônio
Ângelo e Janua Coeli, com quem aprendi as lições mais importantes da vida.

À minha irmã Isabella, que isso lhe seja um incentivo
a nunca desistir de lutar por seus objetivos.

Dedico!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

“A satisfação reside no esforço, não no resultado obtido. O esforço total é a plena vitória.”

Mohandas Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos. Por ter me dado forças nos momentos difíceis e pelas pessoas certas que colocou em meu caminho. Por possibilitar-me vencer os obstáculos e por todas as conquistas alcançadas

Às duas pessoas sem as quais certamente eu não teria chegado até aqui: meus pais - meus melhores amigos - Antônio Ângelo e Janua Coeli! Obrigada pelo amor, por acreditarem no meu sonho e sonharem comigo. Obrigada por não me deixarem abater nos momentos em que o sonho mais parecia um pesadelo. Obrigada por se fazerem tão presentes e da distância algo quase imperceptível. Obrigada pela paciência em atenderem minhas ligações aos prantos e me acalmarem, dizendo que tudo daria certo, como sempre deu. Obrigada por se alegrarem com as boas notícias, com minhas expectativas e planos. Obrigada por sempre me apoiarem e ficarem sempre ao meu lado. Não há agradecimento suficiente a vocês.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade de estudo e de crescimento pessoal e profissional. Por tudo que aqui aprendi.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Antonio Minim, pela confiança em mim depositada desde o tempo da iniciação científica. Agradeço pela oportunidade, atenção e conhecimento transmitido. Obrigada por ter-se mantido calmo e paciente nos meus momentos de desespero e me ajudar a buscar uma saída. Agradeço por despertar-me o gosto pela pesquisa. Muito obrigada, professor!

À minha coorientadora, Prof^a Dra. Valéria Paula Rodrigues Minim, pela gentileza, simpatia e incentivo. Por disponibilizar seus equipamentos, os quais foram essenciais para meu trabalho de tese.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Eduardo Basílio de Oliveira, pela boa vontade e disponibilidade. Pelas conversas e ensinamentos partilhados. Pela paciência e coorientação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da Silva, pelas ideias e sugestões, pela atenção e gentileza.

Ao Prof. Dr. Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, pela simpatia, receptividade e disponibilidade. Obrigada pela boa vontade em ajudar sempre que precisei e por todo ensinamento partilhado. Obrigada por ter aceitado prontamente o convite para compor a banca de defesa da tese.

Ao Prof. Dr. Sergio Henriques Saraiva, por ter aceitado, gentilmente, o convite para compor a banca de defesa de tese. Obrigada pela receptividade e disponibilidade.

Ao Dinho querido, Yaro Luciolo, pelo carinho e incentivo constante, pela amizade e paciência quase inesgotável nos meus momentos de nervosismo, ansiedade e desespero (que não foram poucos). Obrigado por se manter sempre otimista, por acreditar em mim e tentar me fazer acreditar também. Obrigada por escutar inúmeras vezes as narrações detalhistas dos meus problemas, por “trabalhar meu psicológico” e constantemente me dizer que tudo daria certo. Obrigada por me ajudar sempre que podia, Dinho!

À minha madrinha Mariângela, pelo seu amor, carinho e amizade, pelas orações, incentivo e constante motivação, por acreditar sempre na minha capacidade.

À minha irmã Isabella, pelo apoio e incentivo, pelas palavras de conforto e encorajamento.

Às minhas avós, Ana e Maria, por compreenderem minha ausência, pelas orações e preocupações, por todo carinho e amor. Aos meus avôs Ângelo (*in memoriam*) e Neli (*in memoriam*).

Ao tio Zezé e tia Zarife, pelo carinho constante.

Ao querido amigo Fábio, que me ensinou o caminho da pesquisa, pela amizade sincera e ensinamentos partilhados desde a época da iniciação científica, pelo apoio e incentivo constantes, pelas palavras sábias.

Ao meu grande e querido amigo Moysés. Pela amizade e pelos conselhos. Obrigada pelo carinho e sempre me querer bem.

Às minhas amigas queridas, Thaís e Pricilla (Priul), pela amizade e torcida, pelo incentivo e apoio. Obrigada, meninas!

Às meninas do Laboratório Desenvolvimento e Simulação de Processos, pelo aprendizado constante, pela convivência, companhia e

risadas. Em especial à Priscila, Paula, Lizzy e Marcinha, pela paciência e palavras de conforto.

Aos meus amigos da pós-graduação, pelos estudos, risadas e bons momentos. Muito obrigada Jussara e Lucas, pelos cafezinhos nos últimos tempos e pelos momentos de descontração.

Às meninas que moram e às que moraram na minha república, pela amizade, carinho, consideração e compreensão, pelos bons momentos, conversas e risadas. Obrigada, meninas!

A todos os professores que durante minha vida acadêmica contribuíram para minha formação e crescimento profissional.

E aos demais familiares, amigos e todas as pessoas que sempre estiveram presentes em minha vida, que direta ou indiretamente, ajudaram-me no cumprimento de mais esta etapa.

MEU MUITO OBRIGADA!

Janaína

BIOGRAFIA

Janaína Teles de Faria, filha de Antônio Ângelo de Faria e Janua Coeli Terezinha Teles de Faria, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 29 do mês de janeiro de 1986.

Em março de 2004 ingressou no curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 2009. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais nos anos de 2007 e 2008, sob orientação do Professor Luis Antonio Minim, do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Em março de 2009 ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Professor Luis Antonio Minim. Em fevereiro de 2011 concluiu, com êxito, o mestrado.

Em março de 2011 ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de doutorado, também sob orientação do Professor Luis Antonio Minim. Em fevereiro de 2015 submeteu-se à defesa de tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1. EMULSÕES	4
2. β -LACTOGLOBULINA	10
3. BIOSSURFACTANTES	13
3.1. SAPONINA.....	15
4. PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE DE MISTURAS DE SAPONINA E PROTEÍNAS	18
5. CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES.....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
Capítulo 2 – PROPRIEDADES EMULSIFICANTES E INTERFACIAIS DA MISTURA DE SAPONINA DE <i>QUILLAJA</i> E β-LACTOGLOBULINA.....	34
RESUMO.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. MATERIAL.....	37
2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES MISTAS DE QBS E B-LG	37
2.3. PROPRIEDADES DINÂMICAS INTERFACIAIS.....	38
2.4. PREPARO DAS EMULSÕES.....	38
2.5. PROPRIEDADES DAS EMULSÕES.....	39
2.5.1. Estabilidade das emulsões à separação de fases.....	39
2.5.2. Caracterização do tamanho médio das gotas	39
2.5.3. Potencial ζ	40
2.5.4. Medidas reológicas	41
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1. Efeito do número de ciclos de homogeneização	42

Carga superficial.....	43
Diâmetro médio e distribuição de tamanho de gotas.....	44
Reologia.....	47
Estabilidade física.....	52
3.2. Efeito do pH da fase aquosa.....	54
Propriedades das emulsões após homogeneização.....	54
Estabilidade física.....	56
3.3. Efeito da concentração de NaCl da fase aquosa.....	57
Propriedades das emulsões após homogeneização.....	58
Estabilidade física.....	59
3.4. Tensão interfacial das misturas.....	61
4. CONCLUSÃO.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTE E ESTABILIZANTE DA MISTURA DE SAPONINA DE <i>QUILLAJA</i> E β-lactoglobulina ÀS DE SEUS COMPONENTES PUROS... 71	
RESUMO.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1. MATERIAL.....	74
2.3. PREPARO DAS EMULSÕES.....	75
2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES.....	76
2.4.1. Estabilidade das emulsões à separação de fases.....	76
2.4.2. Caracterização do tamanho médio de gota ou partícula.....	76
2.4.3. Potencial ζ	77
2.4.4. Medidas reológicas.....	78
2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES E MISTURAS DE QBS E β -LG UTILIZADAS COMO AGENTES EMULSIFICANTES.....	80
3.2. PROPRIEDADES DAS EMULSÕES ESTABILIZADAS PELAS MISTURAS DE QBS E β -LG.....	83
Carga superficial.....	83

Diâmetro médio e distribuição do tamanho de gotas.....	86
Reologia.....	90
3.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES ESTABILIZADAS POR QBS E β -LG	98
4. CONCLUSÃO	105
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CONCLUSÃO GERAL	113

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Mecanismos de desestabilização de emulsão. Fonte: adaptada de Holmberg *et al.* (2002).....5
- Figura 2.** Representação esquemática dos mecanismos de flocculação por depleção (A) e por pontagem (B). Na zona de depleção (A) a concentração do polímero é reduzida ou mesmo zero (V_0). Fonte: adaptada de Corredig (2009) e Bouyer *et al.* (2012).....7
- Figura 3.** Representação esquemática da estrutura terciária de β -Lg. Fonte: Brownlow *et al.* (1997).....12
- Figura 4.** Estrutura da saponina de *Quillaja*, principal componente tensoativo presente no extrato da casca de *Quillaja saponaria*. Fonte: adaptada de Yang *et al.* (2013).....16

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Espectro mecânico para emulsões estabilizadas por QBS e β -lg em pH 7 (A) e 9 (B) obtidas por 4 (●), 6 (▼) e 8 (■) ciclos de homogeneização. Módulo elástico (G') em símbolos fechados, módulo viscoso (G'') em símbolos abertos.....50
- Figura 2.** Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg a 10.000 psi após 7 dias de armazenamento a 25 °C. Número de ciclos de homogeneização: 4 (A), 6 (B) e 8 (C).....52
- Figura 3.** Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg em pH 7 (A), 8 (B) e 9 (C) após 7 dias de armazenamento a 25 °C. Condição de homogeneização: 4 ciclos a 10.000 psi.....56
- Figura 4.** Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg em pH 7 na presença de 0 (A), 100 (B) e 200 (B) mmol L⁻¹ de NaCl. Condição de homogeneização: 4 ciclos a 10.000 psi.....60

Figura 5. Tensão interfacial (γ , ●) de misturas de QBS e β -lg em diferentes pH e concentrações de NaCl: pH 7 e 0 mmol L⁻¹ de NaCl (A), pH 8 e 0 mmol L⁻¹ de NaCl (B), pH 9 e 0 mmol L⁻¹ de NaCl (C), pH 7 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl (D), e pH 7 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl (E). A linha contínua em A, B e C representa a Equação 1 ajustada aos dados.....62

CAPÍTULO 3

Figura 1. Variação dos módulos elásticos (G') e viscosos (G'') em função da frequência de oscilação (ω) das emulsões estabilizadas pelas misturas QBS: β -LG de razão 1:0 (A), 1:1 (B) e 0:1 (C) sob as seguintes condições: pH 7 e 0 mmol L⁻¹ NaCl (●), pH 8 e 0 mmol L⁻¹ NaCl (○), pH 9 e 0 mmol L⁻¹ NaCl (▼), pH 7 e 100 mmol L⁻¹ NaCl (Δ), pH 8 e 100 mmol L⁻¹ NaCl (■), pH 9 e 100 mmol L⁻¹ NaCl (□), pH 7 e 200 mmol L⁻¹ NaCl (◆), pH 8 e 200 mmol L⁻¹ NaCl (◇), e pH 9 e 200 mmol L⁻¹ NaCl (▲).....96

Figura 2. Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg nas razões molares 1:0, 1:1 e 0:1 em diferentes condições de pH e concentração de NaCl 7 dias de armazenamento a 25 °C.....99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Potencial ζ (mV) das emulsões estabilizadas por QBS e β -lg em pH 7 e 9 após diferentes ciclos de homogeneização a 10.000 psi.....43
- Tabela 2.** Valores de diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas por QBS e β -lg obtidas por diferentes ciclos de homogeneização em pH 7 e 9.....45
- Tabela 3.** Parâmetros reológicos obtidos do ajuste do modelo de Herschel Bulkley e viscosidade aparente a 100 s⁻¹ (η_{100}) para emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg.....47
- Tabela 4.** Potencial ζ e diâmetro médio de gota de emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg obtidas por diferentes ciclos de homogeneização a 10.000 psi após 7 dias de armazenamento a 25 °C.....53
- Tabela 5.** Valores de potencial ζ , diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas QBS e β -lg em diferentes pH após homogeneização.....55
- Tabela 6.** Valores de potencial ζ , diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas QBS e β -lg em diferentes pH após 7 dias de armazenamento a 25 °C.....57
- Tabela 7.** Valores de potencial ζ , diâmetro médio da gota e índice de polidispersidade das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg com diferentes concentrações de NaCl após homogeneização.....58
- Tabela 8.** Valores de potencial ζ , diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas QBS e β -lg diferentes concentrações de NaCl após 7 dias de armazenamento a 25 °C.....60
- Tabela 9.** Tensão interfacial de equilíbrio (γ_{eq}) óleo-água para as misturas de QBS e β -lg em diferentes pH determinada pelo ajuste de uma equação exponencial.....64

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Fatores e níveis (reais e codificados) utilizados no delineamento fatorial completo.....	79
Tabela 2. Valores de potencial ζ (mV) das partículas das misturas de QBS e β -lg sob diferentes razões molares (concentração total fixa de 1,2 mol L ⁻¹) em diferentes pH e concentração de NaCl.....	81
Tabela 3. Valores de potencial ζ (mV) das emulsões estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg em diferentes pH e concentração de NaCl determinados após homogeneização.....	84
Tabela 4. Diâmetro médio de gota (z-médio) e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg em diferentes pH e concentrações de NaCl após homogeneização.....	87
Tabela 5. Viscosidade a 100 s ⁻¹ (η_{100}) e coeficientes do modelo de Herschel Bulkley (τ_0 – tensão inicial, k – índice de consistência e n – índice de comportamento) ajustado aos dados da curva de escoamento das emulsões estabilizadas por QBS e β -lg sob diferentes pH e concentração de NaCl determinados após homogeneização.....	91
Tabela 6. Diâmetro médio de gota (z-médio), índice de polidispersidade (PDI) e potencial ζ das emulsões estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg em diferentes pH e concentrações de NaCl após 7 dias de armazenamento a 25 °C.....	101

RESUMO

FARIA, Janaína Teles de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Propriedades emulsificantes de saponina de *Quillaja* e β -lactoglobulina: efeitos do pH, da força iônica e das condições de homogeneização.** Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira, Luis Henrique Mendes da Silva e Valéria Paula Rodrigues Minim.

A formação e a estabilização de emulsões são consideravelmente influenciadas pelo tipo de emulsificante empregado, bem como pelas condições da fase contínua que as compõem e pelas condições de homogeneização. Inicialmente efeitos do número de ciclos de homogeneização, pH e concentração de NaCl sobre a formação e estabilidade de emulsões óleo em água (O/A) contendo mistura de saponina de *Quillaja* (QBS) e β -lactoglobulina (β -lg) foram estudados separadamente. Posteriormente, as propriedades emulsificantes e estabilizantes da mistura de QBS e β -lg sob diferentes valores de pH e concentração de NaCl foram avaliadas e comparadas às de seus componentes puros. As emulsões foram preparadas em duas etapas: pré-homogeneização sob agitação (7.500 rpm/3 min) e homogeneização à alta pressão (10.000 psi/4-8 ciclos), e então caracterizadas em termos de suas propriedades: tamanho e distribuição de tamanho de gota, carga superficial de gota, comportamento reológico, e estabilidade física após 7 dias de armazenamento, a 25 °C. Verificou-se no presente estudo que a utilização de 4 ciclos de homogeneização mostrou-se adequada para a obtenção de gotas pequenas estabilizadas pela mistura de QBS e β -lg. Todas as emulsões estabilizadas pela mistura e por seus componentes puros apresentaram carga superficial líquida negativa em todas as condições de pH (7, 8 e 9) e concentração de NaCl (0, 100 e 200 mmol L⁻¹) avaliadas. As distribuições de tamanho de gota foram multimodais e as emulsões foram polidispersas, embora seus diâmetros médios de gota tenham sido relativamente pequenos (< 500 nm). As emulsões apresentaram comportamento ligeiramente pseudoplástico, com presença de pequena tensão inicial e baixa viscosidade aparente. O comportamento viscoelástico foi característico de gel fraco. A influência do pH e da concentração de NaCl sobre as propriedades das emulsões dependeu do emulsificante utilizado para

estabilizá-las. As emulsões apresentaram boa estabilidade frente à separação de fase e, em sua maioria, à agregação após o armazenamento. A mistura de QBS e β -lg apresentou desempenho semelhante ao de seus componentes puros quanto à capacidade de formar emulsões com gotas de diâmetro médio inferior a 500 nm. No entanto, a mistura aparenta ter apresentado melhor capacidade de estabilizar as emulsões quando comparada à QBS e à β -lg separadamente, revelando assim um efeito sinérgico da mistura.

ABSTRACT

FARIA, Janaína Teles de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Emulsifying properties of *Quillaja* saponin and β -lactoglobulin: effects of pH, ionic strength and homogenization conditions.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-advisers: Eduardo Basílio de Oliveira, Luis Henrique Mendes da Silva and Valéria Paula Rodrigues Minim.

The formation and stabilization of emulsions are significantly influenced by the emulsifier type, the conditions of the continuous phase that compose them and the homogenization conditions. Initially the effect of the number of homogenization cycles, pH and NaCl concentration on the formation and stability of O/W emulsions containing *Quillaja* saponin (QBS) and β -lactoglobulin (β -lg) mixture were studied separately. Subsequently, the emulsifying and stabilizing properties of the mixture of QBS and β -lg under different pH and NaCl concentration were evaluated and compared with those of the pure components. The emulsions were prepared in two steps: pre-mixing with stirring (7,500 rpm/3 min) and homogenization at high pressure (10,000 psi/4-8 cycles). Subsequently, they were characterized in terms of droplet size distribution, droplet surface charge, rheological behavior, and physical stability after 7 days of storage at 25 °C. It was found that the use of four cycles of homogenization was adequate for obtaining small droplets stabilized by mixing QBS and β -lg. All emulsions and its pure components showed negative net surface charge at all pH conditions (7, 8 and 9) and NaCl concentration (0, 100 and 200 mmol L⁻¹). The droplet size distributions were multimodal and the emulsions were polydisperse, however their average droplet diameters were relatively small (< 500 nm). The emulsions showed slightly pseudoplastic behavior with the presence of small yield stress and low apparent viscosity. The viscoelastic behavior indicated a weak gel-like behavior. The influence of pH and NaCl concentration on the emulsions properties depended on the emulsifier used to stabilize them. The emulsions showed good stability against phase separation and, in most cases, against the aggregation after storage. The mixture of QBS and β -LG showed similar performance compared with its pure components regard to the ability to form emulsions with droplets of average diameter less than 500 nm. However, the mixture appears to have presented the best ability to stabilize the emulsions

when compared with the QBS and β -lg separately, thus revealing a synergistic effect of the mixture.

INTRODUÇÃO GERAL

Emulsões são de grande aplicação para a indústria de alimentos uma vez que diversos produtos são constituídos inteiramente ou parcialmente por emulsões. As emulsões são compostas por duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma dispersa na outra. No entanto, o contato entre essas fases é termodinamicamente desfavorável, o que faz das emulsões sistemas coloidais termodinamicamente instáveis. Logo, a elevada instabilidade das emulsões acarreta diversos mecanismos de desestabilização, os quais podem resultar na completa separação de suas fases, o que compromete a qualidade dos produtos emulsionados. No entanto, a presença de agentes emulsificantes pode conferir estabilidade cinética às emulsões por um determinado período de tempo, até que essas possam ser utilizadas ou consumidas.

Os emulsificantes são moléculas anfífilas que promovem a formação e estabilização das emulsões por ação interfacial. Dois grandes grupos compõem os emulsificantes: os surfactantes de baixa massa molar e os emulsificantes macromoleculares, como as proteínas. Os surfactantes de baixa massa molar adsorvem rapidamente na interface e são eficientes na redução da tensão interfacial, o que facilita a deformação e ruptura das gotas durante o processo de homogeneização. As proteínas, embora sejam menos efetivas na redução da tensão interfacial do que os surfactantes, estabilizam emulsões a longo prazo devido à formação de interfaces viscoelásticas e por promoverem repulsão estérica e/ou eletrostática entre as gotas revestidas por elas. Assim, proteínas e surfactantes complementam um ao outro, conferindo estabilidade a curto e longo prazo às emulsões.

Desta forma, o desenvolvimento de combinações de emulsificantes mais sofisticadas empregando misturas complexas de surfactantes e proteínas para melhorar a estabilidade das emulsões tem se tornado mais significativo e importante. Nos últimos anos muitos estudos têm se voltado para o emprego de surfactantes sintéticos, em especial os derivados de petróleo. No entanto, o crescente interesse e demanda dos consumidores e, conseqüentemente, da indústria de alimentos por produtos mais saudáveis e

ambientalmente corretos têm impulsionado a utilização de biossurfactantes como alternativas aos surfactantes sintéticos.

Um biossurfactante que tem ganhado destaque em pesquisas recentes são as saponinas, as quais são glicosídeos de elevada massa molar, constituídos por uma aglicona com esqueleto de triterpeno ou esteroide unida por meio de ligações glicosídicas a uma ou mais cadeias de açúcar. Dentre as saponinas, as mais exploradas são as saponinas presentes no extrato da casca de uma árvore nativa no Peru e Chile. Essas saponinas recebem o nome de “saponina da casca de *Quillaja*” (QBS). Produtos de QBS são aprovados para consumo humano como aditivo alimentar de acordo com termos e leis de regulamentação de alimentos em diversos países, sendo utilizados principalmente como agentes emulsificantes e formadores de espuma. Para essas aplicações, QBS é misturada a outros surfactantes ou polímeros, como as proteínas.

Desta forma, alguns estudos têm se dedicado à avaliação das propriedades interfaciais, emulsificantes e de formação de espumas de misturas de saponina de *Quillaja* com diferentes proteínas, como lisozima, caseína e β -lactoglobulina. Contudo, apesar desses estudos e da já utilização de saponinas em diversas indústrias e produtos comerciais, até o presente momento pouco se conhece sobre as capacidades emulsificante e estabilizante de misturas de saponina de *Quillaja* e β -lactoglobulina em diferentes condições de pH e força iônica.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da mistura de saponina de *Quillaja* e β -lactoglobulina na formação e estabilização de emulsões óleo em água em diferentes condições de pH e concentração de NaCl.

Este trabalho é apresentado em três capítulos. O Capítulo 1 consiste em uma revisão bibliográfica geral sobre emulsões e sua caracterização, as propriedades gerais dos emulsificantes utilizados (saponina de *Quillaja* e β -lactoglobulina) e as propriedades emulsificantes de misturas de proteína e surfactante. Na sequência são abordados, também na forma de artigos, os seguintes temas:

Capítulo 2: Propriedades emulsificantes e interfaciais da mistura de saponina de *Quillaja* e β -lactoglobulina;

Capitulo 3: Avaliação e comparação das propriedades emulsificante e estabilizante da mistura de saponina de *Quillaja* e β -lactoglobulina às de seus componentes puros.

Capítulo 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1. EMULSÕES

Emulsão é um sistema coloidal termodinamicamente instável constituído por duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma dispersa na outra. A maior parte das emulsões contém água como uma fase e um líquido orgânico como a outra fase. Normalmente a fase orgânica é referida como óleo, embora não necessariamente seja um óleo propriamente dito. Emulsões não aquosas também existem, bem como emulsões contendo duas fases aquosas (normalmente duas soluções de polímeros diferentes, como dextrana e polietileno glicol) (Holmberg *et al.*, 2002).

A substância ou solução que compõe as gotas é a fase dispersa, enquanto aquela que compõe o meio (matriz) é a fase contínua. As emulsões podem ser convenientemente classificadas de acordo com a distribuição relativa das fases aquosa e oleosa. Assim, um sistema o qual consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado de emulsão óleo em água (O/A), como por exemplo, leite, maionese, sopas e molhos. Já um sistema com gotas de água dispersas em óleo é chamado de emulsão água em óleo (A/O), como margarina e manteiga (McClements, 2004).

O processo de formação de emulsões consiste na mistura dos dois líquidos imiscíveis por meio da homogeneização, a qual pode ser dividida em duas etapas. Uma etapa inicial (homogeneização primária) na qual ocorre a produção da emulsão diretamente a partir das duas fases, formando assim uma pré-emulsão, e uma etapa posterior de homogeneização (homogeneização secundária) que consiste na redução dos tamanhos de gotas já existentes na pré-emulsão. A homogeneização secundária é muito importante para definir algumas propriedades físico-químicas e sensoriais, tais como textura, sabor, aparência e estabilidade (McClements, 2004).

Com o tempo, as emulsões tendem a retornar para o estado termodinâmico mais estável, ocasionando assim uma separação total de

fases (Myers, 1999). Particularmente para emulsões O/A existem diversos mecanismos de desestabilização, sendo os principais a cremação gravitacional, sedimentação, floculação e coalescência das gotas (Dickinson, 1995) (Figura 1). Esses mecanismos estão normalmente correlacionados, podendo ocorrer consecutivamente ou simultaneamente (Tadros, 2013).

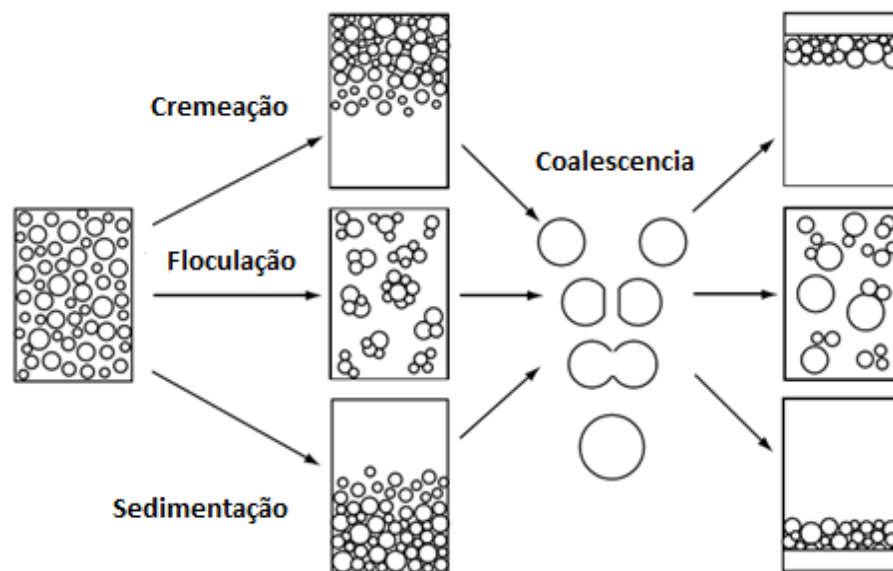


Figura 1. Mecanismos de desestabilização de emulsão. Fonte: adaptada de Holmberg *et al.* (2002).

A cremação e a sedimentação são formas de separação gravitacional que ocorrem como resultado da diferença de densidade entre as fases contínua e dispersa. A cremação descreve o movimento ascendente das gotas, devido à sua menor densidade em relação à fase contínua, enquanto a sedimentação descreve o movimento descendente das gotas, devido à maior densidade da fase dispersa em relação à fase contínua. A cremação é mais comum do que a sedimentação devido a grande parte das emulsões ser do tipo O/A e ao fato da fase orgânica/oleosa geralmente apresentar menor densidade que a fase aquosa (Holmberg *et al.*, 2002; McClements, 2004). A cremação/sedimentação ocorre sem a perda da identidade individual das gotas, ocorrendo com o tempo em quase todas as emulsões nas quais há uma diferença na densidade das fases que as compõem. A velocidade de cremação/sedimentação depende das características físicas

do sistema, como as densidades das fases, o diâmetro da gota e, principalmente, a viscosidade da fase contínua (Myers, 1999; McClements, 2004).

A floculação e a coalescência são fenômenos de agregação das gotas. Na floculação as gotas encontram-se em uma situação energeticamente estável na qual estão próximas uma das outras, mas mantêm sua integridade individual (Holmberg *et al.*, 2002; McClements, 2004). Esse mecanismo ocorre quando as forças atrativas de van der Waals excedem as forças repulsivas do sistema (Tadros, 2004). A taxa com que a floculação se processa depende da frequência de colisões (total de colisões por tempo por volume) e da eficiência de colisão (fração de colisões que leva à agregação, isso é, probabilidade da colisão resultar em floculação) (McClements, 2004).

A floculação pode acontecer por meio de dois mecanismos distintos, conhecidos como floculação por pontagem e floculação por depleção (Figura 2). A floculação por pontagem é promovida pela adsorção simultânea de biopolímeros às superfícies de gotas adjacentes, formando assim pontes entre as gotas (McClements, 2004; Bouyer *et al.*, 2012). Esse tipo de floculação tende a ocorrer em sistemas nos quais biopolímeros são utilizados como emulsificantes e estão presentes em quantidade insuficiente para recobrir completamente a interface das gotas durante a homogeneização. Outra possibilidade para sua ocorrência é a presença na fase contínua de polímeros de cargas opostas às gotas (McClements, 2004). Neste caso a floculação tem origem eletrostática, sendo, portanto, fortemente dependente do pH, da força iônica e das características das proteínas adsorvidas e dos biopolímeros não adsorvidos (McClements, 2004). De acordo com Schramm (2006), a presença de polímeros constituídos por cadeias lineares e de alta massa molar pode promover a floculação por pontagem e a formação de flocos porosos. Um exemplo comum de floculação por pontagem é a aglomeração dos glóbulos de gordura durante a homogeneização do leite, na qual micelas de caseína são compartilhadas por glóbulos de gordura adjacentes (McClements, 2004; Damodaran *et al.*, 2010).

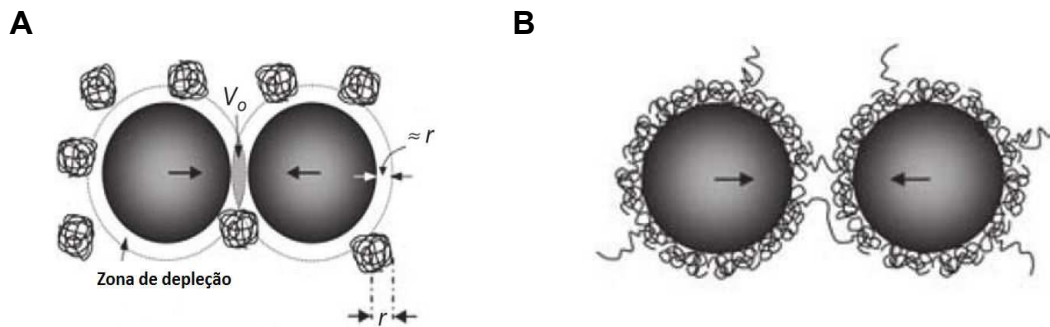


Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos de flocação por depleção (A) e por pontagem (B). Na zona de depleção (A) a concentração do polímero é reduzida ou mesmo zero (V_0). Fonte: adaptada de Corredig (2009) e Bouyer *et al.* (2012).

A flocação por depleção ocorre quando a expulsão (depleção) de partículas coloidais (polímeros ou micelas de surfactantes) não adsorvidas do espaço entre as gotas cria um gradiente de concentração, e, conseqüentemente, um gradiente de pressão, o qual força as gotas a se aproximarem (McClements, 2004; McClements, 2005). A expulsão do biopolímero está relacionada à entropia conformacional do mesmo, que busca um estado termodinamicamente mais favorável (de menor energia livre, maior entropia) fora do espaço entre as gotas quando este espaço é menor do que o tamanho do biopolímero em seu estado entropicamente mais favorável (Damodaran, 2005). Inicialmente o aumento da concentração de partículas coloidais não adsorvidas aumenta a taxa de flocação devido ao aumento da atração entre as gotas (maior eficiência de colisão). No entanto, a partir de certa concentração a taxa de flocação normalmente diminui, porque a viscosidade da fase contínua aumenta ao ponto de retardar o movimento das gotas, diminuindo a frequência de colisões (McClements, 2004).

O processo de coalescência, por sua vez, diferentemente da flocação, promove a fusão das gotas agregadas formando assim gotas maiores (McClements, 2004; Damodaran, 2005; McClements, 2009). Tal processo ocorre somente quando as gotas encontram-se em estreita proximidade e a fina película que as separa se rompe. Logo, a tendência à coalescência é governada pelas interações entre as gotas, principalmente as forças de curto alcance, e pela estabilidade da camada interfacial à ruptura.

Assim, se a força de repulsão entre as gotas for elevada ou a interface for altamente resistente à ruptura, as gotas não coalescerão. Por outro lado, se a força de atração sobressai e a interface não oferece resistência mecânica, a coalescência ocorrerá (McClements, 2004); e se de forma extensiva, eventualmente pode levar ao *oiling off* (formação de uma camada de óleo livre sobre a emulsão) (Holmberg *et al.*, 2002; McClements, 2004). A coalescência é o principal mecanismo pelo qual a emulsão “move-se” em direção ao seu estado termodinamicamente mais estável, pois envolve a redução da área interfacial entre as fases (McClements, 2004).

Cremação, floculação e sedimentação são fenômenos reversíveis, o que significa que o estado inicial da emulsão pode ser recuperado pela aplicação de elevado cisalhamento (Myers, 1999; Holmberg *et al.*, 2002; McClements, 2004). Já a coalescência é um processo irreversível (Damodaran, 2005; McClements, 2004). A taxa com que ocorre e os mecanismos físicos pelos quais se processa são altamente dependentes da natureza do emulsificante utilizado para estabilizar o sistema. Em geral a susceptibilidade das gotas à coalescência é determinada por diferentes fatores, como a natureza das forças que atuam entre essas e a resistência da película interfacial à ruptura (McClements, 2004).

Outro mecanismo de desestabilização é o amadurecimento de Ostwald. Assim como a coalescência, o amadurecimento de Ostwald é um mecanismo irreversível (McClements, 2004). Neste mecanismo, gotas pequenas, as quais têm uma grande relação de área por volume, perdem matéria e desaparecem, enquanto gotas maiores crescem em tamanho. Esse processo é proporcionado pela difusão de moléculas de uma gota (menor) para outra (maior) através da fase contínua (Holmberg *et al.*, 2002; McClements, 2004). Esse processo ocorre porque a solubilidade do material dentro da gota aumenta com a diminuição do tamanho da mesma (McClements, 2004; Tadros, 2013). O aumento da solubilidade com a redução do diâmetro da gota indica que há uma maior concentração de soluto em torno das gotas menores do que ao redor das gotas maiores. Conseqüentemente, as moléculas de soluto movem-se das gotas menores para as maiores devido a esse gradiente de concentração (McClements, 2004; McClements, 2009). No caso de emulsões do tipo O/A, a velocidade do amadurecimento de

Ostwald depende da solubilidade do óleo na água (Holmberg *et al.*, 2002). Na prática esse mecanismo de desestabilização geralmente não é uma preocupação para emulsões constituídas por óleos com baixa solubilidade em água, como triglicerídeos de cadeias longas, mas é preocupante para emulsões constituídas por óleos essenciais e triglicerídeos de cadeia curta (McClements, 2004).

A desestabilização das emulsões é inevitável, uma vez que estes sistemas estão fora do equilíbrio termodinâmico. No entanto, existe uma distinção entre estabilidade termodinâmica e estabilidade cinética (Dickinson, 1992). A primeira indica se um processo poderá ocorrer ou não, enquanto a segunda informa a taxa na qual o processo ocorrerá. Embora as emulsões sejam termodinamicamente instáveis, é possível controlar sua desestabilização cinética pelo uso de emulsificantes e assim produzir emulsões com maior vida útil, uma vez que a estabilidade é um dos fatores determinantes da vida útil de produtos emulsionados (McClements, 2004). Os emulsificantes são moléculas anfifílicas que promovem a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial. Por serem constituídas por um domínio hidrofóbico e outro hidrofílico, suas moléculas adsorvem rapidamente na interface óleo-água durante a homogeneização, reduzindo a tensão interfacial e prevenindo a agregação das gotas (floculação e/ou coalescência) (McClements, 2004). Assim, tem-se a formação de gotas de tamanhos menores e, conseqüentemente, a área interfacial total é aumentada (Friberg *et al.*, 2003).

Os emulsificantes podem ser divididos em dois grandes grupos: os emulsificantes de baixa massa molar (monoglicerídeos, polissorbatos, lecitina, entre outros) e os de alta massa molar, como as proteínas (principalmente as do leite e do ovo), que possuem forte tendência à adsorção na interface óleo-água. Apesar das proteínas serem menos efetivas na diminuição da tensão interfacial do que os surfactantes, elas podem produzir emulsões cineticamente estáveis (Bouyer *et al.*, 2011) ao promoverem repulsão eletrostática e/ou estérica entre as gotas dispersas quando adsorvidas às suas interfaces, ao modificarem a viscosidade da fase contínua quando não adsorvidas, e ao formarem interfaces viscoelásticas quando adsorvidas (Dickinson, 1999; McClements, 2004; Bouyer *et al.*, 2012; Lam e Nickerson,

2013). Os emulsificantes de baixa massa molar são bastante utilizados na elaboração de emulsões devido à sua rápida adsorção na interface e eficiente redução da tensão interfacial, o que facilita a deformação e a ruptura das gotas durante a homogeneização (McClements, 2004). No entanto, alguns desses emulsificantes podem causar malefícios à saúde dos consumidores, podendo ser utilizados apenas em níveis limitados ou até mesmo terem seu uso restringido em alimentos. Além disso, há um crescente interesse e demanda por parte dos consumidores e, conseqüentemente, das indústrias de alimentos por produtos mais saudáveis e ambientalmente corretos, o que tem voltado o interesse para a utilização de alternativas de origem biológica (Kitamoto *et al.*, 2002; Wojciechowski *et al.*, 2011). Diante deste contexto, proteínas e biossurfactantes surgem como alternativas promissoras para a estabilização cinética de emulsões.

A seguir serão descritas brevemente as características da β -lactoglobulina e da saponina de *Quillaja*, uma proteína e um biossurfactante que têm sido utilizados com sucesso na estabilização de emulsões O/A.

2. β -LACTOGLOBULINA

A β -lactoglobulina (β -lg) é encontrada naturalmente no soro de leite e pertence à família das Lipocalinas (proteínas com função de transporte), cuja principal característica é sua habilidade de se ligar a pequenas moléculas lipofílicas em sua cavidade central hidrofóbica para minimizar o contato dessas moléculas com o solvente polar (Flower, 1996). Sendo assim, a β -lg é conhecida por sua capacidade de se ligar a várias moléculas hidrofóbicas, incluindo retinol, ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis e colesterol (Flower *et al.*, 2000; Sawyer e Kontopidis, 2000; Kontopidis *et al.*, 2002). No entanto, em sua superfície existem cadeias laterais de anomiácidos polares que possibilitam a interação da proteína com macromoléculas hidrofílicas (Flower, 1996), o que faz com que a β -lg possa se ligar tanto a moléculas hidrofóbicas quanto a moléculas hidrofílicas.

Foi sugerido que uma das funções da β -Ig é se ligar a moléculas não polares para protegê-las e transportá-las através do ambiente ácido do estômago para o ambiente básico do intestino (Pérez e Calvo, 1995).

A β -Ig é a principal proteína do soro de leite, representando cerca de 45 a 57 % em massa do total das proteínas do soro e até 12 % em massa das proteínas presentes no leite. Por ser a maior fração proteica do soro, suas características tendem a dominar as propriedades dos produtos elaborados com soro de leite. A β -Ig tem sido estudada extensivamente e é muito bem caracterizada. Essa proteína possui massa molar de $18.283 \text{ g mol}^{-1}$ e ponto isoelétrico em $\text{pH} \approx 5,2$ (Cheftel *et al.*, 1985). Sua estrutura primária consiste de 162 resíduos de aminoácidos, principalmente os sulfurados, o que confere a ela um elevado valor biológico devido ao alto teor de aminoácidos essenciais. Sua conformação globular é consequência da distribuição uniforme de resíduos não polar, polar e iônico, o que torna possível o arranjo dos resíduos hidrofóbicos no interior da proteína (Cheftel *et al.*, 1985). Sua estrutura secundária é composta por 15 % de α -hélice, 50 % de folhas β antiparalelas, 20 % de estruturas em curvas (*reverse turns*) e 15 % de estruturas casualizadas (Figura 3) (Vetri e Militello, 2005). Essa estrutura ocorre na forma de 8 folhas β , as quais se arranjam formando um barril capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior (Wong *et al.*, 1996; Brownlow *et al.*, 1997). As ligações dissulfídicas, junto com as ligações de hidrogênio, estabilizam a estrutura terciária da proteína (Bryant e McClements, 1998) e, em condições experimentais apropriadas, dirigem seu processo de agregação (Vetri e Militello, 2005).

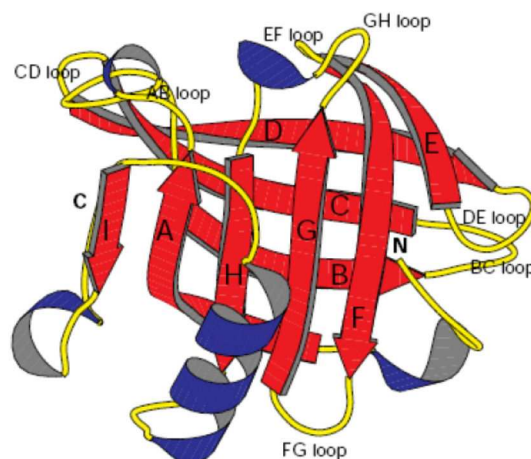


Figura 3. Representação esquemática da estrutura terciária de β -Lg. Fonte: Brownlow *et al.* (1997).

A β -lg contém duas ligações dissulfídicas e um grupo tiol livre muito reativo que possibilita um intercâmbio entre as ligações dissulfídicas durante mudanças conformacionais associadas ao tratamento térmico e a alterações de pH (Bottomley *et al.*, 1990). Em seu complexo globular proteico, a parte hidrofóbica da cadeia de aminoácidos fica voltada para o interior, enquanto a parte polar fica exposta para o exterior. Quando aquecidas, tem-se a abertura parcial do complexo globular, expondo os aminoácidos hidrofóbicos localizados no interior e levando, então, à agregação parcial ou completa da proteína desnaturada (Eleya e Turgeon, 2000). Segundo De Wit e colaboradores (2009), o desdobramento parcial da β -lg em “glóbulo fundido” (*molten globule*) e modificações irreversíveis dos monômeros, induzidas por exposição dos grupos tióis, são observadas entre 60 e 70 °C. Entre 65 e 75 °C há a formação de pequenos oligômeros, os quais são ampliados por associações não covalentes (hidrofóbicas e induzidas pelo sal), as quais ocorrem predominantemente entre 75 e 85 °C (De Wit *et al.*, 2009).

A β -lg apresenta diversas propriedades funcionais tecnológicas, como elevada solubilidade, propriedades emulsificantes e de formação de espuma, as quais são de grande interesse para a indústria de alimentos (De Wit *et al.*, 2009). Por causa dessas propriedades, a β -lg é foco de muitos estudos, sendo uma das proteínas que mais vem sendo pesquisada por sua capacidade emulsificante (Bejrappa *et al.*, 2011). Segundo Elias e colaboradores (2006), a β -lg apresenta atividade emulsificante satisfatória na faixa de pH alcalino,

com perda desta habilidade na faixa de pH ácido, reflexo da reduzida adsorção da proteína na interface devido à perda de flexibilidade da molécula, resultado de interações intermoleculares e enovelamento, causando elevada agregação da proteína. Diversos estudos encontrados na literatura têm demonstrado com sucesso a utilização de β -lg na formação e estabilização de emulsões O/A (Tcholakova *et al.*, 2006; Bouyer *et al.*, 2011; Schmelz *et al.*, 2011; Bouyer *et al.*, 2013).

3. BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes foram descobertos no início da década de 60 como compostos extracelulares anfifílicos em pesquisas de fermentações de hidrocarbonetos (Kitamoto *et al.*, 2002; Matsuura, 2004).

Inicialmente, os biossurfactantes atraíram atenção como agentes de dissolução de hidrocarbonetos, mas o interesse por essas biomoléculas tem crescido consideravelmente nas últimas cinco décadas como alternativa aos surfactantes sintéticos, especialmente nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de petróleo (Nitschke e Costa, 2007; Kralova e Sjöblom, 2009), uma vez que grande parte dos surfactantes sintéticos é biorecalcitrante (não degradados por sistemas biológicos convencionais) (Tan, 2009). Além da alta biodegradabilidade e segurança, propriedades únicas como atividades biológicas (ação antimicrobiana e antitumoral) colaboram para a maior atenção dada aos biossurfactantes (Kitamoto *et al.*, 2002).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química e sua origem (Matsuura, 2004; Nitschke e COSTA, 2007; Kralova e Sjöblom, 2009) e estão presentes nos diferentes reinos, sendo que no vegetal desempenham um papel importante em diversas funções vitais (Wojciechowski *et al.*, 2011). Esses surfactantes também são intensivamente produzidos por micro-organismos durante seu metabolismo, sendo as bactérias as principais produtoras (Kitamoto *et al.*, 2002; Nitschke, 2004). Quanto à composição, a maioria dos biossurfactantes é neutro ou aniônico. Sua porção apolar é frequentemente uma cadeia de hidrocarboneto que pode

ser saturada, insaturada, hidroxilada ou ramificada, enquanto a porção polar pode ser um carboidrato, aminoácido, fosfato ou peptídeos cíclicos, podendo ser iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica (Nitschke e Pastore, 2002; Kralova e Sjöblom, 2009). Alguns pesquisadores sugerem que os biossurfactantes sejam divididos em dois grupos: moléculas de pequena massa molar, as quais eficientemente reduzem as tensões interfacial e superficial, e moléculas de elevada massa molar, as quais são mais efetivas como agentes estabilizantes de emulsões. As principais classes de surfactantes de pequena massa molar incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e fosfolipídeos, enquanto surfactantes de massa molar elevada incluem surfactantes particulados, os quais compreendem células e vesículas extracelulares, e surfactantes poliméricos, constituídos por polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (Ron e Rosenberg, 2001; Matsuura, 2004; Nitschke e Costa, 2007; Kralova e Sjöblom, 2009).

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, os biossurfactantes compartilham algumas características comuns quanto à:

- ❖ tolerância a grandes faixas de temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade, podendo assim ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas (Nitschke e Pastore, 2002). Biossurfactantes toleram concentrações de até 10 % de NaCl, enquanto surfactantes convencionais são inativados a 2-3 % de NaCl (Bognolo, 1999).
- ❖ baixa toxicidade: sua baixa toxicidade possibilita seu uso em cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentos (Nitschke e Pastore, 2002).

Além dessas características, os biossurfactantes apresentam ainda as vantagens de poderem ser obtidos a partir de matérias-primas naturais de fontes renováveis, e possuírem grande diversidade química (Carli, 2006). A composição, bem como as propriedades físicas dos biossurfactantes, pode ser modificada por meio de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, de modo a permitir o desenvolvimento de produtos que atendam a necessidades específicas (Nitschke, 2004; Okoliegbe e Agarry, 2012).

3.1. SAPONINA

Saponinas são um grupo grande e estruturalmente diversificado de produtos naturais bioativos encontrados em cerca de 500 variedades de plantas e em algumas espécies de animais marinhos, como estrela do mar e pepino marinho (Osbourn *et al.*, 2011; Wojciechowski *et al.*, 2014). Seu nome deriva do latim *sapo*, que quer dizer sabão, devido a suas propriedades surfactantes e por formarem espuma quando agitadas em solução aquosa (Osbourn *et al.*, 2011; Wojciechowski *et al.*, 2011; Wojciechowski *et al.*, 2014).

Saponinas são glicosídeos de elevada massa molar, estruturalmente constituídos por uma aglicona com esqueleto de triterpeno ou esteroide, a qual está unida por meio de ligações glicosídicas a uma ou mais cadeias de açúcar que podem ser lineares ou ramificadas (Figura 4) (Stanimirova *et al.*, 2011; Wojciechowski *et al.*, 2011; Golemanov *et al.*, 2012; Wojciechowski *et al.*, 2014). São moléculas anfifílicas, já que possuem regiões hidrofílica (açúcares) e lipofílica (aglicona).

As saponinas são geralmente classificadas com base (i) no tipo do grupo hidrofóbico (triterpenóide, esteróide ou esteróide alcalóide) e (ii) no número de cadeias de açúcar ligadas ao grupo hidrofóbico. As saponinas mais comuns têm duas cadeias de açúcar (bidesmosídicas), mas algumas têm uma (monodesmosídicas) e, em casos raros, três cadeias de açúcar (tridesmosídicas) (Golemanov *et al.*, 2012).

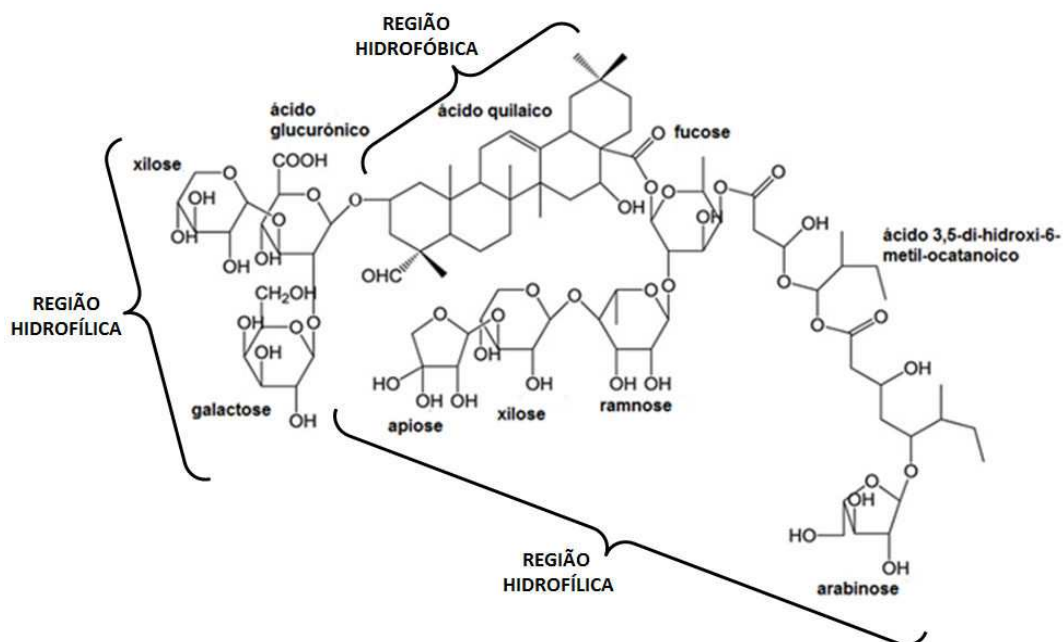


Figura 4. Estrutura da saponina de *Quillaja*, principal componente tensoativo presente no extrato da casca de *Quillaja saponaria*. Fonte: adaptada de Yang *et al.* (2013).

As saponinas apresentam uma ampla gama de atividade biológica, dada sua diversidade estrutural (Osbourn *et al.*, 2011; Stanimirova *et al.*, 2011; Golemanov *et al.*, 2012), o que faz delas alvos de especial interesse para o desenvolvimento de novos compostos com aplicações industrial, agrícola e farmacêutica (Osbourn *et al.*, 2011). Muitas das moléculas de saponinas têm atividade antimicrobiana, anti-herbívoro e/ou atividade citotóxica, e seu papel na natureza está relacionado à defesa contra patógenos, pragas e predadores. As saponinas podem afetar a palatabilidade de culturas de plantas para os animais, incluindo os seres humanos. Elas têm sido relacionadas a sabores indesejáveis em ervilha e a sabor amargo em alfafa e soja (Osbourn *et al.*, 2011). Apesar de serem altamente tóxicas para animais de sangue quente, as saponinas apresentam baixa toxicidade para mamíferos (Wojciechowski *et al.*, 2014).

Dentre as diversas possíveis fontes de saponinas para uso industrial, a árvore *Quillaja saponaria* Molina (nativas no Chile e Peru), cultivadas em regiões de clima quente, principalmente na América do Sul, parece ser a fonte mais promissora e mais explorada para obtenção de saponinas

(Wojciechowski *et al.*, 2014). Uma análise empregando espectrometria de massa identificou pelo menos 60 tipos diferentes de saponinas presentes em sua casca (Nord e Kenne, 1999). As saponinas presentes no extrato da casca de *Q. saponaria Molina* são principalmente do tipo triterpênica com duas cadeias de açúcar contendo glicose, galactose, xilose, raminose, arabinose e ácido glucorônico (Kezwon e Wojciechowski, 2014). Essas saponinas recebem o nome geral “saponina da casca de *Quillaja*” (QBS) (Golemanov *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Yang e McClements, 2013; Wojciechowski *et al.*, 2014). No entanto, deve-se ressaltar que os produtos baseados em QBS disponíveis comercialmente variam muito em função da sua origem e do processo de extração. Logo, suas propriedades de superfície também apresentam grandes variações (Wojciechowski *et al.*, 2014). Apesar dessa variabilidade e da falta de definição clara, QBS é um ingrediente aprovado para uso em alimentos e bebidas como agente saborizante pelo FDA (*Food and Drugs Administration* – regulamento 21 CFR 172.510) e FEMA (*Flavour and Extract Manufacturer’s Association*) com *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe* – FEMA número 2973). Na União Europeia, é um ingrediente aprovado (E999) para uso em bebidas não alcóolicas e cidras, enquanto no Japão, o extrato de *Quillaja* é permitido para consumo humano como agente emulsificante e espumante e para uso em cosméticos (Wojciechowski *et al.*, 2011; Wojciechowski *et al.*, 2014).

Na indústria de alimentos, saponinas são utilizadas como (i) conservantes, (ii) modificadores de sabor (conferem doçura e amargor) (Oakenfull, 1981; Heng *et al.*, 2006), (iii) principais ingredientes de tecnologias para a diminuição do nível de colesterol em alimentos (como gorduras, leite e manteiga) (Micich *et al.*, 1992; Güçlü-üstündağ e Mazza, 2007), (iv) agentes espumante e emulsificante em cervejas e refrigerantes (Oakenfull, 1981; Güçlü-üstündağ e Mazza, 2007), (v) agentes solubilizantes de vitaminas (Jenkins e Atwal, 1994) e minerais (Southon *et al.*, 1988) em aditivos alimentares. Na indústria de cosméticos, saponinas têm sido utilizadas como estabilizantes de emulsões, reforçadores de espuma em xampus e condicionadores, e como tensoativos em produtos de antienvhecimento (Olmstead, 2002; Yoo *et al.*, 2003). Na área médica, têm sido empregadas

como adjuvantes em vacinas (Bomford *et al.*, 1992) e como agentes antitumoral e antimicrobiano (Güçlü-üstündağ e Mazza, 2007).

Extratos de *Quillaja* atualmente encontram aplicações em escala comercial principalmente como agentes emulsificantes e formadores de espuma na indústria de alimentos e de cosméticos. Para essas aplicações, formulações de QBS são misturadas a outros surfactantes, sintéticos ou naturais, e polímeros. No caso de aplicações ligadas à alimentação, essas misturas muitas vezes incluem proteínas do ovo e do leite, como a lisozima, a β -caseína e a β -lactoglobulina (Kezwon e Wojciechowski, 2014). Desta forma, diversos trabalhos recentes têm se dedicado às misturas de QBS com essas proteínas (Wojciechowski *et al.*, 2011; Piotrowski *et al.*, 2012; Kezwon e Wojciechowski, 2014; Wojciechowski *et al.*, 2014).

4. PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE DE MISTURAS DE SAPONINA E PROTEÍNAS

Nos últimos anos, alguns trabalhos a respeito das propriedades de superfície de misturas de saponinas da casca de *Quillaja* com algumas proteínas tem sido reportados na literatura.

Wojciechowski e colaboradores (2011) avaliaram a adsorção de saponina da casca de *Quillaja* e de suas misturas com lisozima da clara de ovo em interface ar-água. Os autores verificaram que em concentrações maiores de saponina (razão saponina/lisozima maior do que 10), a interface foi dominada pelo surfactante, o qual deslocou a lisozima e o complexo lisozima-saponina da superfície. No entanto, em baixas concentrações de saponina (razão saponina/lisozima menor do que 4), Wojciechowski e colaboradores (2011) observaram um efeito sinérgico na adsorção de saponina devido à formação do complexo saponina-lisozima, o qual aumentou a atividade de superfície. Esse efeito sinérgico na cinética de adsorção da mistura foi também verificado em testes de formação de espuma.

Piotrowski e colaboradores (2012) estudaram as propriedades interfaciais e emulsificantes de misturas de saponina de *Quillaja* e

β -lactoglobulina (β -lg), proteína globular correspondente à principal fração proteica do soro de leite, sob diferentes razões de mistura. Efeito sinérgico, devido à formação do complexo proteína-surfactante, foi observado para a cinética de adsorção do surfactante em interface água-óleo quando a razão de mistura surfactante/proteína foi baixa, sendo o efeito menos pronunciado na formação/estabilidade das emulsões (Piotrowski *et al.*, 2012).

Em um estudo mais recente, Kezwon e Wojciechowski (2014) compararam as propriedades de superfície e o comportamento de agregação de saponinas da casca de *Quillaja* de dois fabricantes, e o efeito das proteínas alimentícias lisozima, β -lactoglobulina e β -caseína sobre a tensão superficial dessas saponinas. Ainda que de mesma origem, as saponinas apresentaram característica significativamente distintas, tanto quando isoladas, como em misturas com as proteínas avaliadas. A tensão superficial de equilíbrio das misturas dependeu, portanto, não somente da proteína, como também da saponina utilizada (Kezwon e Wojciechowski, 2014). Os autores verificaram que, em geral, as misturas de saponina com menor caráter iônico e menor concentração micelar crítica apresentaram efeito sinérgico menos pronunciado.

Outro estudo publicado recentemente por Wojciechowski e colaboradores (2014) avaliou o efeito da β -caseína sobre a atividade de superfície de saponina da casca de *Quillaja* em diferentes interfaces líquido-líquido (ar-água, azeite de oliva-água e tetradecano-água). Esses autores verificaram, por meio de medidas de tensão interfacial, que a atividade de superfície do complexo β -caseína-saponina varia com a estequiometria da mistura. Assim como em estudos com outras proteínas (Wojciechowski *et al.*, 2011; Piotrowski *et al.*, 2012), efeito sinérgico foi observado nas tensões interfaciais das misturas quando a razão saponina/ β -caseína foi baixa (menor do que 1,5) (Wojciechowski *et al.*, 2014). Os autores reportaram também que a qualidade da emulsão e da espuma formadas com misturas nessa proporção parece ter aumentado. Por outro lado, misturas com maior concentração de saponina resultaram na diminuição da atividade de superfície, o que refletiu na redução das capacidades de formação de espuma e de emulsões monodispersas.

Em geral, os estudos sobre as propriedades de superfícies e emulsificantes das misturas de saponinas e proteínas têm sido realizados com concentrações de proteína e óleo muito baixas, as quais não correspondem a situações reais encontradas em alimentos.

5. CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

Nos últimos anos muitas técnicas analíticas, novas e melhoradas, tornaram-se disponíveis para avaliação das propriedades físico-químicas das emulsões (McClements, 2004). Diferentes técnicas têm sido utilizadas para caracterizar tais sistemas, uma vez que nenhuma técnica sozinha fornece uma caracterização completa. Dentre as principais propriedades avaliadas em emulsões, destacam-se o potencial ζ , a distribuição de tamanho de gota e a reologia das emulsões.

As gotas em emulsões alimentícias apresentam carga elétrica devido à adsorção de moléculas ionizadas ou ionizáveis, como proteínas, alguns polissacarídeos, surfactantes iônicos e alguns íons. Sua característica elétrica depende do tipo e concentração das espécies adsorvidas, bem como das propriedades físicas e da composição iônica da fase contínua. Normalmente as propriedades elétricas das gotas são caracterizadas em termos de seu potencial ζ (McClements, 2004).

O potencial ζ corresponde à medida do potencial elétrico no plano de cisalhamento da partícula, o qual é definido como o plano que separa as moléculas carregadas que se movem junto à partícula daquelas que não se movem com essa (Karlsson e Bschade, 2005). O potencial ζ é função do pH e da força iônica do meio. Sua magnitude depende da carga superficial da partícula e da natureza e composição do meio que a circunda (McClements, 2004).

O potencial ζ não pode ser medido diretamente, portanto, utiliza-se algum método indireto a partir do qual esse possa ser calculado. O método mais utilizado para mensurá-lo é pela determinação da mobilidade eletroforética (Lieberman *et al.*, 1988; Roland *et al.*, 2003), que se baseia no princípio de que partículas com carga elétrica líquida suspensas em um

líquido migram sob influência de um campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta tão mais rapidamente quanto maiores forem sua carga elétrica e o campo elétrico aplicado. A partir dessa velocidade determina-se a mobilidade eletroforética, relação entre a velocidade da partícula e o campo elétrico aplicado, a qual é então convertida em potencial ζ a partir da equação de Henry (Equação 1) (Kwaambwa e Rennie, 2012; Malvern Zetasizer, 2014)

$$\zeta = \frac{3\eta v}{2\varepsilon f(\kappa R_H)} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde ε é a constante dielétrica do meio (adimensional), η é a viscosidade do solvente (Pa s^{-1}), $f(\kappa R_H)$ é a função de Henry (adimensional), v é a mobilidade eletroforética ($\text{V Pa}^{-1} \text{s}^{-1}$), κ^{-1} é o comprimento de Debye (medida da espessura da dupla camada iônica em volta da partícula) (nm) e R_H é o raio da partícula (nm). Dois valores são geralmente utilizados como aproximação para determinação da função de Henry: 1,5 ou 1,0 (Kwaambwa e Rennie, 2012). Quando a determinação de ζ é realizada em meio aquoso e com concentração de eletrólito moderada, $f(\kappa R_H)$ é 1,5 e referida como aproximação de Smoluchowski (Kwaambwa e Rennie, 2012; Malvern Zetasizer, 2014). Essa aproximação é utilizada para partículas coloidais “grandes”, cujo raio é muito maior que o comprimento de Debye (isto é, $\kappa R_H > 100$) e a superfície da partícula pode ser assumida como sendo plana em relação à espessura da dupla camada (Pashley e Karaman, 2004).

Nos equipamentos comerciais, a velocidade da partícula é frequentemente determinada automaticamente utilizando-se técnicas sofisticadas de espalhamento de luz (McClements, 2004). As tecnologias atuais utilizam a medida da velocidade de *laser* Doppler. Nesta técnica, feixes de *laser* cruzam-se em uma posição específica da amostra de modo a formar um padrão de interferência constituído por regiões de alta e baixa intensidade de luz. As partículas carregadas movem-se sob aplicação de um campo elétrico através desse padrão de interferência, espalhando luz quando nas regiões brilhantes, mas não nas escuras. Quanto mais rápido a partícula move-se nesse padrão de interferência, maior a frequência de flutuação da intensidade da luz espalhada. Pela medida e análise dessa frequência de

flutuações é possível calcular a velocidade da partícula (McClements, 2004; Malvern, 2007).

A análise do potencial ζ é extremamente importante e útil, pois pode ser utilizada para otimizar formulações e prever a estabilidade de emulsões, uma vez que reflete a carga efetiva sobre a partícula (Karlsson e Bschade, 2005; Malvern, 2007). Sua magnitude pode ser relacionada à estabilidade das emulsões: emulsões com altos valores, positivo ou negativo, de potencial ζ tendem a ser estáveis, enquanto aquelas com baixo potencial ζ tendem a flocular ou coalescer (Karlsson e Bschade, 2005; Kulkarni, 2009), pois a força de repulsão eletrostática não é suficiente para prevenir a aproximação das gotas, possivelmente resultando em baixa estabilidade física. Sugere-se que em sistemas nos quais os valores de potencial ζ são superiores a 30 mV, em módulo, a força repulsiva da dupla camada é maior do que a força atrativa de van der Waals (Lieberman *et al.*, 1988; Roland *et al.*, 2003; Malvern Zetasizer, 2014) e os sistemas são normalmente considerados estáveis (Malvern, 2007; Malvern Zetasizer, 2014). No entanto, essa regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois outros fatores também influenciam a estabilidade das emulsões, de modo que uma emulsão composta por gotas com pequeno potencial ζ pode ser mais estável do que outra de maior potencial ζ .

Por refletir o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado por alterações na interface, suas medidas podem ser úteis ao fornecer informações a respeito da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies carregadas. O potencial ζ pode ser útil também para o entendimento e determinação da natureza das interações entre partículas, auxiliando na determinação do mecanismo de estabilidade e, portanto, no desenvolvimento de produtos emulsionados com maior qualidade.

Outra avaliação importante para a caracterização das emulsões é a determinação do tamanho da gota, pois sua dimensão exerce forte impacto em sua estabilidade ao influenciar os mecanismos de desestabilização (separação gravitacional, floculação, coalescência e amadurecimento de Ostwald). O tamanho da gota interfere também nas propriedades ópticas (como cor e transparência), reológicas (como na viscosidade) e sensoriais

(como na liberação de aroma e na sensação bucal) das emulsões (Farinato e Rowell, 1983; McClements, 2004).

A probabilidade da ocorrência de fenômenos de cremação e coalescência é determinada pelo tamanho das gotas da emulsão, assim como a velocidade de cremação. A estabilidade da emulsão à separação gravitacional aumenta bastante com a redução do tamanho das gotas, já que a velocidade de cremação é proporcional ao raio da gota ao quadrado. No entanto, diminuir o tamanho da gota aumenta sua área superficial, que por sua vez pode levar à floculação se a concentração de emulsificantes não for suficiente (McClements, 2004). O tamanho das gotas depende de vários fatores, como a tensão interfacial, o grau de cisalhamento, a natureza do emulsificante, além das propriedades da fase contínua e dispersa.

Emulsões alimentícias normalmente apresentam uma variedade de tamanho de gotas, sendo definidas como emulsões polidispersas. Conhecer a distribuição de tamanho de gotas de uma emulsão é importante, pois permite a avaliação da eficiência da homogeneização e o monitoramento de mudanças na distribuição de tamanho de gotas ao longo do tempo, o que permite a determinação do mecanismo de desestabilização envolvido. Desta forma, medidas de distribuição de tamanho devem fazer parte das operações de controle de qualidade de produtos emulsionados (Sjoblom, 2010).

Logo, é extremamente importante medir e especificar de forma confiável e precisa o tamanho das gotas presentes na emulsão (Farinato e Rowell, 1983; McClements, 2004). Diversas técnicas podem ser aplicadas para a determinação do tamanho de partícula. Uma delas é o espalhamento dinâmico de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons (McClements, 2004). Essa técnica baseia-se na medida do coeficiente de difusão translacional das gotas determinado pela análise da interação entre o feixe de *laser* e a emulsão (Horne, 1995; Karlsson e Bschrade, 2005; Brar e Verma, 2011). A natureza do padrão de espalhamento de luz resultante dessa interação depende da posição relativa das partículas (Horne, 1995). Como as partículas encontram-se em constante movimento browniano, a luz espalhada por essas sofre interferências de fases destrutiva e construtiva, causando assim flutuação da intensidade da luz espalhada (Karlsson e Bschrade, 2005). A frequência dessa

flutuação depende da velocidade com a qual a partícula se move, e, conseqüentemente, do seu tamanho (Horne, 1995). Quanto menor a partícula, maior a frequência de flutuação da intensidade da luz espalhada, pois as partículas movem-se mais rapidamente. Logo, existe uma relação entre a frequência de flutuação da intensidade da luz espalhada e o coeficiente de difusão das partículas (Cardoso, 2001).

As flutuações da intensidade da luz espalhada são medidas pela função de autocorrelação, que se relaciona ao coeficiente de difusão translacional. A partir do coeficiente de difusão, o raio hidrodinâmico da partícula é determinado segundo a equação de Stokes-Einstein (Equação 2) (Karlsson e Bscharde, 2005; McClements, 2004; Brar e Verma, 2011):

$$r = \frac{\kappa T}{6\pi\eta D} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde r é o raio da partícula esférica (m), κ é a constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K), η é a viscosidade do meio (Pa s) e D é o coeficiente de difusão ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$).

O conhecimento das propriedades reológicas das emulsões também é de suma importância para a caracterização das emulsões. Considerações práticas surgem do fato de que a vida útil de produtos emulsionados depende de suas características reológicas. Além disso, dados reológicos são úteis em (i) cálculos de processos envolvendo tubulações, agitadores, bombas, trocadores de calor e homogeneizadores; (ii) determinar a função de ingredientes no desenvolvimento de produtos; (iii) controlar a qualidade do produto final e intermediário, etc (Steffe, 1996).

Medidas reológicas são frequentemente utilizadas para a obtenção de informações fundamentais sobre a organização estrutural e interações entre os componentes da emulsão (McClements, 2004; McClements e Weiss, 2005). Muitos atributos sensoriais dos alimentos à base de emulsão estão diretamente relacionados às propriedades reológicas (como por exemplo, cremosidade, espalhabilidade, fluidez, dureza, dentre outros) (McClements, 2004), o que possibilita o desenvolvimento de metodologias que permitem a correlação entre o perfil reológico de um determinado produto emulsionado com sua avaliação sensorial.

As propriedades reológicas das emulsões dependem de alguns fatores como fração volumétrica da fase dispersa, tamanho de gota e sua carga, comportamento reológico das fases, interações entre as gotas e adição de modificadores reológicos como espessantes (Barnes, 1994; Tadros, 1994, McClements, 2004).

A determinação das propriedades reológicas consiste em obter a relação entre a força aplicada, tensão de cisalhamento, e sua resposta, a deformação. A avaliação reológica das emulsões pode ser realizada a partir de testes de cisalhamento estacionário, transientes e oscilatórios. Testes de cisalhamento estacionário são realizados para avaliar a curva de escoamento, enquanto testes transientes e oscilatórios estudam as propriedades viscoelásticas da amostra (Schramm, 2000).

A partir do teste de cisalhamento, os fluidos podem ser classificados como newtonianos e não newtonianos. Os newtonianos são aqueles em que a viscosidade independe da taxa de cisalhamento em uma dada temperatura, ou seja, apresentam viscosidade constante (viscosidade newtoniana) (Schramm, 2000). Todos os outros fluidos que não apresentam esse comportamento são chamados de fluidos não newtonianos. Esses podem ainda ser divididos em pseudoplástico (quando a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento) e dilatantes (quando a viscosidade aumenta com o aumento na taxa de cisalhamento) (Steffe, 1996).

A maioria das emulsões apresenta comportamento pseudoplástico. Quando em repouso, as gotas apresentam um estado desordenado, e quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, tendem a se orientar na direção da força aplicada, causando assim a diminuição da viscosidade.

Emulsões alimentícias exibem diferentes comportamentos reológicos, variando desde fluidos de baixa viscosidade, como o leite, até mesmo sólidos duros, como manteiga sob refrigeração (Rao, 1999). Muitas emulsões, entretanto, apresentam estrutura mais complexa, não sendo nem líquidos nem sólidos puros. Essas emulsões apresentam simultaneamente propriedades reológicas que são parcialmente elásticas e viscosas (Walstra, 2003), sendo, portanto, fluidos viscoelásticos. O método mais comum para estudo do comportamento viscoelástico de alimentos é o teste dinâmico oscilatório (Steffe, 1996), em que uma determinada tensão ou deformação

oscilatória senoidal é aplicada ao material, a uma determinada frequência e amplitude, e a diferença de fase entre a deformação provocada ou tensão desenvolvida é registrada, respectivamente. Seus resultados são muito sensíveis à composição química e à estrutura física do material avaliado (Steffe, 1996; Rao 1999). A varredura oscilatória de frequência é provavelmente o teste oscilatório mais comum, pois mostra como o comportamento elástico e viscoso do material muda com a taxa de aplicação da deformação ou tensão. É um teste bastante útil para comparar os efeitos de vários ingredientes e métodos de processamento sobre a viscoelasticidade do produto. A partir do espectro mecânico obtido é possível, inclusive, avaliar a estabilidade das emulsões (Steffe, 1996).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNES, H. A. (1994). Rheology of emulsion – a review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Amsterdam, 91, 89-95.
- BEJRAPHA, P. CHOI, M-J.; SURASSMO, S.; CHUN, J-Y.; MIN, S-G. (2011). Formulation and Antimicrobial Activity on *Escherichia coli* of Nanoemulsion Coated with Whey Protein Isolate. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31(4), 543-550.
- BOUYER, E.; MEKHLLOUFI, G.; HUANG, N.; ROSILIO, V.; AGNELY, F. (2013). β -Lactoglobulin, gum arabic, and xanthan gum for emulsifying sweet almond oil: Formulation and stabilization mechanisms of pharmaceutical emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 433(0), 77-87.
- BOUYER, E. MEKHLLOUFI, G.; LE POTIER, I.; DE Kerdaniel TDU, F.; GROSSIORD, J. L.; ROSILIO, V.; AGNELY, F. (2011). Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum arabic. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354(2), 467-477.
- BOUYER, E.; MEKHLLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J. L.; Agnely, F. (2012) Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1–2), 359-378.

- BOGNOLO, G. (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1-2), 41-52.
- BOMFORD, R.; STAPLETON, M.; WINSOR, S.; BEESLEY, J. E.; JESSUP, E. A.; PRICE, K. R.; FENWICK, G. R. (1992) Adjuvanticity and ISCOM formation by structurally diverse saponins. *Vaccine*, 10(9), 572-577.
- BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M. T. A.; PARKINSON, D. J. (1990). Whey proteins. In: HARRIS, P. (Ed.). *Food Gels*. London/New York: Elsevier Applied Science, cap. 11, p.435-466.
- BRAR, S. K.; VERMA, M. (2011). Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 4-17.
- BROWNLOW, S.; CABRAL, J. H. M.; COOPER, R.; FLOWER, D. R.; YEWDALL, S. Y.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A. C. T.; SAWYER, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5(4), 481-495.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 143-151.
- CARLI, I. C. (2006). *Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido*. (Mestrado). Centro de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.
- CARDOSO, A. O. (2001). *Espalhamento de luz dinâmico aplicado no estudo de sistemas micelares*. Campinas, SP, p.1-12
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. (1985). Protéines Alimentaires. In: LAVOISIER, T. E. D. (Ed.). *Biochimie, Propriétés Fonctionnelles, Valeur Nutritionnelle, Modifications Chimiques*. Paris: Technique et Documentation Lavoisier. p.156-192.
- CORREDIG, M. (2009). *Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses*. Elsevier Science.
- DAMODARAN, S. (2005). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*, 70(3), p. R54-R66.
- DAMODARAN, S.; PRKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. 4ª Porto Alegre: Artmed Editora.

- De WIT, J. N. (2009). Thermal behaviour of bovine b-lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 27-34.
- DICKINSON, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 15(2),161-176.
- DICKINSON, E. (1992) Interfacial interactions and the stability of oil-in-water emulsions. *Pure and Applied Chemistry*, 64(11), 1721-1724.
- DICKINSON, E.; MCCLEMENTS, D. J. (1995). *Advances in food colloids*. London; New York: Blackie Academic & Professional.
- ELIAS, F. O.; CAPITANI, C. D.; MOLINA, S.; AÑON, M. C.; PACHECO, M. T. B. (2006). Propriedades Emulsificantes de Complexos de Proteínas de Soro de Leite com Polissacarídeos. *Brazilian Journal of Food Technology*, jan.
- ELEYA, M. M. O.; TURGEON, S. L. (2000). The effects of pH on the rheology of b-lactoglobulin/k-carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14(3), 245-251.
- FARINATO, R. S.; ROWELL, R. L. (1983). Optical properties of emulsions. In: BECHER, P. (Ed.). *Encyclopedia of emulsion technology*. New York: Marcel Dekker, v.1. cap. 8, p.439-480.
- FLOWER, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal*, 318(1), 1-14.
- FLOWER, D. R.; NORTH, A. C. T.; SANSOM, C. E. (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1-2), 9-24.
- FRIBERG, S. E.; LARSSON, K.; SJOBLOM, J. (2003). *Food Emulsions*. In: (Ed.). 4 th ed. Hoboken: Marcel Dekker Inc.
- GOLEMANOV, K. TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N.; PELA, E.; STOYANOV, S. D. (2012). Surface Shear Rheology of Saponin Adsorption Layers. *Langmuir*, 28(33), 12071-12084.
- GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231-258.

- HENG, L. VINCKEN, J.-P.; VAN KONINGSVELD, G.; LEGGER, A.; GRUPPEN, H.; VAN BOEKEL, T.; ROOZEN, J.; VORAGEN, F. (2006). Bitterness of saponins and their content in dry peas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(8), 1225-1231.
- HOLMBERG, K. JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. (2002). *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. Wiley.
- HORNE, D. S. (1995). Light Scattering Studies of Colloid Stability and Gelation. In: DICKINSON, E. (Ed.). *New physico-chemical techniques for characterization of complex food systems*. Londres: Blackie Academic & Professional, cap. 11, p.240-267.
- JENKINS, K. J.; ATWAL, A. S. (1994). Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 5(3), 134-137.
- KARLSSON, O. J.; BSCHADE, B. E. H. (2005). Particle Analysis: Particle Size, Particle Shape and Structure and Surface Characterisation. In: HERK, A. M. V. (Ed.). *Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation*. 1^a. Oxford: Blackwell Publishing, cap. 8, p.186-225.
- KEZWON, A.; WOJCIECHOWSKI, K. (2014). Interaction of *Quillaja* bark saponins with food-relevant proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209(0), 185-195.
- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers —. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(3), 187-201.
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. (2002). The Ligand-binding Site of Bovine β -Lactoglobulin: Evidence for a Function? *Journal of Molecular Biology*, 318(4), 1043-1055.
- KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. (2009). Surfactants Used in Food Industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363-1383.
- KULKARNI, V. S. (2009). *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems: Science and Technology*. Elsevier Science.
- KWAAMBWA, H. M.; RENNIE, A. R. (2012). Interactions of surfactants with a water treatment protein from *Moringa oleifera* seeds in solution studied

- by zeta-potential and light scattering measurements. *Biopolymers*, 97(4), 209-218.
- LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975-984.
- LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. (1988). *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*. Dekker.
- LOH, W.; TEIXEIRA, L. A. C.; LEE, L. T. (2004). Isothermal Calorimetric Investigation of the Interaction of Poly(N-isopropylacrylamide) and Ionic Surfactants. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(1), 3196-3201.
- MALVERN. (2007). *Malvern Instruments Zetasizer Nano User Manual, Issue 1.1*. UK: Worcestershire.
- MALVERN ZETASIZER (2014). Zeta potential: an introduction in 30 minutes. Disponível em: < <http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/zeta.pdf> >. Acessado em 30 de janeiro de 2014.
- MATSUURA, A. B. J. (2004). *Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação*. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MCCLEMENTS, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practice, And Techniques*. CRC PressINC.
- MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. (2005). Lipid Emulsions. In: SHAHIDI, F. (Ed.). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6 th. New Jersey: John Wiley & Sons, v.6.
- MCCLEMENTS, D. J. (2009). Biopolymers in Food Emulsions. In: KASAPIS, S.;NORTON, I. T.; et al (Ed.). *Modern Biopolymer Science*. San Diego: Academic Press.; p.129-166.
- MICICH, T. J.; FOGLIA, T. A.; HOLSINGER, V. H. (1992). Polymer-supported saponins: an approach to cholesterol removal from butter oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(8), 1321-1325.
- MYERS, D. (1999). *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

- NITSCHKE, M. (2004). Produção e caracterização de biosurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. (2002). Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25, 772-776.
- NORD, L. I.; KENNE, L. (1999). Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research*, 320(1-2), 70-81.
- OAKENFULL, D. (1981). Saponins in food—A review. *Food Chemistry*, 7(1), 19-40.
- OKOLIEGBE, I. N.; AGARRY, O. O. (2012). Application of microbial surfactant (a review). *Scholarly Journals of Biotechnology*, 1(1), 15-23.
- OLMSTEAD, M. J. (2002). *Organic toothpaste containing saponin*. 6, 485,711. 6, 711. US Patent. 6, 485, 711.
- OSBOURN, A.; GOSS, R. J. M.; FIELD, R. A. (2011). The saponins - polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Natural Product Reports*, 28(7), 1261-1268.
- PÉREZ, M. D.; CALVO, M. (1995). Interaction of [beta]-Lactoglobulin with Retinol and Fatty Acids and Its Role as a Possible Biological Function for This Protein: A Review. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 978-988.
- PIOTROWSKI, M.; LEWANDOWSKA, J.; WOJCIECHOWSKI, K. (2012). Biosurfactant-Protein Mixtures: *Quillaja* Bark Saponin at Water/Air and Water/Oil Interfaces in Presence of β -Lactoglobulin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(16), 4843-4850.
- RAO, M. A. (1999). *Rheology of fluids and semisolid foods*, Kluwer Academic Publishers, New York.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4), 229-236.

- ROLAND, I.; Piel, G.; Delattre, L.; Evrard, B. (2003). Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*, 263(1–2), 85-94.
- SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. (2000). The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 482(1-2), 136-148.
- SCHMELZ, T. LESMES, U.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. (2011). Modulation of physicochemical properties of lipid droplets using β -lactoglobulin and/or lactoferrin interfacial coatings. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1181-1189.
- SCHRAMM, L. L. (2006). *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley.
- SJOBLOM, J. (2010). *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*: CRC Press; p. 214.
- SOUTHON, S.; Wright, A. J.; Price, K. R.; Fairweather-Tait, S. J.; Fenwick, G. R. (1988). The effect of three types of saponin on iron and zinc absorption from a single meal in the rat. *British Journal of Nutrition*, 59(3), 389-396.
- STANIMIROVA, R.; MARINOVA, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; STOYANOV, S.; PELAN, E. (2011). Surface Rheology of Saponin Adsorption Layers. *Langmuir*, 27(20), 12486-12498.
- STEFFE, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*: Freeman Press.
- TADROS, T. F. (2013). *Emulsion Formation and Stability*. John Wiley & Sons.
- TAN, H. W. (2009). *Rheology and stability of olive oil cream emulsion stabilized by sucrose fatty acid esters nonionic surfactants*. (Mestrado). Faculdade de Ciência, Universidade da Malásia, Kuala Lumpur.
- TCHOLAKOVA, S. DENKOV, N. D.; IVANOV, I. B.; CAMPBELL, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126(0), 259-293.
- VETRI, V.; MILITELLO, V. (2005). Thermal induced conformational changes involved in the aggregation pathways of beta-lactoglobulin. *Biophysical Chemistry*, 113(1), 83-91.

- WALSTRA, P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*, Marcel Dekker, New York, NY.
- WOJCIECHOWSKI, K.; PIOTROWSKI, M.; POPIELARZ, W.; SOSNOWSKI, T. R. (2011). Short- and mid-term adsorption behaviour of *Quillaja* Bark Saponin and its mixtures with lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 687-693.
- WOJCIECHOWSKI, K.; KEZWON, A.; LEWANDOWSKA, J.; MARCINKOWSKI, K. (2014). Effect of β -casein on surface activity of *Quillaja* bark saponin at fluid/fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 34(1), 208-216.
- WONG, D. W.; CAMIRAND, W. M.; PAVLATH, A. E. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36, 807-844.
- YANG, Y.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; MCCLEMENTS, D. J. (2013). Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: *Quillaja* saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 589-596.
- YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. (2013). Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 712-720.
- YOO, B.; KANG, B.; YEOM, M.; SUNG, D.; HAN, S.; KIM, H.; JU, H. (2003). *Nanoemulsion comprising metabolites of ginseng saponin as an active component and a method for preparing the same, and a skin care composition for anti-aging containing the same*. Patent US20030175315 A1.

Capítulo 2 – PROPRIEDADES EMULSIFICANTES E INTERFACIAIS DA MISTURA DE SAPONINA DE *QUILLAJA* E β -LACTOGLOBULINA

RESUMO

Efeitos do número de ciclos de homogeneização, pH e concentração de NaCl sobre a formação e estabilidade de emulsões óleo em água (O/A) contendo mistura de saponina de *Quillaja* (biossurfactante) e β -lactoglobulina foram estudados. As emulsões formadas foram avaliadas em termos de sua carga superficial, distribuição de tamanho de gota, reologia e estabilidade física após 7 dias de armazenamento. As emulsões avaliadas nas diversas condições (4, 6 e 8 ciclos de homogeneização, pH 7, 8 e 9, e concentração de NaCl de 0, 100 e 200 mmol L⁻¹) apresentaram distribuição de tamanho de gota multimodal e polidispersa, com gotas de diâmetro médio < 400 nm e carga líquida superficial negativa. A utilização de 4 ciclos de homogeneização mostrou-se adequada para obtenção de gotas pequenas nas condições avaliadas. Emulsões obtidas por diferentes ciclos de homogeneização exibiram comportamento pseudoplástico, com a presença de pequena tensão inicial e baixa viscosidade aparente. Comportamento viscoelástico também foi observado, sendo as emulsões caracterizadas como géis fracos. Os diâmetros médios das gotas não foram significativamente afetados pela concentração de NaCl nem pelo pH ($p > 0,05$), diferentemente do potencial ζ , cuja magnitude diminuiu e aumentou significativamente ($p < 0,05$) com os aumentos da concentração do sal e do pH, respectivamente. A tensão interfacial de equilíbrio também foi significativamente influenciada pelo pH. Misturas de surfactante e proteína em pH 9 e sob adição de NaCl apresentaram maior taxa de adsorção das moléculas emulsificantes na interface óleo-água, embora não tenha sido observada relação entre a taxa de adsorção e o tamanho final das gotas. Verificou-se também que as emulsões submetidas a diferentes ciclos de homogeneização (4, 6 e 8 em pH 7 e 9, sem adição de NaCl), assim como as preparadas em condições básicas

(pH 7, 8 e 9) e na presença de baixa concentração de NaCl ($< 200 \text{ mmol L}^{-1}$), foram estáveis à separação de fases. Para todas as emulsões avaliadas foi observado um rearranjo espacial das gotas após o período de armazenamento devido à cremação, no entanto, não foram observadas variações significativas no diâmetro médio das gotas com o tempo. A estabilidade das emulsões foi viabilizada pela elevada repulsão eletrostática quando formuladas sem adição de NaCl e pelo impedimento estérico quando na presença do sal.

Palavras-chave: emulsão, saponina, β -lactoglobulina, espalhamento dinâmico de luz, potencial ζ , reologia, homogeneização, estabilidade, tensão interfacial.

1. INTRODUÇÃO

Emulsão é um sistema coloidal termodinamicamente instável constituído por duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma dispersa na outra. No entanto, a presença de agentes emulsificantes pode conferir estabilidade cinética a esse sistema (McClements, 2004). Proteínas e surfactantes compõem os principais tipos de substâncias emulsificantes, uma vez que ambos adsorvem na interface e reduzem a tensão interfacial (Kezwon & Wojciechowski, 2014; Piotrowski *et al.*, 2012). Nos últimos anos, muitos dos estudos sobre misturas de proteínas e surfactantes de baixa massa molar têm se dedicado ao emprego de surfactantes sintéticos, em especial os derivados de petróleo (Wan *et al.*, 2014). No entanto, devido ao crescente interesse e demanda por parte dos consumidores e das indústrias de alimentos por produtos mais saudáveis e ambientalmente corretos, o interesse por alternativas de origem biológica como os biosurfactantes têm ganhado espaço (Kitamoto *et al.*, 2002; Wojciechowski *et al.*, 2011).

Saponinas são glicosídeos de elevada massa molar, estruturalmente constituídos por uma aglicona com esqueleto de triterpeno ou esteróide, a qual está unida por meio de ligações glicosídicas a uma ou mais cadeias de

açúcares, que podem ser lineares ou ramificadas (Golemanov *et al.*, 2012; Stanimirova *et al.*, 2011; Wojciechowski *et al.*, 2014; Wojciechowski *et al.*, 2011), o que confere às moléculas seu caráter anfifílico. Dentre as diversas fontes de saponinas para uso industrial, a árvore *Quillaja saponaria* Molina (nativa no Chile e Peru) parece ser a fonte mais promissora e explorada para obtenção de saponinas (Wojciechowski *et al.*, 2014).

Desta forma, saponina de *Quillaja* tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, de modo que diversos estudos têm se dedicado à avaliação das propriedades interfaciais, emulsificantes e de formação de espumas de suas misturas com diferentes proteínas (Piotrowski *et al.*, 2012; Wojciechowski *et al.*, 2014; Wojciechowski *et al.*, 2011). Piotrowski e colaboradores (2012) estudaram as propriedades interfaciais e emulsificantes de misturas de saponina de *Quillaja* e β -lactoglobulina (β -lg), proteína globular correspondente à principal fração proteica do soro de leite, sob diferentes razões de mistura. Efeito sinérgico, devido à formação do complexo proteína-surfactante, foi observado para a cinética de adsorção do surfactante em interface água-óleo quando a razão de mistura surfactante/proteína foi baixa, sendo o efeito menos pronunciado na formação/estabilidade das emulsões (Piotrowski *et al.*, 2012). No entanto, o estudo de Piotrowski e colaboradores (2012) foi realizado com concentração de β -lg (10^{-7} mmol L⁻¹) e fração de volume da fase dispersa das emulsões (0,2 % m/m de óleo) mínimas, as quais não correspondem a situações reais encontradas em alimentos. Além disso, não se sabe muito a respeito dos efeitos da condição de homogeneização bem como da composição da fase contínua sobre a formação e estabilidade de emulsões óleo em água (O/A) contendo saponina de *Quillaja* e β -lg.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do número de ciclos de homogeneização, do pH e da concentração de NaCl do meio sobre a formação e estabilidade de emulsões O/A estabilizadas pela mistura de saponina de *Quillaja* e β -lg. A caracterização das emulsões foi determinada pela análise visual, distribuição de tamanho de gota, carga superficial e reologia das emulsões, de modo a explorar os efeitos dessas variáveis e os possíveis mecanismos de estabilização. A tensão interfacial das misturas também foi avaliada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

β -lactoglobulina (90 % de pureza) foi fornecida pela Davisco Foods International Inc. (La Sueur, MN, EUA). Saponina da casca de *Quillaja* (QBS, *Quillaja Bark Saponin*) (32 % de pureza), uma mistura de glicosídeos de terpenos cíclicos extraída da casca da árvore *Quillaja saponaria* Molina, foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Óleo de girassol (Liza, Cargill Foods, SP, Brasil) foi adquirido no comércio local. Cloreto de sódio, hidróxido de sódio, azida de sódio e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os materiais foram utilizados tal como recebidos, sem purificação adicional.

2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES MISTAS DE QBS E B-LG

Inicialmente, foram preparadas separadamente soluções estoques de β -lg (4 mmol L^{-1}), QBS (4 mmol L^{-1}), NaCl ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) e tris(hidroximetil)aminometano (tris) (1 mol L^{-1}) em água deionizada contendo 0,02 % (m/v) de azida de sódio (para inibir o crescimento microbiano). As soluções foram deixadas em repouso de um dia para o outro para garantir a completa dispersão e reidratação. Misturas contendo $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de QBS e $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -lg foram preparadas em tampão tris 5 mmol L^{-1} em diferentes pH (7, 8 e 9) e concentrações de NaCl (0, 100 e 200 mmol L^{-1}) a partir das soluções estoques. O pH das misturas foi ajustado com solução de HCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ou NaOH $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ após mistura das soluções estoques sob agitação com um agitador magnético. O volume final da mistura foi ajustado com água deionizada contendo 0,02 % (m/v) de azida de sódio.

2.3. PROPRIEDADES DINÂMICAS INTERFACIAIS

A tensão interfacial foi determinada pelo método da gota pendente em um medidor de ângulo de contato e tensão superficial (Easy drop, DSA 100, Krüss, Alemanha). Gotas das soluções aquosas correspondentes às fases contínuas utilizadas nas emulsões avaliadas no presente estudo foram formadas na fase óleo contida em uma cubeta, a uma taxa de injeção constante (105 $\mu\text{L}/\text{min}$). O maior volume de gota possível, que permitisse que as medidas fossem realizadas sem que a gota se desprendesse da ponta da agulha (diâmetro = 1,8 mm) da seringa antes do término da análise (15 minutos), foi utilizado. A imagem da gota formada foi monitorada pelo *software* do equipamento e a tensão interfacial entre as fases foi determinada em função do tempo, de acordo com a equação de Laplace. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente sem o controle de temperatura.

Para determinação da tensão interfacial de equilíbrio (γ_{eq}), uma equação exponencial (Equação 1) foi ajustada aos dados experimentais da cinética de decaimento de tensão.

$$\gamma = \gamma_{eq} + A \exp(-B\sqrt{t}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde γ (mN m^{-1}) é a tensão interfacial no instante t (s), γ_{eq} (mN m^{-1}) é a tensão interfacial de equilíbrio e A (mN m^{-1}) e B ($\text{s}^{-1/2}$) são constantes.

2.4. PREPARO DAS EMULSÕES

Emulsões óleo em água (O/A) foram preparadas pela dispersão de 10 % (m/m) de óleo de girassol nas misturas contendo 0,6 mmol L^{-1} de QBS e 0,6 mmol L^{-1} de β -lg em tampão tris 5 mmol L^{-1} , em diferentes pH (7, 8 e 9) e concentrações de NaCl (0, 100 e 200 mmol L^{-1}) dependendo do experimento. Emulsões iniciais (pré-emulsões) foram preparadas utilizando um homogeneizador de alta velocidade (Omni Macro ES Digital Programmable Homogenizer, Kennesaw, EUA) por 3 min a 7.500 rpm à temperatura ambiente. Após essa primeira homogeneização, as pré-emulsões foram “refinadas” em um homogeneizador de alta pressão (Emulsiflex-C5,

Avestin, Ottawa, Canadá) operando a cerca de 10.000 psi. Para os experimentos de análise dos efeitos de pH e da concentração de NaCl foram utilizados 4 ciclos de homogeneização, enquanto para o experimento de análise do efeito da condição de homogeneização foram utilizados 4, 6 e 8 ciclos, dependendo do experimento.

2.5. PROPRIEDADES DAS EMULSÕES

2.5.1. Estabilidade das emulsões à separação de fases

Imediatamente após o processo de homogeneização, alíquotas de 5 mL de emulsão foram transferidas para tubos de vidro graduados, os quais foram selados e armazenados por 7 dias a 25 °C. O processo de separação de fases foi visualmente determinado pela avaliação da alteração na espessura das fases de creme e de soro (camada inferior transparente ou turva) após o armazenamento. A extensão da separação de fases foi caracterizada pelo índice de separação de fases (*ISF*), determinado de acordo com a Equação 2:

$$ISF (\%) = 100 \times \frac{V_s}{V_i} \quad (\text{Eq. 2})$$

na qual V_s e V_i correspondem ao volume de soro formado na fase inferior do tubo e ao volume inicial da emulsão, respectivamente.

Para facilitar a visualização da separação de fases, Sudam III (um corante vermelho lipossolúvel) foi adicionado previamente ao óleo de girassol antes do processo de homogeneização. Alíquotas de 3 mL das amostras foram também armazenadas em frascos de vidro selados para posterior avaliação da distribuição de tamanho de gota e do potencial ζ após o armazenamento. A aparência das amostras após o armazenamento foi registrada por foto utilizando câmera digital.

2.5.2. Caracterização do tamanho médio das gotas

A distribuição de tamanho de gota foi determinada por um instrumento de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, Reino Unido), o qual se baseia nas medições das

flutuações da intensidade da luz que ocorrem ao longo do tempo quando a luz é dispersa pelas partículas que mudam sua localização espacial relativa devido ao movimento browniano. Para evitar efeitos de espalhamento múltiplo, as emulsões foram diluídas em solução tampão contendo o mesmo pH e a mesma concentração de NaCl que a amostra. Os tampões foram previamente filtrados em membranas de acetato de celulose de 0,45 mm de diâmetro. As medidas foram realizadas imediatamente após o preparo e também após o período de armazenamento para determinar a estabilidade física das emulsões. No caso das emulsões armazenadas, amostras foram cuidadosamente coletadas do topo, meio e fundo do frasco (mantido verticalmente), evitando promover grandes perturbações. O tamanho das gotas foi caracterizado em termos do diâmetro médio de gota (z-médio) e do índice de polidispersidade (PDI), os quais foram obtidos pela análise de *Cumulant* da função de correlação utilizando a porção inicial dos dados até 2.000 μ s. As medidas foram realizadas a 25 °C com, no mínimo, 3 leituras sequenciais. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de duas repetições.

2.5.3. Potencial ζ

A carga elétrica (potencial ζ) das gotas foi determinada pela medida de sua mobilidade eletroforética em um instrumento de eletroforese capilar (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Emulsões foram avaliadas imediatamente após a homogeneização e também após o armazenamento (7 dias a 25 °C). Assim como para a determinação da distribuição de tamanho de gota após o armazenamento, amostras foram cuidadosamente coletadas no topo, meio e fundo dos frascos, e foram previamente diluídas em solução tampão correspondente (mesmo pH e concentração de NaCl) para evitar efeitos de espalhamento múltiplo. As amostras diluídas foram suavemente agitadas para garantir a homogeneidade da amostra e foram lentamente injetadas nas células de medição com auxílio de uma seringa, checando para que não houvesse bolhas. A mobilidade eletroforética é determinada pela medida da direção e velocidade das gotas submetidas a um campo elétrico, e convertida a valores de potencial ζ pelo

próprio equipamento utilizando o modelo de Smoluchowski (Malvern, 2007), uma vez que o raio da partícula é muito maior do que o comprimento de Debye, o que permite assumir que a superfície da partícula é plana em relação à dupla camada de elétrons (Pashley e Karaman, 2004). As medidas foram realizadas a 25 °C e o potencial ζ foi calculado a partir da média de 5 leituras sequenciais. Os resultados são reportados como média e desvio padrão de duas repetições.

2.5.4. Medidas reológicas

Emulsões preparadas em diferentes ciclos de homogeneização tiveram suas propriedades reológicas determinadas em um reômetro rotacional (Haake Mars II, Thermo Electron Corp., Karlsruhe, Alemanha) equipado com banho termostático (Phoenix 2C30P, Thermo Electron Corp., Alemanha) e geometria cone e placa (1 °/60 mm e gap de 52 μ m) em aço inoxidável. As medidas foram conduzidas a 25 °C após o processo de homogeneização. Antes do início das análises, as amostras permaneceram em repouso por 5 min para garantir o equilíbrio da temperatura e o rearranjo estrutural. Uma nova amostra foi utilizada a cada ensaio devido à possibilidade de ruptura ou coalescência das gotas.

Para determinação do comportamento ao escoamento, medidas de tensão de cisalhamento e de viscosidade aparente foram obtidas aplicando-se uma variação contínua na taxa de deformação de 0 a 300 s^{-1} (rampa ascendente, decrescente e ascendente) durante 120 s. O modelo reológico de Herschel Bulkley (Equação 3) foi ajustado aos dados experimentais da última rampa ascendente, que corresponde ao escoamento em estado estacionário, de modo a definir o perfil de escoamento das amostras.

$$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), τ_0 é a tensão inicial (Pa), k é o índice de consistência (Pa.sⁿ), $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}) e n é o índice de comportamento (adimensional).

Varreduras oscilatórias de frequência foram realizadas no intervalo de 0,1 a 10 Hz utilizando valores de deformação determinados previamente por varreduras oscilatórias de deformação (0,1 a 10%, 1 Hz) de forma a assegurar

que os espectros mecânicos das amostras fossem obtidos dentro da região de viscoelasticidade linear.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados com pelo menos duas repetições. Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$). Os coeficientes dos modelos ajustados aos dados de decaimento de tensão interfacial e de curva de escoamento foram avaliados pelo teste t de Student ($p < 0,05$). A adequação dos ajustes dos modelos foi julgada pela significância estatística do modelo ($p < 0,05$), coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio percentual absoluto (MAPE, *mean absolute percentage error*), o qual é calculado conforme Equação 4

$$MAPE = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{Y_i - \hat{Y}_i}{Y_i} \right| \quad (\text{Eq. 4})$$

onde Y_i é a i ésima resposta experimental, \hat{Y}_i é a i ésima resposta predita e n é o número de respostas.

Comparações entre médias foram realizadas pelo teste t de comparação pareada quando avaliadas em relação ao tempo e pelo teste de Tukey para comparações no mesmo tempo ao nível de 5 % de significância. Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do *software* SAS (SAS, versão 9.1, SAS Institute Inc., NC, EUA) licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do número de ciclos de homogeneização

Durante a homogeneização a altas pressões, uma grande quantidade de energia deve ser suprida ao sistema de forma a promover o rompimento e a diminuição do tamanho das gotas, bem como melhorar a distribuição do

emulsificante sobre a superfície das gotas recém-formadas, aumentando sua estabilidade frente aos mecanismos de desestabilização (McClements, 2004).

Para avaliar o efeito da condição de homogeneização, emulsões O/A contendo QBS e β -lg em pH 7 e 9 foram preparadas pela homogeneização das pré-emulsões em diferentes ciclos (4, 6 e 8) a 10.000 psi. As propriedades físicas das emulsões: distribuição de tamanho de gota, carga superficial, reologia e estabilidade física, foram analisadas.

Carga superficial

A carga superficial da gota foi analisada após diferentes ciclos de homogeneização. As medidas de potencial ζ das emulsões são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Potencial ζ (mV) das emulsões estabilizadas por QBS e β -lg em pH 7 e 9 após diferentes ciclos de homogeneização a 10.000 psi.

pH	Ciclos de homogeneização		
	4	6	8
7	$-76,4 \pm 0,5^{aA}$	$-70,6 \pm 1,8^{aB}$	$-74,0 \pm 0,1^{aAB}$
9	$-79,6 \pm 0,1^{bA}$	$-75,9 \pm 0,1^{bB}$	$-83,3 \pm 1,2^{bC}$

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas: compara diferenças entre pH para um mesmo número de ciclos de homogeneização. Letras maiúsculas: compara diferenças entre número de ciclos de homogeneização para um mesmo pH.

Para os dois valores de pH avaliados, o potencial ζ variou significativamente com o número de ciclos de homogeneização. Inicialmente sua magnitude diminuiu com o aumento no número de ciclos de 4 para 6 e depois aumentou em 8 ciclos. Essas variações na carga superficial das partículas podem ser explicadas pelo efeito da intensidade do cisalhamento (aumento da temperatura) sobre as moléculas de proteína, cujas interações intramoleculares podem ter sido modificadas, causando possíveis mudanças conformacionais na molécula de β -lg. Essas mudanças conformacionais podem ter promovido alterações na interação entre a proteína e o surfactante

bem como ter promovido a agregação das moléculas de proteína. Kuhn e Cunha (2012) observaram em seu estudo sobre os efeitos da homogeneização a altas pressões em emulsões estabilizadas por isolado proteico de soro que com um único ciclo de homogeneização a 80 MPa já havia a formação de agregados com massa molar acima de 64 kDa e que essa formação se intensificou após 4 e 5 ciclos devido ao aumento da temperatura promovido pela recirculação da amostra. Esses autores verificaram assim que, ainda que a temperatura de desnaturação das frações de proteínas do soro não tenha sido atingida após um número mínimo de ciclos de homogeneização, a pressão promoveu a formação dos agregados. Assim, o mesmo pode ser esperado para o presente estudo, uma vez que a β -Ig corresponde à principal fração proteica do soro e que a pressão de homogeneização utilizada no presente estudo (\approx 70 MPa) foi próxima à utilizada por Kuhn e Cunha (2012).

O potencial ζ desempenha um papel importante na estabilização de sistemas coloidais (Adamson e Gast, 1997), uma vez que seus valores encontram-se diretamente relacionados à intensidade das forças de repulsão entre as gotas. Quanto maior a magnitude da carga superficial, mais intensas são as forças de repulsão eletrostática entre as gotas, e quanto mais intensa as forças de repulsão entre as gotas, mais elas impedem a agregação das gotas e, conseqüentemente, promovem maior estabilidade. De acordo com Müller e colaboradores (1996), valores absolutos de potencial ζ maiores do que 60 mV indicam excelente estabilidade eletrostática. Assim, com base nos elevados valores de potencial ζ apresentados pelas emulsões após diferentes ciclos de homogeneização (Tabela 1), espera-se que as emulsões tendam a permanecerem estáveis devido à forte repulsão eletrostática entre suas gotas.

Diâmetro médio e distribuição de tamanho de gotas

As curvas de distribuição de tamanho das gotas obtidas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram multimodais. Somando-se a isso, a presença de picos “esticados/abertos” revelou a ocorrência de emulsões polidispersas, confirmada pelos elevados valores do índice de polidispersidade (PDI) (Tabela 2). Como as distribuições de tamanho de gota

não foram monomodais, um diâmetro médio foi determinado para fornecer uma indicação do tamanho das gotas estabilizadas por QBS e β -lg sob as diferentes condições avaliadas.

Tabela 2. Valores de diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas por QBS e β -lg obtidas por diferentes ciclos de homogeneização em pH 7 e 9.

pH	Ciclos de homogeneização	Diâmetro médio (nm)	PDI
7	4	323±80 ^a	0,507±0,141 ^a
	6	322±41 ^a	0,471±0,033 ^a
	8	298±46 ^a	0,378±0,040 ^a
9	4	250±6 ^b	0,325±0,002 ^a
	6	257±12 ^b	0,319±0,071 ^a
	8	398±47 ^a	0,458±0,008 ^a

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre um mesmo parâmetro para diferentes ciclos de homogeneização em cada pH.

O aumento no número de ciclos de homogeneização resultou em reduções não significativas ($p > 0,05$) no diâmetro médio das gotas e na polidispersidade (PDI) das emulsões preparadas em pH 7. Já para emulsões preparadas em pH 9, observou-se que o aumento no tempo de residência das emulsões no homogeneizador (ciclos de homogeneização) resultou no aumento do diâmetro médio das gotas, sendo esse aumento significativo ($p < 0,05$) quando o número de passagens pelo homogeneizador aumentou de 6 para 8. Esse resultado pode indicar uma maior recoalescência durante o processo de homogeneização, embora o aumento da polidispersidade das emulsões nessas condições não tenha sido significativo ($p > 0,05$).

A utilização de 8 ciclos de homogeneização em pH 9 pode ter levado à produção de gotas muito pequenas, e, conseqüentemente, uma área superficial muito extensa, a qual pode ter sido parcialmente recoberta pelos emulsificantes, propiciando assim, um aumento na taxa de recoalescência das gotas durante a homogeneização. Simultaneamente, o aumento da temperatura e a produção de gotas menores aumentam a frequência de

colisões (McClements, 2004), o que também pode ter intensificado a recoalescência das mesmas ainda no homogeneizador. Assim, se a taxa de recoalescência supera a taxa de formação das gotas, o tamanho da gota aumenta. Além disso, o aquecimento proveniente da recirculação da amostra pode afetar adversamente as propriedades emulsificantes (Jafari *et al.*, 2007), uma vez que certos tipos de emulsificantes como proteínas e polímeros podem perder sua capacidade de estabilizar as gotas contra coalescência quando aquecidos acima de uma temperatura crítica (Floury *et al.*, 2003). O aumento no tamanho da gota com o maior número de ciclos de homogeneização pode também estar associado ao possível desdobramento da proteína, o qual leva à exposição de grupos hidrofóbicos e à interação entre eles através da formação de ligações covalentes, o que resulta na diminuição da capacidade de emulsificação e promove a recoalescência das gotas (Kuhn e Cunha, 2012). Além das interações proteína-proteína, as possíveis interações proteína-surfactante podem, também, ter sido alteradas devido às possíveis modificações sofridas pela proteína. A variação significativa do potencial ζ das gotas obtidas por diferentes ciclos de homogeneização em pH 9 reforça essas possibilidades.

Sob um conjunto de condições de emulsificação (composição da emulsão, temperatura, fornecimento de energia) há um certo diâmetro limite abaixo do qual a distribuição de tamanho não pode mais ser reduzida com adicional homogeneização. Assim, homogeneizações sucessivas após esse limite de tamanho ser atingido são ineficientes, ou, por vezes, levam ao aumento na distribuição de tamanho devido à má estabilização das gotas recém-formadas (Jafari *et al.*, 2008). Os resultados obtidos pela avaliação do número de ciclos de homogeneização no presente trabalho estão de acordo com o exposto por Jafari e colaboradores (2008). Nesse caso, a presença de valores de diâmetro médio praticamente constantes entre 4-8 e 4-6 ciclos de homogeneização em pH 7 e 9, respectivamente, indicam que o equilíbrio entre os processos de ruptura de gotas e de recoalescência, os quais ocorrem simultaneamente durante a homogeneização, foi atingido nessas condições. Assim, tem-se que a utilização de 4 ciclos de homogeneização foi suficientemente adequada, dentro das condições avaliadas, para a obtenção de emulsões com gotas pequenas.

Reologia

Medidas reológicas em estado estacionário foram realizadas para todas as emulsões. Os resultados da análise do comportamento de escoamento revelaram que as emulsões apresentaram comportamento não newtoniano com presença de pequena tensão inicial. O modelo de Herschel Bulkley (Equação 3) foi, então, adequadamente ajustado aos dados da curva de escoamento das emulsões ($R^2 > 0,97$ e $MAPE < 11,2 \%$). Os coeficientes do modelo, bem como os valores de viscosidade aparente a uma taxa de deformação de 100 s^{-1} , encontram-se na Tabela 3. A taxa de deformação de 100 s^{-1} foi escolhida para análise da viscosidade aparente por ser típica de processos que envolvem alimentos, como o escoamento por tubulações, agitação e mastigação (Steffe, 1996; McClements, 2004).

Tabela 3. Parâmetros reológicos obtidos do ajuste do modelo de Herschel Bulkley e viscosidade aparente a 100 s^{-1} (η_{100}) para emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg.

pH	Ciclos de homogeneização	Parâmetros reológicos			
		τ_0 (mPa)	k (mPa.s ⁿ)	n	η_{100} (mPa.s)
7	4	214,8±3,0 ^{aA}	5,45±0,38 ^{aA}	0,77±0,01 ^{aA}	2,03±0,36 ^{aA}
	6	30,1±4,1 ^{bA}	2,38±0,29 ^{bA}	0,91±0,02 ^{bA}	1,85±0,04 ^{aA}
	8	17,5±4,6 ^{cA}	1,76±0,28 ^{bA}	0,95±0,03 ^{bA}	1,56±0,07 ^{aA}
9	4	69,3±1,8 ^{aB}	2,26±0,12 ^{aB}	0,92±0,01 ^{aB}	2,12±0,12 ^{aA}
	6	39,9±3,6 ^{bA}	2,20±0,25 ^{aA}	0,92±0,02 ^{aA}	1,90±0,03 ^{aA}
	8	15,3±4,5 ^{bA}	1,83±0,26 ^{aA}	0,94±0,02 ^{aA}	1,57±0,02 ^{bA}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: compara diferenças entre número de ciclos de homogeneização para um mesmo pH. Letras maiúsculas: compara diferenças entre pH para um mesmo número de ciclos de homogeneização.

Para a maioria das emulsões avaliadas, os valores do índice de comportamento (n) foram ligeiramente menores do que 1, classificando as emulsões como fluidos pseudoplásticos (Steffe, 1996), sendo esse comportamento mais comum para a maioria das emulsões alimentícias

(McClements, 2004). Esse comportamento é típico de interações associativas fracas (Maskan e Gogus, 2000) e pode ocorrer por diversas razões como, por exemplo, a alteração da distribuição espacial devido à aplicação de cisalhamento, alinhamento de gotas não esféricas, remoção de moléculas de solvente ligadas às gotas, ou deformação e rompimento de flocos (Hunter, 1993).

As emulsões apresentaram baixa pseudoplasticidade, uma vez que os valores do índice de comportamento variaram entre 0,91 e 0,96, com exceção da emulsão de pH 7 obtida por 4 ciclos de homogeneização, a qual apresentou n igual a 0,77. O índice de comportamento manteve-se praticamente constante e independente dos ciclos de homogeneização em pH 9. Já em pH 7, um aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de n foi observado para o aumento dos ciclos de homogeneização, sendo portanto a emulsão obtida por 4 ciclos mais pseudoplástica do que as demais.

O índice de consistência (k) é um indicador da natureza viscosa dos fluidos (Fonseca *et al.*, 2009; Ibănescu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2009). De acordo com a Tabela 3 é possível observar que para pH 7, o valor de k diminuiu com o aumento dos ciclos de homogeneização, enquanto o valor de n aumentou, sugerindo uma diminuição na viscosidade e na pseudoplasticidade das emulsões, respectivamente, estando a diminuição na viscosidade de acordo com os valores de η_{100} obtidos. Para emulsões em pH 9, no entanto, o número de ciclos de homogeneização não afetou a consistência das emulsões, de forma que os valores de k não variaram significativamente entre 4 e 8 ciclos.

Adicionalmente foi observada a existência de uma pequena tensão residual (ou tensão inicial) nas emulsões. Esse é um parâmetro importante em situações que envolvem baixas deformações, como o processo de cremeação das gotas das emulsões durante seu armazenamento, uma vez que tensão inicial oferece resistência ao escoamento a baixas deformações. De acordo com a Tabela 3, o aumento nos ciclos de homogeneização reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os valores da tensão inicial (τ_0), indicando que emulsões mais frágeis e menos estruturadas foram formadas com o aumento no tempo de homogeneização, o que pode ser prejudicial para a estabilidade do sistema visto que quanto menor o valor de τ_0 , menos desfavorecida é a

mobilidade das gotas, as quais devem exceder uma tensão menor para iniciarem o movimento.

Quanto à viscosidade aparente das emulsões, observou-se que o aumento nos ciclos de homogeneização reduziu significativamente a η_{100} apenas em pH 9 ($p < 0,05$). Nesse pH, uma relação direta foi observada entre o diâmetro médio da gota e a viscosidade: valores maiores de η_{100} foram observados em emulsões com diâmetros de gota menores. A redução no tamanho das gotas pode ter aumentado as interações hidrodinâmicas entre as gotas devido à diminuição na distância média de separação entre as gotas quando o diâmetro médio diminuiu (Pal, 2000). Simultaneamente, a maior viscosidade das emulsões pode ter favorecido a formação de gotas menores ao reduzir a mobilidade das gotas, limitando a colisão e, conseqüentemente, a agregação e recoalescência das mesmas durante a homogeneização. Para emulsões em pH 7, no entanto, o número de ciclos de homogeneização não reduziu a viscosidade aparente de forma significativa ($p > 0,05$) e nenhuma relação com o tamanho da gota foi observada, pois esse parâmetro também não foi influenciado pelos ciclos de homogeneização.

As características viscoelásticas das emulsões também foram avaliadas. Espectros mecânicos (Figura 1) foram obtidos por varredura dinâmica de frequência para avaliar o comportamento viscoelástico das emulsões, uma vez que seus resultados são sensíveis à composição química e estrutura física da amostra (Steffe, 1996). Dados dos módulos viscoelásticos foram considerados até 3 Hz, pois a partir dessa frequência foi verificado o deslizamento das amostras (provavelmente devido à separação de fases durante o ensaio a frequências maiores).

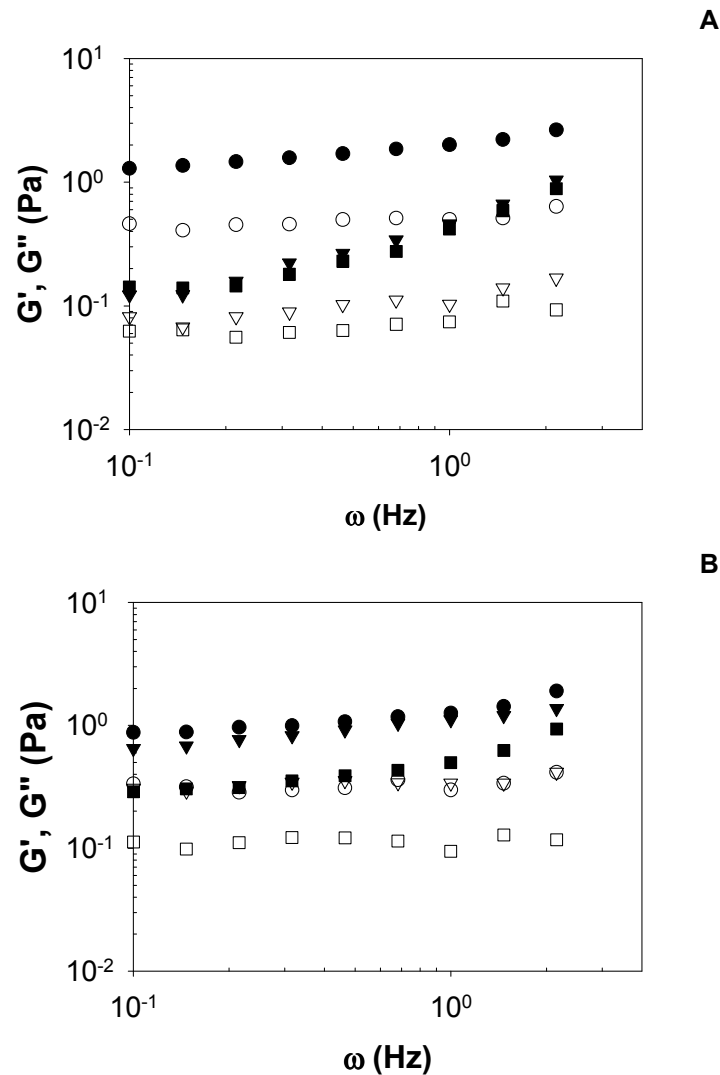


Figura 1. Espectro mecânico para emulsões estabilizadas por QBS e β -Ig em pH 7 (A) e 9 (B) obtidas por 4 (\bullet), 6 (\blacktriangledown) e 8 (\blacksquare) ciclos de homogeneização. Módulo elástico (G') em símbolos fechados, módulo viscoso (G'') em símbolos abertos.

Para todas as emulsões é possível observar que o comportamento foi predominantemente elástico (valores de $G' > G''$) em todo o intervalo de frequência aplicado e que o aumento no número de ciclos de homogeneização reduziu os valores de G' e G'' , principalmente para emulsões em pH 7, cujos módulos viscoelásticos foram mais dependentes da frequência. Os pequenos valores dos módulos viscoelásticos, juntamente com a pseudoplasticidade das amostras, indicaram a presença de estrutura tridimensional elástica frágil. Essa análise está coerente com os resultados obtidos para tensão inicial das emulsões, a qual diminuiu significativamente com o aumento nos ciclos de

homogeneização, indicando que estruturas mais frágeis foram formadas sob maior tempo de homogeneização.

Pela análise dos espectros mecânicos, observa-se que gotas com diâmetro médio diferente resultaram em similar dependência dos módulos viscoelásticos em relação à frequência quando em pH 9. Entretanto, diferenças na dependência de G' e G'' em relação à frequência foram observadas para gotas com diâmetro médio semelhante em pH 7. Esse resultado indica que o tamanho das gotas não foi o único fator que influenciou as propriedades viscoelásticas das emulsões.

A ligeira dependência dos módulos G' e G'' em relação à frequência sem o cruzamento dos módulos ($G' = G''$), junto à razão G'/G'' entre 1 e 10 em todo intervalo de frequência avaliado, permitem caracterizar as emulsões como géis fracos (também conhecidos como géis físicos) (Steffe, 1996), os quais podem ser vistos como “líquidos estruturados” (Tokita e Nishinari, 2009). Géis fracos quando submetidos a altas deformações (ensaio de escoamento) escoam, diferentemente dos géis verdadeiros, que se rompem (Ikeda e Nishinari, 2001). A estrutura típica de gel fraco está relacionada à presença de uma estrutura tridimensional. Emulsões obtidas por 6 e 8 ciclos de homogeneização em pH 7 apresentaram menores valores dos módulos G' e G'' quando comparadas à emulsão obtida por 4 ciclos, o que está de acordo com os maiores valores de índice de comportamento e menores índices de consistência (Tabela 3) exibidos por essas emulsões, e pode ser atribuído à formação de estrutura tridimensional mais fraca nessas condições. Contudo, como será discutido, essas emulsões mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento (7 dias).

Segundo Steffe (1996), emulsões estáveis são caracterizadas por espectros mecânicos com valores de G' maiores do que os valores de G'' e módulos viscoelásticos quase paralelos ao longo do intervalo de frequência avaliado. Assim, de acordo com a análise dos espectros mecânicos, pode-se dizer que, de modo geral, as emulsões foram estáveis, o que está de acordo com os resultados da análise de estabilidade a serem discutidos.

Estabilidade física

A estabilidade das emulsões à cremeação pode ser observada na Figura 2. Em todas as emulsões foi observada a presença de uma camada de espuma proveniente do processo de homogeneização, uma vez que tanto a QBS quanto a β -Ig, além de emulsificantes, são também bons agentes formadores de espuma (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007; Piotrowski *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Essa formação de espuma foi também observada em outros estudos reportados na literatura, como o de Piotrowski e colaboradores (2012), ao estudarem misturas de QBS e β -Ig em interfaces ar-água e óleo-água, e o de Yang e colaboradores (2013), ao estudarem o encapsulamento de vitamina E em emulsões estabilizadas por saponina de *Quillaja*. Yang e colaboradores (2013) verificaram ainda que a formação de espuma persistiu mesmo quando lisolecitina, um agente antiespumante, foi adicionada à fase aquosa antes da homogeneização.

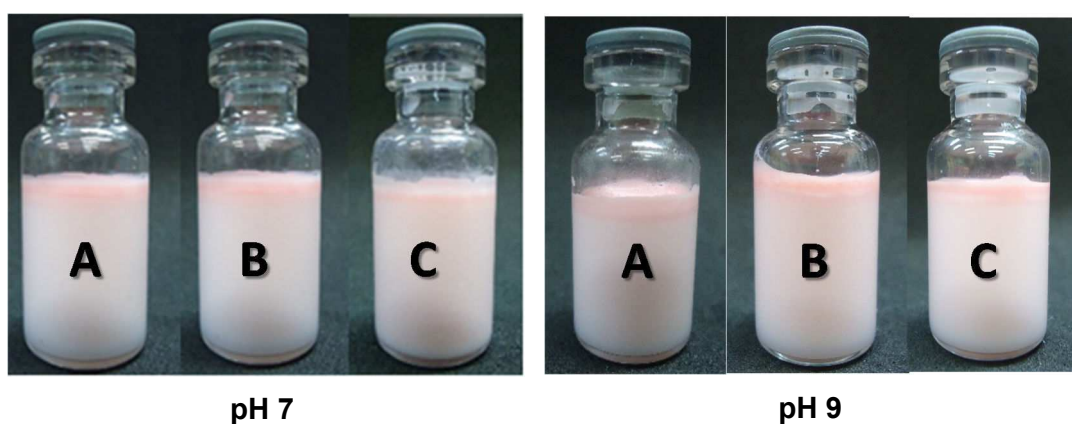


Figura 2. Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -Ig a 10.000 psi após 7 dias de armazenamento a 25 °C. Número de ciclos de homogeneização: 4 (A), 6 (B) e 8 (C).

Conforme se observa na Figura 2, independentemente do número de ciclos de homogeneização empregado, todas as emulsões mostraram boa estabilidade, sem sinal de separação de fases ($ISF = 0$) após 7 dias de armazenamento a 25 °C. Para todas as emulsões foi observado um aumento gradativo da intensidade da cor rosa ao longo da vertical, sendo a coloração ligeiramente mais intensa na parte superior. Esse gradiente de cor ocorreu

devido às diferentes velocidades de cremação das gotas presentes (gotas maiores cremeiam mais rapidamente do que as menores), uma vez que as emulsões não apresentaram gotas de tamanho uniforme, conforme verificado pelos valores elevados de PDI (Tabela 2). Assim, gotas vermelhas maiores se concentraram na parte superior, enquanto as menores permaneceram na parte inferior, refletindo na maior e menor intensidades de cor rosa observadas na parte superior e inferior, respectivamente.

A estabilidade física das emulsões também foi avaliada pela variação do diâmetro médio e do potencial ζ das gotas após o armazenamento. Dados obtidos após armazenamento são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Potencial ζ e diâmetro médio de gota de emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg obtidas por diferentes ciclos de homogeneização a 10.000 psi após 7 dias de armazenamento a 25 °C.

pH	Ciclos de homogeneização	Potencial ζ (mV)	Diâmetro médio (nm)	PDI
7	4	-71,0±0,1	358±9	0,470±0,040
	6	-63,7±1,8	318±35	0,448±0,068
	8	-71,5±0,5	227±5	0,251±0,006
9	4	-76,3±0,8	334±40	0,431±0,018
	6	-71,1±1,0	320±83	0,411±0,080
	8	-85,1±2,4	287±62	0,366±0,072*

* Médias de parâmetros que diferiram significativamente após o armazenamento de acordo com o teste t pareado ($p < 0,05$).

Variações não significativas ($p > 0,05$) foram observadas para os valores de potencial ζ após 7 dias de armazenamento. Em relação aos parâmetros da distribuição de tamanho de gota não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para o diâmetro médio de gota e o índice de polidispersidade das emulsões com o tempo, com exceção da emulsão em pH 9 obtida por 6 ciclos de homogeneização, cujo PDI aumentou significativamente com o tempo, embora seu diâmetro médio de gota não tenha apresentado uma variação significativa. Com base nesses resultados, verificou-se que as emulsões mantiveram-se estáveis aos processos de agregação.

Um dos possíveis mecanismos envolvidos na estabilização das emulsões O/A estabilizadas pela mistura de QBS e β -Ig é a repulsão eletrostática entre as gotas, a qual foi bastante intensa devido aos elevados valores de potencial ζ observados (Tabela 4). Além disso, o tamanho reduzido das gotas formadas pode também ter contribuído para sua estabilização, uma vez que emulsões com gotas pequenas tendem a ser mais estáveis, uma vez que a velocidade de separação gravitacional é proporcional ao quadrado do diâmetro da gota.

3.2. Efeito do pH da fase aquosa

Propriedades das emulsões após homogeneização

Os resultados da caracterização das emulsões obtidas após homogeneização encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de potencial ζ , diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas QBS e β -Ig em diferentes pH após homogeneização.

Propriedades	pH		
	7	8	9
Diâmetro médio (nm)	323±80 ^a	283±8 ^a	246±4 ^a
PDI	0,507±0,141 ^a	0,368±0,016 ^a	0,326±0,002 ^a
Potencial ζ (mV)	-76,4±0,5 ^a	-79,4±0,0 ^b	-79,6±0,1 ^b

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre pH para um mesmo parâmetro.

De acordo com a Tabela 5, observa-se que o potencial ζ das emulsões foi negativo em todas as condições avaliadas, uma vez que na faixa de pH estudada (7, 8 e 9) tanto a proteína quanto o surfactante encontram-se na forma aniônica, pois os valores de pH estão acima do ponto isoelétrico da proteína ($pI = 5,2$ (Cheftel, 1992)) e do pK_a do grupo ácido glucurônico ($pK_a = 3,18$ (Mitra e Dungan, 1997)) presente na molécula do surfactante.

A carga superficial das gotas foi significativamente influenciada pelo pH da fase contínua ($p < 0,05$), sendo sua magnitude ligeiramente maior quando em pH 8 e 9 devido à maior desprotonação dos grupos carboxílicos da proteína e do surfactante nesses pH, tornando as emulsões mais negativamente carregadas. No entanto, em toda faixa de pH avaliada os valores de potencial ζ foram maiores, em módulo, do que 60 mV, indicando forte repulsão eletrostática entre as gotas e garantindo excelente estabilidade eletrostática (Müller *et al.*, 1996).

As curvas de distribuição de tamanho revelaram emulsões multimodais e polidispersas. Diferentemente da carga superficial da gota, os parâmetros obtidos da distribuição de tamanho de gota não foram influenciados pelo pH da fase contínua, de modo que uma diminuição não significativa ($p > 0,05$) foi observada para o diâmetro médio de gota e a polidispersidade das emulsões. De modo geral, as emulsões apresentaram diâmetro médio de gota relativamente pequeno, o que associado à elevada carga superficial é bastante favorável para a estabilidade das emulsões, pois tende a reduzir a ocorrência de mecanismos de desestabilização.

Estabilidade física

As emulsões formuladas nos diferentes pH mostraram-se estáveis à separação de fase após 7 dias de armazenamento, conforme pode ser verificado na Figura 3. O índice de separação de fases foi, portanto, nulo para essas emulsões.

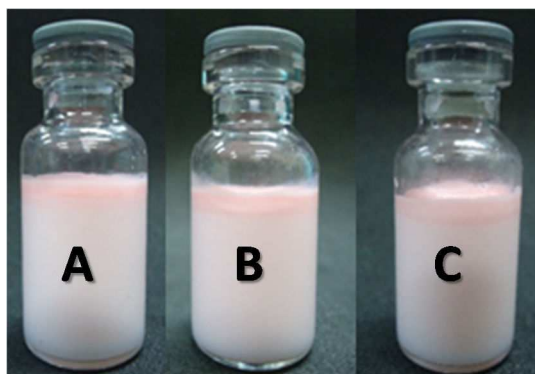


Figura 3. Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -Ig em pH 7 (A), 8 (B) e 9 (C) após 7 dias de armazenamento a 25 °C. Condição de homogeneização: 4 ciclos a 10.000 psi.

Os dados obtidos pela determinação da carga superficial, do diâmetro médio de gota e da polidispersidade das emulsões após o armazenamento de 7 dias a 25 °C encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de potencial ζ , diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas QBS e β -lg em diferentes pH após 7 dias de armazenamento a 25 °C.

Propriedades	pH		
	7	8	9
Diâmetro médio (nm)	358±9	336±22	334±40
PDI	0,470±0,040	0,437±0,008	0,431±0,018
Potencial ζ (mV)	-71,0±0,1*	-72,8±0,2*	-76,3±0,8

* Médias de parâmetros que diferiram significativamente após armazenamento de acordo com o teste t pareado ($p < 0,05$).

Conforme verificado na Tabela 6, variações significativas ao longo do tempo foram observadas apenas para a carga superficial das emulsões formuladas em pH 7 e 8, as quais reduziram em magnitude após o armazenamento. A variação no potencial ζ das emulsões com o tempo pode estar associada a possíveis rearranjos na camada de emulsificantes adsorvida à superfície da gota. No entanto, independentemente das variações no potencial ζ , as emulsões continuaram exibindo elevada carga superficial, o que conferiu elevada estabilidade eletrostática às emulsões devido à intensa repulsão eletrostática entre as gotas carregadas. Essa análise está de acordo com os resultados obtidos para análise da distribuição de tamanho da gota após o armazenamento, uma vez que não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) no diâmetro médio da gota e na polidispersidade das emulsões, o que sugere que as emulsões foram estáveis frente aos processos de agregação.

A boa estabilidade apresentada pelas emulsões em diferentes pH pode ser atribuída à elevada carga superficial das gotas, além do fato das gotas formadas terem sido pequenas, o que favoreceu sua estabilidade ao longo do tempo.

3.3. Efeito da concentração de NaCl da fase aquosa

Para avaliar o efeito da concentração de NaCl da fase aquosa, emulsões O/A contendo QBS e β -lg em pH 7 e diferentes concentrações de

NaCl (0, 100 e 200 mmol L⁻¹) foram preparadas pela homogeneização das pré-emulsões em 4 ciclos a 10.000 psi. As propriedades físicas das emulsões: distribuição de tamanho de gota, carga superficial e estabilidade física, foram analisadas.

Propriedades das emulsões após homogeneização

Os valores de carga superficial, diâmetro médio de gota e polidispersidade das emulsões sob diferentes concentrações de NaCl após homogeneização encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de potencial ζ , diâmetro médio da gota e índice de polidispersidade das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -Ig com diferentes concentrações de NaCl após homogeneização.

Propriedades	Concentração de NaCl (mmol L ⁻¹)		
	0	100	200
Diâmetro médio (nm)	323±80 ^a	277±37 ^a	265±19 ^a
PDI	0,507±0,141 ^a	0,386±0,023 ^a	0,323±0,057 ^a
Potencial ζ (mV)	-76,4±0,5 ^a	-27,6±0,3 ^b	-20,0±1,1 ^c

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre concentrações de NaCl para um mesmo parâmetro.

O potencial ζ de uma partícula depende tanto da superfície da partícula quanto do meio circundante. Assim, sua magnitude é determinada pelas características elétricas dos compostos adsorvidos à superfície bem como pelas condições da vizinhança, tais como pH e força iônica (McClements, 2004). Conforme esperado, todas as emulsões apresentaram carga líquida superficial negativa, uma vez que o pH do meio encontra-se acima do pI da β -Ig e do pK_a do grupo ácido da QBS. O aumento na concentração de NaCl resultou na diminuição significativa ($p < 0,05$) na magnitude do potencial ζ . Essa redução na carga superficial da gota pode ser atribuída à ligação dos cátions Na⁺ a grupos aniônicos presentes nas moléculas adsorvidas na superfície da gota, bem como ao efeito de blindagem eletrostática promovido

pela presença dos contra-íons adicionados (Hunter e White, 1987; McClements, 2004).

De acordo com Müller e colaboradores (1996), valores de potencial ζ com magnitude maior do que 60 mV indicam sistemas com excelente estabilidade eletrostática, enquanto valores entre 20 e 30 mV são moderadamente estáveis e aqueles menores do que 20 mV são menos estáveis. Assim, menor estabilidade é esperada para emulsões formuladas com adição de NaCl quando comparadas à emulsão sem adição do sal, já que a magnitude do potencial ζ das emulsões com NaCl está entre 20 e 30 mV, indicando que forças de repulsão eletrostática menos intensas fizeram-se presentes na presença de NaCl.

Em relação à distribuição de tamanho de gota, assim como para avaliação dos efeitos do número de ciclos de homogeneização e do pH da fase contínua, todas as emulsões em diferentes concentrações de NaCl apresentaram distribuição de tamanho multimodal e polidispersas ($0,323 < PDI < 0,507$), marcadas por picos de base ampla/aberta (dados não apresentados), mas com diâmetro médio de gota pequeno (265-323 nm). As propriedades da distribuição de tamanho não se mostraram dependentes da concentração de NaCl, não apresentando, portanto, variações significativas no diâmetro médio de gota e na polidispersidade das emulsões ($p > 0,05$).

Estabilidade física

Os resultados de estabilidade mostraram que nenhuma emulsão preparada no intervalo de concentração de NaCl avaliado apresentou separação de fases após 7 dias de armazenamento (Figura 4), sendo, portanto, seus índices de cremeação iguais a zero.

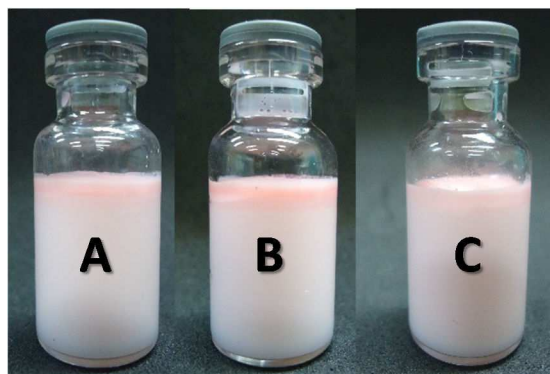


Figura 4. Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg em pH 7 na presença de 0 (A), 100 (B) e 200 (B) mmol L^{-1} de NaCl. Condição de homogeneização: 4 ciclos a 10.000 psi.

Medidas da carga superficial e da distribuição de tamanho de gota também foram realizadas após o armazenamento das emulsões de modo a avaliar a estabilidade das mesmas. Os valores de potencial ζ , diâmetro médio de gota e polidispersidade das emulsões obtidos após o armazenamento são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de potencial ζ , diâmetro médio de gota e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões compostas QBS e β -lg diferentes concentrações de NaCl após 7 dias de armazenamento a 25 °C.

Propriedades	Concentração de NaCl (mmol L^{-1})		
	0	100	200
Diâmetro médio (nm)	358 \pm 9	421 \pm 119	251 \pm 22
PDI	0,470 \pm 0,040	0,465 \pm 0,065	0,307 \pm 0,069
Potencial ζ (mV)	-71,0 \pm 0,1*	-28,8 \pm 0,1	-20,1 \pm 0,3

* Médias de parâmetros que diferiram significativamente após armazenamento de acordo com o teste t pareado ($p < 0,05$).

A carga superficial das emulsões formuladas com adição de NaCl não variou significativamente com o tempo ($p > 0,05$), enquanto variação significativa foi observada para a emulsão sem adição do sal. Possíveis rearranjos moleculares podem ter ocorrido na camada de emulsificante adsorvida à superfície da gota da emulsão sem NaCl, o que explicaria a variação do potencial ζ após o armazenamento. Entretanto, apesar da

variação significativa na carga superficial da gota quando na ausência de NaCl, seu potencial ζ continuou elevado, o que provavelmente conferiu maior estabilidade eletrostática à emulsão devido à intensa força de repulsão entre as gotas, e está de acordo com a variação não significativa do diâmetro médio da gota e do PDI da emulsão após o armazenamento ($p > 0,05$).

Em contrapartida, menor estabilidade foi esperada para as emulsões formuladas com NaCl devido à menor magnitude de seu potencial ζ . No entanto, apesar da menor repulsão eletrostática entre as gotas devido aos valores intermediários de potencial ζ ($-20 > \zeta > -29$ mV), as emulsões preparadas com adição do sal também se mostraram estáveis, uma vez que o diâmetro médio da gota e a polidispersidade da emulsão não variaram significativamente com o tempo ($p > 0,05$).

Dessa forma, independente da concentração de NaCl e, conseqüentemente, da magnitude do potencial ζ , todas as emulsões avaliadas mantiveram-se estáveis frente aos processos de agregação e separação de fases. Isto indica que o mecanismo de estabilização conferido pela mistura de QBS e β -lg não é somente por repulsão eletrostática. Muito provavelmente a estabilização das emulsões de QBS e β -lg em presença de NaCl se deu principalmente pelo impedimento estérico, independente das moléculas adsorvidas na interface serem de surfactante, proteína ou ambas. Isso porque tanto a QBS quanto a β -lg conferem barreira física contra a agregação das gotas revestidas por elas (Maier *et al.*, 2014; Tcholakova *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2013). Além disso, deve-se também ressaltar que o tamanho diminuto das gotas formadas após a homogeneização pode também ter favorecido a estabilização das mesmas.

3.4. Tensão interfacial das misturas

Medidas de tensão interfacial (γ) em interface óleo-água foram realizadas com as fases contínuas utilizadas na formação das emulsões de modo a avaliar os efeitos do pH e da concentração de NaCl sobre a atividade de superfície da mistura de QBS e β -lg (Figura 5).

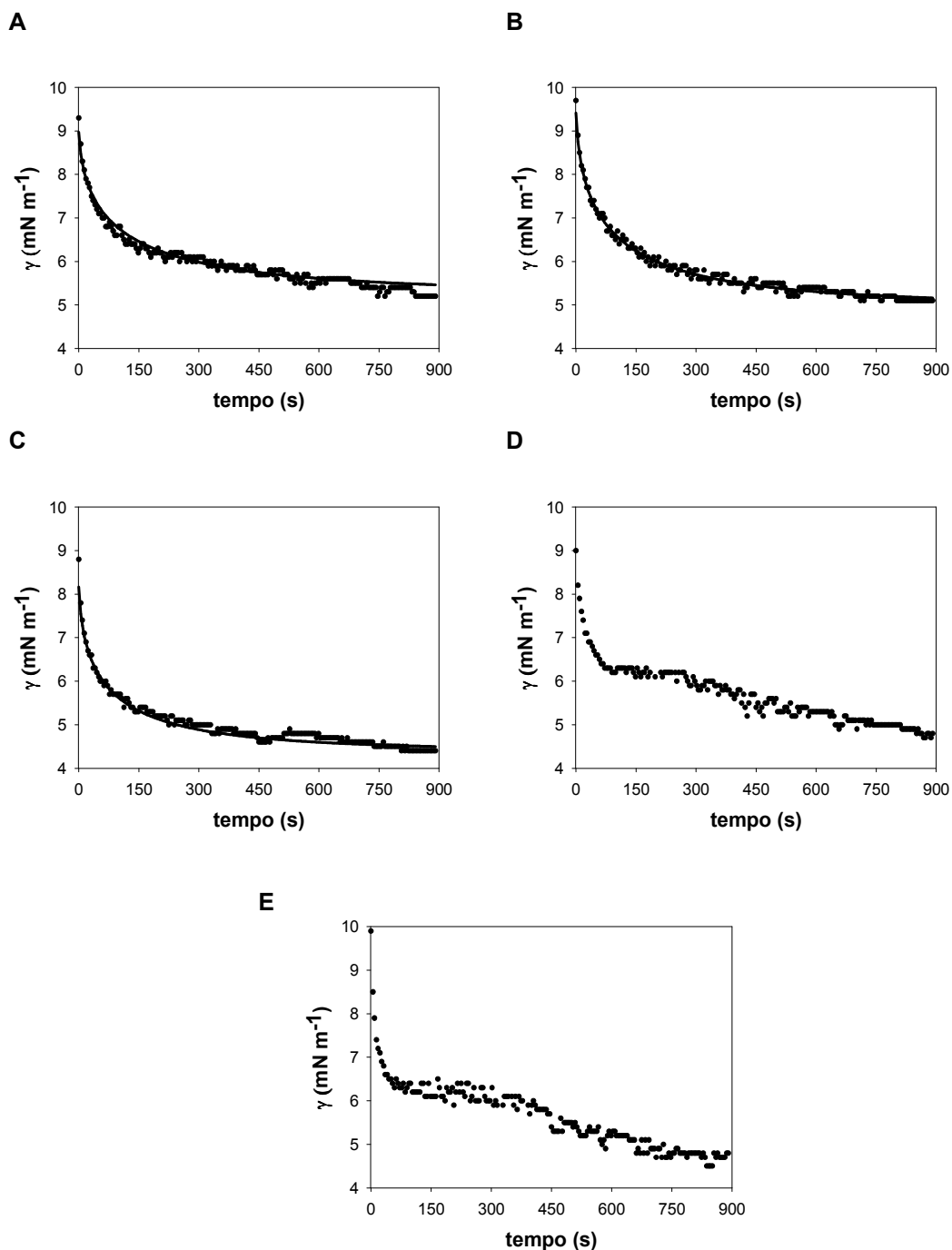


Figura 5. Tensão interfacial (γ , \bullet) de misturas de QBS e β -Ig em diferentes pH e concentrações de NaCl: pH 7 e 0 mmol L⁻¹ de NaCl (A), pH 8 e 0 mmol L⁻¹ de NaCl (B), pH 9 e 0 mmol L⁻¹ de NaCl (C), pH 7 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl (D), e pH 7 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl (E). A linha contínua em A, B e C representa a Equação 1 ajustada aos dados.

As medidas de tensão interfacial realizadas apresentaram baixa repetitividade (desvio padrão relativo por ponto de até 10 %), ainda que particular atenção tenha sido dada na condução do experimento de maneira

a reduzir os erros experimentais. No entanto, é possível observar que a tensão interfacial diminuiu ao longo do tempo, o que confirma a adsorção de moléculas tensoativas à interface óleo-água. A princípio, a diminuição na tensão interfacial foi bastante rápida, sendo posteriormente seguida por uma diminuição mais lenta. Essa rápida diminuição da tensão corresponde ao transporte das moléculas do seio da fase (*bulk*) para interface e subsequente adsorção das moléculas na interface, enquanto o decaimento mais lento corresponde à contínua adsorção e rearranjo (mudanças conformacionais) das moléculas na camada adsorvida.

Conforme observado na Figura 5, o comportamento da tensão interfacial ao longo do tempo se manteve similar para as misturas sem adição de NaCl, com a redução contínua da tensão. Entretanto, misturas com NaCl (pH 7 com adição de 100 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl) apresentaram um comportamento distinto: os valores de tensão interfacial aumentaram durante um curto intervalo de tempo após a fase caracterizada pelo rápido decaimento da tensão. A origem molecular desse fenômeno não é conhecida, porém, pode estar relacionada a possíveis mudanças de posicionamento das moléculas na camada adsorvida na interface.

Independente do pH ou da concentração de NaCl da mistura, a tensão interfacial não alcançou o equilíbrio termodinâmico após 15 minutos. Valores de tensão interfacial de equilíbrio (γ_{eq}) foram obtidos para as misturas sem adição de NaCl por meio do ajuste de uma equação exponencial (Equação 1), a qual ajustou-se bem aos dados da cinética de decaimento de tensão ($R^2 > 95\%$ e $MAPE < 1,85\%$).

Os valores de tensão interfacial de equilíbrio obtidos encontram-se na Tabela 9. Esse mesmo ajuste não pôde ser feito para as misturas com adição de NaCl devido ao desvio observado em suas curvas de decaimento de tensão. Assim, dados de tensão de equilíbrio não foram obtidos para as misturas de QBS e β -Ig em pH 7 com adição de 100 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl.

Tabela 9. Tensão interfacial de equilíbrio (γ_{eq}) óleo-água para as misturas de QBS e β -lg em diferentes pH determinada pelo ajuste de uma equação exponencial.

pH	7	8	9
γ_{eq} (mN m ⁻¹)	5,26 ± 0,20 ^a	4,98 ± 0,01 ^{ab}	4,40 ± 0,15 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os valores de tensão interfacial de equilíbrio diminuíram significativamente ($p < 0,05$) com o aumento do pH da mistura, embora a variação em seus valores tenha sido pequena (< 1 mN m⁻¹). Essa diminuição da tensão interfacial indica que a energia livre requerida para aumentar a área interfacial em uma unidade diminuiu quando o pH da mistura aumentou no intervalo de 7 a 9.

Sabe-se que a tensão interfacial tem um papel importante na formação de gotas pequenas durante a homogeneização, uma vez que esta é proporcional à energia requerida para deformar e romper as gotas dentro da seção de homogeneização (Walstra, 2003). Normalmente espera-se que tensões interfaciais pequenas resultem na formação de gotas menores. No entanto, conforme observado na Tabela 9, embora a tensão interfacial de equilíbrio tenha sido influenciada significativamente pelo pH da fase contínua ($p < 0,05$), não foram observadas diferenças significativas entre os diâmetros médios das gotas formadas em diferentes pH ($p > 0,05$) (Tabela 5). Isso porque sempre que uma nova interface é formada, sua tensão interfacial não é alterada até que moléculas tensoativas sejam transportadas para a interface e então adsorvidas. Processo esse que requer um tempo finito, de modo que são as propriedades interfaciais dinâmicas, e não a tensão interfacial de equilíbrio, que controlam a formação das gotas (Chung e Wasan, 1988; Wojciechowski *et al.*, 2011).

Assim, outra observação importante que pode ser feita é a respeito da cinética de adsorção das moléculas na interface, a qual é crucial do ponto de vista da formação de emulsões (Wojciechowski *et al.*, 2011). Aumentos na concentração de NaCl assim como no pH aumentaram a taxa de adsorção dos emulsificantes na interface, conforme pode ser observado pela maior inclinação das curvas de decaimento de tensão interfacial na Figura 5. Logo, gotas menores seriam esperadas, pois a rápida adsorção das moléculas na

interface permitiria que as gotas fossem estabilizadas em tamanhos menores, reduzindo a recoalescência durante o processo de homogeneização e, conseqüentemente, mantendo as gotas em tamanho reduzido.

Alguns autores têm postulado sobre a existência de um segundo sítio de ligação na molécula de β -lg, localizado sobre a superfície externa do barril- β (Monaco *et al.*, 1987; Sawyer e Kontopidis, 2000), o qual pode acomodar tanto moléculas pequenas e anfifílicas, tal como o dodecil sulfato de sódio (Hu *et al.*, 2011), quanto moléculas maiores que não são acomodadas no sítio primário da proteína (na cavidade central hidrofóbica) (Piotrowski *et al.*, 2012). Estudo de tensão interfacial realizado por Piotrowski e colaboradores (2012) para diferentes concentrações de QBS, com e sem adição de β -lg, sugeriram que complexos proteína-surfactante, formados pela ligação no sítio secundário externo da β -lg, favorecem a dissociação dos dímeros de proteína e o “afrouxamento” de sua estrutura rígida, o que facilita o desdobramento da molécula ao atingir a interface, aumentando sua atividade de superfície quando a razão surfactante/proteína é baixa (< 100). Devido à localização do sítio secundário, Loch e colaboradores (2011) sugerem que a disponibilidade desse sítio é maior quando a proteína encontra-se sob a forma monomérica. Assim, a formação de possíveis complexos QBS- β -lg pode ter sido favorecida em pH 9, uma vez que a proteína encontra-se como monômero em pH > 8 (e como dímero em pH 5-8) (Verheul *et al.*, 1999), o que pode ter levado ao aumento na taxa de adsorção e na atividade de superfície, como verificado pela maior inclinação inicial da curva de decaimento de tensão (Figura 5) e pelo menor valor de tensão interfacial de equilíbrio (Tabela 9), respectivamente.

Em relação à adição de NaCl, a blindagem das cargas elétricas das moléculas de QBS e β -lg pela adição de contra-íons e ligação de íons Na^+ a grupos aniônicos da proteína e do surfactante provavelmente diminuiu a repulsão eletrostática entre as moléculas adsorvidas, o que pode ter facilitado sua adsorção. Dessa forma, o efeito de blindagem eletrostática pode estar associado à maior taxa de adsorção apresentada pelas misturas contendo NaCl.

Deve-se destacar, no entanto, que as diferenças na taxa de adsorção das moléculas na interface não parecem ter tido efeito significativo sobre o

tamanho das gotas, uma vez que os diâmetros médios dessas não diferiram significativamente entre si (Tabelas 5 e 7).

4. CONCLUSÃO

Emulsões O/A estabilizadas por QBS e β -lg com gotas de diâmetro médio inferior a 400 nm foram obtidas com 4 ciclos de homogeneização sob diferentes condições de pH (7, 8 e 9) e concentração de NaCl ($< 200 \text{ mmol L}^{-1}$). As distribuições de tamanho de gota foram multimodais e exibiram considerável polidispersidade. As emulsões apresentaram gotas negativamente carregadas nos pH avaliados (7, 8 e 9), sendo a carga superficial da gota fortemente influenciada pelo pH e, principalmente, pela concentração de NaCl, de modo que a magnitude do potencial ζ diminuiu significativamente ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de NaCl e com a diminuição do pH. A taxa de adsorção dos emulsificantes na interface parece ter sido influenciada tanto pelo pH quanto pela concentração de NaCl, de modo que maiores valores foram observados para pH 9 e para presença de NaCl. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no diâmetro médio das gotas formadas sob diferentes pH e concentrações de NaCl. As emulsões apresentaram comportamento pseudoplástico com presença de pequena tensão inicial e baixa viscosidade aparente. Comportamento viscoelástico típico de géis fracos também foi observado, indicando a presença de estrutura tridimensional elástica frágil. Verificou-se que as emulsões, tanto quando preparadas em condições básicas (pH 7, 8 e 9) sem adição de NaCl quanto em pH neutro na presença de baixa concentração de NaCl ($< 200 \text{ mmol L}^{-1}$), foram estáveis à separação de fases. Embora um rearranjo espacial das gotas dentro das emulsões tenha sido observado após o armazenamento, indicando uma variação de concentração e de tamanho de gota ao longo da vertical, nenhuma variação significativa ($p > 0,05$) foi observada no diâmetro médio da gota com tempo para as emulsões avaliadas. A partir dos resultados das propriedades físicas das emulsões, é possível inferir que a estabilidade cinética das emulsões é viabilizada por outros mecanismos além da repulsão eletrostática, visto que emulsões com

menor carga superficial mantiveram-se estáveis após 7 dias de armazenamento. Muito provavelmente o mecanismo de estabilização predominante nas emulsões formuladas com adição de NaCl foi o impedimento estérico conferido pela camada de emulsificantes adsorvida na superfície da gota, o que juntamente ao tamanho diminuto das gotas, favoreceu a estabilidade das emulsões sob as condições avaliadas no presente estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. (1997). *Physical Chemistry of Surfaces* (6^a ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc.

CHEFTEL, J-C. CUQ J-L.; LORIENT, D. (1992). *Protéines alimentaires biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques*. Paris: Technique et documentation-Lavoisier.

CHUNG, S. I.; WASAN, D. T. (1988). Dynamic stability of liquid—liquid dispersions containing polymeric suspension stabilizers. *Colloids and Surfaces*, 29(3), 323-336.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; AXELOS, M. A. V.; LEGRAND, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal of Food Engineering*, 58(3), 227-238.

FONSECA, V. C.; HAMINIUK, I. W. C.; IZYDORO, R. D.; WASZCZYNSKYJ, N.; SCHEER, A. P.; SIERAKOWSKI, M.-R. (2009). Stability and rheological behaviour of salad dressing obtained with whey and different combinations of stabilizers. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 777-783.

GOLEMANOV, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N.; PELAN, E.; STOYANOV, S. D. (2012). Surface Shear Rheology of Saponin Adsorption Layers. *Langmuir*, 28(33), 12071-12084.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231-258.

HU, W., LIU, J., LUO, Q., HAN, Y., WU, K., LV, S., XIONG, S., & WANG, F. (2011). Elucidation of the binding sites of sodium dodecyl sulfate to β -lactoglobulin using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry

- combined with docking simulation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(10), 1429-1436.
- HUNTER, R. J. (1993). *Introduction to Modern Colloid Science*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- HUNTER, R. J.; WHITE, L. R. (1987). *Foundations of colloid science*: Clarendon Press.
- IBĂNESCU, C.; DANUU, M.; NANU, A.; LUNGU, M.; SIMIONESCU, B. C. (2010). Stability of disperse systems estimated using rheological oscillatory shear tests. *Revue Roumaine de Chimie*, 55, 933-940.
- IKEDA, S.; NISHINARI, K. (2001) "Weak-gel" type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated r-carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4436-4441,.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1191-1202.
- JAFARI, S.; HE, Y.; BHANDARI, B. (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 733-741.
- KEZWON A.; WOJCIECHOWSKI K. (2014). Interaction of *Quillaja* bark saponins with food-relevant proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 185-195.
- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers —. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(3), 187-201.
- KUHN, K. R.; CUNHA, R. L. (2012). Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 111, 449-457.
- LOCH, J.; POLIT, A.; GÓRECKI, A.; BONAREK, P.; KURPIEWSKA, K.; DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M.; LEWIŃSKI, K. (2011). Two modes of fatty acid binding to bovine β -lactoglobulin—crystallographic and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Recognition*, 24(2), 341-349.

- MAIER, C.; ZEEB, B.; WEISS, J. (2014). Investigations into aggregate formation with oppositely charged oil-in-water emulsions at different pH values. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117(0), 368-375.
- MALVERN (2007). *Malvern Instruments Zetasizer Nano User Manual, Issue 1.1*. UK: Worcestershire.
- MASKAN, M.; GOGUS, F. (2000). Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil-water emulsions. *Journal of Food Engineering*, 43(3), 173-177.
- MCCLEMENTS, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition*: Taylor & Francis.
- MITRA, S.; DUNGAN, S. R. (1997). Micellar Properties of *Quillaja* Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt, and pH on Solution Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1587-1595.
- MONACO, H. L.; ZANOTTI, G.; SPADON, P.; BOLOGNESI, M.; SAWYER, L.; ELIOPOULOS, E. E. (1987). Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 197(4), 695-706.
- MÜLLER, R. H.; NITZSCHE, R.; PAULKE, B.-R. (1996) *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis: Einführung in die Theorie, praktische Messdurchführung, Dateninterpretation; Colloidal drug carriers (cdc) 1st expert meeting Berlin 15. - 17. 6 1995 ; mit 24 Tabellen*. Wiss. Verlag-Ges.
- PASHLEY, R. M.; KARAMAN, M. E. (2004). *Applied Colloid and Surface Chemistry*. Nova York: John Wiley & Sons. 188 p.
- PAL, R. (2000) Shear viscosity behavior of emulsions of two immiscible liquids. *J Colloid Interface Sci* 225:359–366
- PIOTROWSKI, M.; LEWANDOWSKA, J.; WOJCIECHOWSKI, K. (2012). Biosurfactant–Protein Mixtures: *Quillaja* Bark Saponin at Water/Air and Water/Oil Interfaces in Presence of β -Lactoglobulin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(16), 4843-4850.
- SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. (2000). The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), 136-148.

- STANIMIROVA, R.; MARINOVA, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; STOYANOV, S.; PELAN, E. (2011). Surface Rheology of Saponin Adsorption Layers. *Langmuir*, 27(20), 12486-12498.
- STEFFE, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*: Freeman Press.
- TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; IVANOV, I. B.; CAMPBELL, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126(0), 259-293.
- TOKITA, M.; NISHINARI, K. (2009). *Gels: Structures, Properties, and Functions: Fundamentals and Applications*: Springer Berlin Heidelberg.
- VERHEUL, M.; PEDERSEN, J. S.; ROEFSS, S. P.; De KRUIF, K. G. (1999). Association behavior of native beta-lactoglobulin. *Biopolymers*, 49(1), 11-20.
- WALSTRA, P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*. New York: Marcel Decker.
- WAN, Z.-L.; WANG, L.-Y.; WANG, J.-M.; ZHOU, Q.; YUAN, Y.; YANG, X.-Q. (2014). Synergistic interfacial properties of soy protein–stevioside mixtures: Relationship to emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 39(0), 127-135.
- WOJCIECHOWSKI, K.; KEZWON, A.; LEWANDOWSKA, J.; MARCINKOWSKI, K. (2014). Effect of β -casein on surface activity of *Quillaja* bark saponin at fluid/fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 34(0), 208-216.
- WOJCIECHOWSKI, K.; PIOTROWSKI, M.; POPIELARZ, W.; SOSNOWSKI, T. R. (2011). Short- and mid-term adsorption behaviour of *Quillaja* Bark Saponin and its mixtures with lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 687-693.
- WU, W.; CUI, W.; ESKIN, M. A. N.; GOFF, D. H. (2009). An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. *Food Research International*, 42, 1141–1146.
- YANG, Y.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; MCCLEMENTS, D. J. (2013). Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: *Quillaja* saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 589-596.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTE E ESTABILIZANTE DA MISTURA DE SAPONINA DE *QUILLAJA* E β -lactoglobulina ÀS DE SEUS COMPONENTES PUROS

RESUMO

A formação e a estabilização de emulsões são consideravelmente influenciadas pelo tipo de emulsificante empregado, bem como pelas condições da fase contínua que as compõem. No presente estudo, a influência da razão molar de mistura de saponina de *Quillaja* (QBS) e β -lactoglobulina (β -lg) (1:0, 1:1 e 0:1 à concentração fixa de 1,2 mmol L⁻¹), pH (7, 8 e 9) e concentração de NaCl (0, 100 e 200 mmol L⁻¹) sobre a formação e estabilidade física de emulsões óleo em água (O/A) foi avaliada. Emulsões foram preparadas em duas etapas: pré-homogeneização sob agitação (7.500 rpm/3 min) e homogeneização à alta pressão (10.000 psi/4 ciclos) e, então, caracterizadas em termos de suas propriedades físicas: tamanho e distribuição de tamanho de gota, carga superficial de gota, comportamento reológico e viscoelástico, e estabilidade física após 7 dias de armazenamento a 25 °C. As emulsões apresentaram carga superficial líquida negativa nas condições avaliadas. Suas distribuições de tamanho de gota foram multimodais e as emulsões foram polidispersas, embora seus diâmetros médios de gota tenham sido relativamente pequenos (< 500 nm). As emulsões apresentaram baixa viscosidade aparente, comportamento ligeiramente pseudoplástico e com pequena tensão inicial. Análises do espectro mecânico das emulsões revelaram que essas exibiram comportamento viscoelástico típico de gel fraco. Diferentes efeitos de pH e concentração de NaCl foram observados sobre as propriedades das emulsões dependendo da razão de mistura QBS: β -lg utilizada. Após o armazenamento, análises visuais, de distribuição de tamanho de gota e potencial ζ revelaram que as emulsões apresentaram boa estabilidade frente à separação de fases e, em sua maioria, à agregação. A mistura de QBS e β -lg mostrou desempenho semelhante ao

de seus componentes puros na formação de emulsões, no entanto, parece ter apresentado melhor capacidade de estabilização do que esses, revelando um efeito sinérgico da mistura.

Palavras-chave: emulsão, homogeneização, saponina, proteína, β -lactoglobulina, estabilidade, reologia, espalhamento dinâmico de luz, potencial ζ .

1. INTRODUÇÃO

Sistemas contendo proteína e surfactante estão presentes em inúmeras situações cotidianas (Piotrowski *et al.*, 2012; Kezwon e Wojciechowski, 2014; Wojciechowski *et al.*, 2014) por serem muitas vezes utilizados simultaneamente em diversas aplicações nas indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêutica (Depree e Savage, 2001; Dickinson *et al.*, 2001; Myers, 1999).

Proteínas e surfactantes compõem os principais tipos de substâncias emulsificantes, uma vez que ambos absorvem na interface e reduzem a tensão interfacial (Piotrowski *et al.*, 2012; Kezwon e Wojciechowski, 2014). Normalmente, surfactantes de pequena massa molar são responsáveis pela formação de espumas e emulsões devido à sua rápida adsorção na interface e eficiente redução da tensão interfacial, enquanto proteínas de maior massa molar estabilizam emulsões a longo prazo graças à formação de redes interfaciais altamente (visco)elásticas (Wojciechowski *et al.*, 2011; Piotrowski *et al.*, 2012) e frequentemente carregadas eletricamente (Kotsmar *et al.*, 2008). Assim, proteínas e surfactantes complementam um ao outro, promovendo estabilidade a curto e longo prazo a emulsões e espumas (Wojciechowski *et al.*, 2011; Kezwon e Wojciechowski, 2014), o que justifica a atenção que esses emulsificantes têm recebido nos últimos anos.

Muitos dos surfactantes comercialmente disponíveis são de origem sintética, principalmente derivados do petróleo. No entanto, a consideração dos biossurfactantes como alternativas aos surfactantes sintéticos,

especialmente nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de petróleo (Nitschke e Costa, 2007; Kralova e Sjöblom, 2009), tem sido reforçada pela crescente conscientização ambiental. Devido a suas características favoráveis, como baixa toxicidade, intrínseca biodegradabilidade e biocompatibilidade, os biossurfactantes têm ganhado cada vez mais interesse e aplicações (Kitamoto *et al.*, 2002; Wojciechowski *et al.*, 2011). Hoje em dia o uso desse tipo de surfactante tem atraído cada vez mais atenção das indústrias de alimentos e de seus consumidores.

Saponinas da casca de *Quillaja* (QBS, Quilajja Bark Saponin) são biossurfactantes extraídos da casca da árvore *Quillaja saponaria* Molina, nativa do Peru e Chile (Kezwon e Wojciechowski, 2014; Wojciechowski *et al.*, 2014). Quimicamente as saponinas são glicosídeos constituídos por uma aglicona (triterpeno ou esteróide) ligada por meio de ligações glicosídicas a uma ou mais cadeias de açúcares, que podem ser lineares ou ramificadas (Hostettmann, 1995; Stanimirova *et al.*, 2011; Golemanov *et al.*, 2012; Wojciechowski, 2013; Kezwon e Wojciechowski, 2014). Produtos de QBS são aprovados para consumo humano como aditivo alimentar de acordo com termos e leis de regulamentação de alimentos em vários países como Estados Unidos, Japão e União Europeia (Wojciechowski, 2013; Wojciechowski *et al.*, 2014). Extratos de *Quillaja* encontram aplicações comerciais principalmente como agentes formadores de espuma e emulsificantes (Oakenfull, 1981; Golemanov *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013) em indústrias de alimentos e cosméticos (Stanimirova *et al.*, 2011; Golemanov *et al.*, 2012; Kezwon e Wojciechowski, 2014; Wojciechowski, 2013; Wojciechowski *et al.*, 2014), sendo empregados com outros surfactantes, naturais e sintéticos, e polímeros, como as proteínas do leite (β -lactoglobulina e β -caseína) e do ovo (lisozima), em aplicações alimentares (Kezwon e Wojciechowski, 2014).

β -lactoglobulina (β -lg), uma proteína globular, é a principal proteína do soro de leite, representando cerca de 45 a 57 % em massa do total de proteínas do soro. Por ser a maior fração proteica do soro, suas características tendem a dominar as propriedades dos produtos elaborados com soro de leite. A β -lg tem sido estudada extensivamente e é muito bem caracterizada. Sua estrutura primária consiste de 162 aminoácidos, principalmente os sulfurados, o que lhe confere alto valor biológico devido ao alto teor de aminoácidos

essenciais (Cheftel, 1992). Encontra-se na forma de dímero em pH 5-8 e como monômero quando em pH > 8 (Verheul *et al.*, 1999). O monômero de β -lg exibe duas ligações dissulfídicas intramolecular e uma sulfidril livre (Dickinson, 1998) muito reativa que possibilita o intercâmbio entre as ligações dissulfídicas durante mudanças conformacionais associadas a tratamentos térmicos e alterações de pH (Bottomley, 1990). Possui massa molar igual a 18.283 g mol⁻¹ e ponto isoelétrico (pI) em pH 5,2 (Cheftel, 1992). β -lg é uma das proteínas do leite mais estudadas (Kezwon e Wojciechowski, 2014), sendo utilizada como um ingrediente interessante em diversas formulações alimentares devido ao seu elevado valor nutricional e às excelentes propriedades funcionais.

Devido à sua importância em produtos alimentares, a atividade de superfície e as propriedades de *bulk* das misturas de β -lg com surfactantes têm sido estudadas (Kotsmar *et al.*, 2008; Piotrowski *et al.*, 2012; Kezwon e Wojciechowski, 2014). Nos últimos anos, estudos a respeito das propriedades interfaciais e de *bulk* das misturas de β -lg e saponina de *Quillaja* têm sido realizados (Piotrowski *et al.*, 2012; Kezwon e Wojciechowski, 2014). No entanto, a capacidade de formação e estabilização de emulsões por essa mistura ainda não foi suficientemente avaliada. Assim, no presente estudo, a mistura de QBS e β -lg foi avaliada e comparada a seus componentes individuais em termos de sua habilidade emulsificante sob diferentes condições de pH e concentração de NaCl, uma vez que a formação de emulsões estáveis é influenciada não só pelas propriedades e concentração dos emulsificantes, mas também pelas características do meio. Para comparação das habilidades emulsificantes de QBS e/ou β -lg, propriedades de tamanho de gota, carga superficial e reologia das emulsões, bem como sua estabilidade física após armazenamento, foram avaliadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

β -lactoglobulina (90 % de pureza) foi fornecida pela Davisco Foods International Inc. (La Sueur, MN, EUA). Saponina da casca de *Quillaja* (QBS,

Quillaja Bark Saponin) (32 % de pureza), uma mistura de glicosídeos de terpenos cíclicos extraída da casca da árvore *Quillaja saponaria* Molina, foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Óleo de girassol (Liza, Cargill Foods, SP, Brasil) foi adquirido no comércio local. Cloreto de sódio, hidróxido de sódio, azida de sódio e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os materiais foram utilizados tal como recebidos, sem purificação adicional.

2.3. PREPARO DAS EMULSÕES

Inicialmente, foram preparadas separadamente soluções estoques de β -lg (4 mmol L^{-1}), QBS (4 mmol L^{-1}), NaCl ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) e tris(hidroximetil)aminometano (tris) (1 mol L^{-1}) em água deionizada contendo 0,02 % (m/v) de azida de sódio (para inibir o crescimento microbiano). As soluções foram deixadas em repouso de um dia para o outro para garantir a completa dispersão e reidratação. Fases contínuas contendo QBS e β -lg foram preparadas em três razões molares diferentes (1:0; 1:1 e 0:1) mantendo-se a concentração total de emulsificantes fixa de $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tris 5 mmol L^{-1} em diferentes pH (7, 8 e 9) e concentrações de NaCl (0, 100 e 200 mmol L^{-1}). O pH de cada fase contínua foi ajustado com solução de HCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ou NaOH $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ após mistura das soluções estoques sob agitação magnética. O volume final da mistura foi ajustado com água deionizada contendo 0,02 % (m/v) de azida de sódio. As concentrações de NaCl, QBS, β -lg e azida de sódio foram expressas em relação às fases contínuas das emulsões.

Emulsões óleo em água (O/A) foram preparadas pela dispersão de 10 % (m/m) de óleo de girassol nas fases contínuas de QBS e/ou β -lg. Emulsões iniciais (pré-emulsões) foram preparadas utilizando um homogeneizador de alta velocidade (Omni Macro ES Digital Programmable Homogenizer, Kennesaw, EUA) por 3 min a 7.500 rpm à temperatura ambiente. Após essa primeira homogeneização, as pré-emulsões foram “refinadas” em um homogeneizador de alta pressão (Emulsiflex-C5, Avestin, Ottawa, Canadá) por meio de 4 ciclos de homogeneização a cerca de 10.000 psi.

2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

2.4.1. Estabilidade das emulsões à separação de fases

Imediatamente após o processo de homogeneização, alíquotas de 5 mL de emulsão foram transferidas para tubos de vidro graduados, os quais foram selados e armazenados por 7 dias a 25 °C. O processo de separação de fases foi visualmente determinado pela avaliação da alteração na espessura das fases de creme e de soro (camada inferior transparente ou turva) após o armazenamento. A extensão da separação de fases foi caracterizada pelo índice de separação de fases (*ISF*), determinado de acordo com a Equação 1:

$$ISF (\%) = 100 \times \frac{V_s}{V_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

na qual V_s e V_i correspondem ao volume de soro formado na fase inferior do tubo e ao volume inicial da emulsão, respectivamente.

Para facilitar a visualização da separação de fases, Sudam III (um corante vermelho lipossolúvel) foi adicionado previamente ao óleo de girassol antes do processo de homogeneização. Alíquotas de 3 mL das amostras foram também armazenadas em frascos de vidro selados para posterior avaliação da distribuição de tamanho de gota e do potencial ζ após o armazenamento. A aparência das amostras após o armazenamento foi registrada por foto utilizando câmera digital.

2.4.2. Caracterização do tamanho médio de gota ou partícula

A distribuição de tamanho de gotas e partículas foi determinada por um instrumento de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, Reino Unido), o qual se baseia na medição das flutuações da intensidade da luz que ocorrem ao longo do tempo quando a luz é dispersa pelas partículas que mudam sua localização espacial relativa devido ao movimento browniano. Para evitar efeitos de espalhamento múltiplo, as emulsões foram diluídas em solução tampão contendo o mesmo pH e a mesma concentração de NaCl que a amostra. Os tampões foram

previamente filtrados em membranas de acetato de celulose de 0,45 mm de diâmetro. As medidas foram realizadas imediatamente após o preparo e também após o período de armazenamento para determinar a estabilidade física das emulsões. No caso das emulsões armazenadas, amostras foram cuidadosamente coletadas do topo, meio e fundo do frasco (mantido verticalmente), evitando promover grandes perturbações. O tamanho das gotas foi caracterizado em termos do diâmetro médio de gota (z-médio) e do índice de polidispersidade (PDI), os quais foram obtidos pela análise de Cumulant da função de correlação utilizando a porção inicial dos dados até 2.000 μ s. As medidas foram realizadas a 25 °C com, no mínimo, 3 leituras sequenciais. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de duas repetições.

2.4.3. Potencial ζ

A carga elétrica (potencial ζ) das gotas e partículas da fase contínua foi determinada pela medida de sua mobilidade eletroforética em um instrumento de eletroforese capilar (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Emulsões foram avaliadas imediatamente após a homogeneização e também após o armazenamento a 25 °C por 7 dias. Assim como para determinação da distribuição de tamanho de gotas após o armazenamento, amostras foram cuidadosamente coletadas no topo, meio e fundo dos frascos. As amostras foram previamente diluídas em solução tampão correspondente (mesmo pH e concentração de NaCl) para evitar efeitos de espalhamento múltiplo. As amostras diluídas foram suavemente agitadas para garantir a homogeneidade da amostra e foram lentamente injetadas nas células de medição com auxílio de uma seringa, checando que não houvesse bolhas. A mobilidade eletroforética é determinada pela medida da direção e velocidade das gotas submetidas a um campo elétrico, e convertida a valores de potencial ζ pelo próprio equipamento utilizando o modelo de Smoluchowski (Malvern, 2007), uma vez que o raio da partícula é muito maior do que o comprimento de Debye, o que permite assumir que a superfície da partícula é plana em relação à dupla camada de elétrons (Pashley

e Karaman, 2004). As medidas foram realizadas a 25 °C e o potencial ζ foi calculado a partir da média de 5 leituras sequenciais. Os resultados são reportados como média e desvio padrão de duas repetições.

2.4.4. Medidas reológicas

As propriedades reológicas das emulsões foram determinadas em um reômetro rotacional (Haake Mars II, Thermo Electron Corp., Karlsruhe, Alemanha) equipado com banho termostático (Phoenix 2C30P, Thermo Electron Corp., Alemanha) e geometria cone e placa (1 °/60 mm e gap de 52 μm) em aço inoxidável. As medidas foram conduzidas a 25 °C após o processo de homogeneização. As amostras permaneceram em repouso por 5 min para garantir o relaxamento da amostra e o equilíbrio da temperatura antes de se iniciarem as análises. Uma nova amostra foi utilizada a cada ensaio devido à possibilidade de ruptura ou coalescência das gotas.

Curvas de escoamento foram realizadas no intervalo de taxa de deformação de 0 a 300 s^{-1} em três rampas (crescente, decrescente e crescente, com duração de 120 s cada). O modelo de Herschel Bulkley (Equação 2) foi ajustado aos dados da última rampa crescente, que corresponde ao escoamento em estado estacionário.

$$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), τ_0 é a tensão inicial (Pa), k é o índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}) e n é o índice de comportamento (adimensional).

Varreduras oscilatórias de frequência foram realizadas no intervalo de 0,1 a 10 Hz utilizando valores de deformação determinados previamente por varreduras oscilatórias de deformação (0,1 a 10%, 1 Hz) de forma a assegurar que os espectros mecânicos das amostras fossem obtidos dentro da região de viscoelasticidade linear.

2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar a habilidade emulsificante da mistura de QBS e β -lg com a de seus componentes, três razões molares de mistura foram avaliadas (1:0; 1:1 e 0:1) mantendo-se a concentração total de emulsificantes fixa de 1,2 mmol L⁻¹. Um delineamento fatorial completo de 2 fatores em 3 níveis com 2 repetições para cada razão de mistura de QBS e β -lg foi utilizado para avaliar a influência da composição da fase contínua sobre as características das emulsões (distribuição de tamanho de gota, carga superficial, reologia e estabilidade) estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg. Os fatores estudados e seus níveis reais e codificados são apresentados na Tabela 1. Os experimentos foram realizados de modo aleatório a fim de minimizar os efeitos de fatores não controlados. Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância.

Tabela 1. Fatores e níveis (reais e codificados) utilizados no delineamento fatorial completo.

Fatores	Níveis codificados		
	-1	0	1
pH	7	8	9
Concentração de NaCl (mmol L ⁻¹)	0	100	200

A significância estatística dos coeficientes do modelo de Herschel Bulkley ajustado aos dados da curva de escoamento das emulsões foi avaliada pelo teste t ($p < 0,05$) e a adequação do ajuste foi julgada pela significância estatística do modelo ($p < 0,05$), coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio percentual absoluto (MAPE, *mean absolute percentage error*), o qual é calculado conforme Equação 4

$$MAPE = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{Y_i - \hat{Y}_i}{Y_i} \right| \quad (\text{Eq. 4})$$

onde Y_i é a i ésima resposta experimental, \hat{Y}_i é a i ésima resposta predita e n é o número de respostas.

Comparações entre médias foram realizadas pelo teste t de comparação pareada quando avaliadas em relação ao tempo e pelo teste de

Tukey para comparações no mesmo tempo ao nível de 5 % de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* SAS® (SAS, versão 9.1, SAS Institute Inc., NC, EUA) licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES E MISTURAS DE QBS E β -LG UTILIZADAS COMO AGENTES EMULSIFICANTES

A fim de compreender as forças eletrostáticas que ocorrem entre as partículas, o potencial ζ das soluções e misturas de QBS e β -lg correspondentes às fases contínuas das emulsões estudadas foi determinado. Os valores da carga superficial das partículas para diferentes pH e concentração de NaCl das soluções e mistura encontram-se na Tabela 2.

Conforme observado na Tabela 2, tanto o pH quanto a concentração de NaCl tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre a carga superficial das partículas das soluções de β -lg e de QBS, e de suas misturas. Tanto as soluções quanto a mistura sob todas as condições de pH e concentração de NaCl avaliadas apresentaram potencial ζ negativo.

Tabela 2. Valores de potencial ζ (mV) das partículas das misturas de QBS e β -lg sob diferentes razões molares (concentração total fixa de 1,2 mol L⁻¹) em diferentes pH e concentração de NaCl.

Concentração		Razão de mistura QBS: β -lg		
de NaCl (mmol L ⁻¹)	pH	1:0	1:1	0:1
0	7	-10,8±0,4 ^{cdA}	-12,2±0,1 ^{ca}	-21,0±0,4 ^{cb}
0	8	-14,1±1,6 ^{ea}	-15,4±0,3 ^{da}	-22,2±0,1 ^{db}
0	9	-17,0±0,0 ^{fa}	-17,3±0,9 ^{da}	-25,5±0,8 ^{eb}
100	7	-8,1±0,1 ^{bb}	-5,7±0,2 ^{aa}	-10,1±0,2 ^{ac}
100	8	-6,9±0,1 ^{abA}	-8,3±0,0 ^{bb}	-12,7±0,1 ^{bc}
100	9	-11,1±0,0 ^{db}	-5,6±0,0 ^{aa}	-13,0±0,1 ^{bc}
200	7	-5,7±0,0 ^{aa}	-6,5±1,1 ^{abA}	-10,3±0,1 ^{ab}
200	8	-6,9±0,3 ^{abA}	-7,6±0,3 ^{abA}	-10,9±0,4 ^{ab}
200	9	-8,8±0,1 ^{bcB}	-6,2±0,5 ^{abA}	-12,9±0,8 ^{bc}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: compara diferenças entre composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl) para uma mesma razão de mistura de QBS e β -lg. Letras maiúsculas: compara diferenças entre razão de mistura de QBS e β -lg para uma mesma composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl).

A carga negativa das soluções de QBS pode ser atribuída à dissociação do grupo carboxílico presente em sua estrutura, uma vez que normalmente ácidos carboxílicos apresentam valores de pK_a próximos a pH 3,5 (Yang *et al.*, 2013), como o ácido glucurônico ($pK_a = 3,18$) presente na estrutura da QBS (Mitra e Dungan, 1997). Wojciechowski (2013) relatou, baseado em curvas de titulação ácido-base, que aproximadamente metade das moléculas de saponinas presentes na QBS fornecida pela empresa Sigma[®] contém grupos ácidos com $pK_a = 6,1$, o que suporta os resultados de potencial ζ negativo obtidos no presente estudo. Além disso, a concentração de NaCl também influenciou os valores de potencial ζ , de modo que o aumento da concentração do sal resultou na diminuição (em módulo) do da carga superficial das partículas devido ao efeito de blindagem eletrostática promovido pela adição de contra-íons ao meio.

Similarmente, soluções de β -lg também apresentaram potencial ζ negativo em todas as condições avaliadas, por se tratarem de valores de pH acima do seu ponto isoelétrico ($pI = 5,2$ (Cheftel, 1992)). Assim, a magnitude da carga superficial da proteína aumentou com o aumento do pH e diminuiu com a adição de NaCl devido ao efeito de blindagem eletrostática. O mesmo é válido para a mistura de β -lg e QBS.

Logo, maior magnitude do potencial ζ foi verificada na condição de pH igual a 9 sem adição de NaCl, enquanto menor magnitude foi observada, em geral, na presença de 200 mmol L^{-1} de NaCl ($p < 0,05$) tanto para as soluções de β -lg e QBS, e mistura dessas.

Em geral, o potencial ζ da mistura apresentou valores estatisticamente semelhantes aos valores da solução de QBS nas mesmas condições em grande parte das combinações de pH e concentração de NaCl avaliadas, e valores significativamente inferiores aos apresentados pela solução de β -lg ($p < 0,05$). Em seu estudo sobre a formação de complexos entre β -lg e quitosana, Hong e McClements (2007) verificaram que as misturas apresentaram valores de potencial ζ intermediários aos valores das soluções de seus componentes em mesmo pH, sendo esses valores mais positivos (ou menos negativos, pH 4-8) do que os valores para a solução de β -lg pura, indicando que complexos moleculares foram formados entre a β -lg e a quitosana. Por analogia, os resultados obtidos no presente estudo indicam, portanto, a formação de complexos entre QBS e β -lg. Presumidamente, o complexo QBS- β -lg é formado por ligações eletrostáticas entre os grupos carboxílico aniônicos da QBS ($-\text{COO}^-$) e os grupos amino catiônicos da proteína (por exemplo, $-\text{NH}_4^+$), além de possíveis interações hidrofóbicas, o que explica a formação do complexo em valores de pH acima do pI da proteína, quando β -lg e QBS encontram-se negativamente carregadas. Segundo Kezwon e Wojciechowski (2014), geralmente a presença de carga líquida negativa nas moléculas de proteínas e saponina não previne a atração entre elas. Além disso, a formação do complexo QBS- β -lg já foi evidenciada em estudos anteriores (Gee *et al.*, 1997; Shimoyamada *et al.*, 2000), incluindo condições em que ambas encontravam-se negativamente carregadas (Piotrowski *et al.*, 2012).

3.2. PROPRIEDADES DAS EMULSÕES ESTABILIZADAS PELAS MISTURAS DE QBS E β -LG

Carga superficial

De acordo com a Tabela 3, todas as emulsões apresentaram potencial ζ negativo em todas as combinações de pH (7, 8 e 9) e concentração de NaCl (0, 100 e 200 mmol L⁻¹) avaliadas, assim como suas respectivas fases contínuas (Tabela 2). No entanto, a carga elétrica superficial das emulsões foi maior do que a de suas fases contínuas. Essa diferença se deve ao fato de que o potencial ζ é dependente da carga efetiva das partículas, da camada adsorvida em sua interface e da natureza e composição do meio circundante.

O valor de potencial ζ da emulsão estabilizada por β -lg em pH 7 sem adição de NaCl está de acordo com os valores reportados por Sarkar e colaboradores (2009) (potencial ζ = -57 mV) e por Losso e Nakai (2002) (potencial ζ = -50,3 mV) para emulsões estabilizadas por 1 % (m/m) de β -lg em pH 7. Por outro lado, emulsões estabilizadas por QBS em pH 7–9 sem adição de NaCl apresentaram maior carga superficial negativa do que as emulsões avaliadas por Yang e colaboradores (2013) contendo 1 % (m/m) de Q-naturale®, um extrato à base de saponinas de *Quillaja*. Essas diferenças podem ser devido à variabilidade da matéria-prima e às diferenças dos métodos de extração, uma vez que são conhecidas mais de 60 saponinas de *Quillaja* (Nord e Kenne, 1999) com diferente atividade de superfície.

Tabela 3. Valores de potencial ζ (mV) das emulsões estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg em diferentes pH e concentração de NaCl determinados após homogeneização.

Concentração de NaCl (mmol L ⁻¹)		Razão de mistura QBS: β -lg		
pH		1:0	1:1	0:1
0	7	-76,7±0,1 ^{Bc}	-76,4±0,4 ^{Be}	-54,5±0,0 ^{Ad}
0	8	-81,0±0,6 ^{Bd}	-79,4±0,0 ^{Bf}	-61,3±0,4 ^{Ae}
0	9	-86,6±0,7 ^{Ce}	-79,6±0,1 ^{Bf}	-66,4±0,8 ^{Af}
100	7	-29,7±0,4 ^{Cb}	-27,7±0,4 ^{Bc}	-21,5±0,5 ^{Ab}
100	8	-29,3±0,3 ^{Bb}	-28,9±0,6 ^{Bcd}	-23,9±0,5 ^{Ab}
100	9	-29,2±0,2 ^{ABb}	-30,1±0,9 ^{Bd}	-26,9±0,6 ^{Ac}
200	7	-21,8±0,4 ^{Ba}	-20,0±1,1 ^{ABa}	-18,1±0,1 ^{Aa}
200	8	-21,4±0,1 ^{ABa}	-22,4±0,2 ^{Bb}	-17,8±1,7 ^{Aa}
200	9	-22,2±0,4 ^{Aa}	-24,2±0,3 ^{Bb}	-21,5±0,4 ^{Ab}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: compara diferenças entre composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl) para uma mesma razão de mistura de QBS e β -lg. Letras maiúsculas: compara diferenças entre razão de mistura de QBS e β -lg para uma mesma composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl).

Os resultados obtidos mostraram que tanto o pH quanto a concentração de NaCl tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre a carga superficial das emulsões. Independente da razão de mistura QBS: β -lg utilizada para formar a emulsão, valores mais elevados (em módulo) de potencial ζ foram obtidos para emulsões formuladas sem adição de NaCl. Esses valores diminuíram consideravelmente em magnitude quando as emulsões foram preparadas na presença de 100 mmol L⁻¹ de NaCl, e mais uma pequena diminuição foi observada nas emulsões elaboradas com adição de 200 mmol L⁻¹ de NaCl. Essa diminuição na carga superficial das gotas pode ser atribuída à ligação de íons Na⁺ aos grupos aniônicos presentes nas moléculas de QBS e β -lg adsorvidas na interface da gota, bem como ao efeito de blindagem eletrostática promovido pelos contra-íons adicionados (Hunter e White, 1987; McClements, 2004). Variações na carga superficial da gota em função da concentração de NaCl foram menos pronunciadas nas emulsões

estabilizadas puramente pela proteína, provavelmente porque esta apresenta mais grupos ionizáveis do que o surfactante, como verificado pela maior carga superficial apresentada pelas fases contínuas constituídas puramente por β -lg quando comparada às constituídas apenas por QBS (Tabela 2).

Contrariamente, para todas as razões de mistura de QBS e β -lg, a dependência do potencial ζ com o pH da fase contínua foi oposta à observada para a concentração de NaCl: o aumento do pH promoveu, em geral, um ligeiro aumento na magnitude do potencial ζ a uma concentração fixa de NaCl. A carga superficial ligeiramente maior em condição mais básica de pH está associada ao maior afastamento do pI da proteína e do pK_a do ácido presente na QBS. A interação entre pH e a concentração de NaCl também demonstrou efeito significativo ($p < 0,05$) no potencial ζ das emulsões, que de modo geral apresentaram maior e menor carga superficial quando em menor concentração de NaCl e maior pH e em maior concentração do sal e menor pH, respectivamente.

Com relação à composição dos emulsificantes utilizada para formar a emulsão, verificou-se que a razão de mistura entre QBS e β -lg teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o potencial ζ em cada combinação de pH e concentração de NaCl avaliada. Em geral, maiores valores, em módulo, foram obtidos para emulsões estabilizadas puramente por QBS, enquanto menores valores, em módulo, foram obtidos para emulsões estabilizadas somente por β -lg. Os valores de potencial ζ apresentados pelas emulsões mistas (formuladas com QBS e β -lg) foram, em grande parte, estatisticamente semelhantes aos valores das emulsões de QBS.

A magnitude do potencial ζ da gota é um dos fatores determinantes na estabilidade de emulsões, uma vez que sua magnitude encontra-se diretamente relacionada à intensidade das forças repulsivas entre as gotas (McClements, 2004). Dessa forma, forças repulsivas mais intensas impedem a agregação e, conseqüentemente, conferem maior estabilidade à emulsão. Assim, pode-se dizer que os valores elevados de potencial ζ quando NaCl não foi adicionado à formulação podem ter conferido maior estabilidade às emulsões, devido à intensa repulsão entre as gotas, evitando-se assim a desestabilização dos sistemas durante o armazenamento. De acordo com Müller e colaboradores (1996), essas emulsões (sem adição de NaCl)

apresentam excelente estabilidade, uma vez que os valores, em módulo, do potencial ζ estão, em sua maioria, acima de 60 mV. Já a adição de NaCl às formulações pode ter comprometido a estabilidade dos sistemas, uma vez que sistemas com valores intermediários de potencial ζ (módulo entre 20 e 30 mV) são moderadamente estáveis (Müller *et al.*, 1996).

Diâmetro médio e distribuição do tamanho de gotas

Um dos métodos mais utilizados para avaliar o processo de emulsificação é a medida do tamanho das gotas (Walstra, 1983; Jafari *et al.*, 2007), o qual é resultante do equilíbrio entre dois eventos opostos que ocorrem simultaneamente durante o processo de homogeneização: a formação e a recoalescência das gotas (McClements, 2004; Jafari *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2012). Além disso, assim como o potencial ζ , a dimensão das gotas é um dos fatores determinantes na estabilidade de emulsões, uma vez que a separação gravitacional e a agregação das gotas aumentam significativamente com o tamanho dessas (McClements, 2004).

Para todas as emulsões, independente da razão QBS: β -Ig utilizada e das condições de pH e concentração de NaCl, as curvas de distribuição de tamanho de gota foram multimodais e as emulsões foram consideravelmente polidispersas, como pode ser visto pelos valores de PDI apresentados na Tabela 4. Como as distribuições de tamanho de gota não foram monomodais, o diâmetro médio da gota (z-médio) foi considerado a forma mais adequada para fornecer uma indicação do tamanho das gotas estabilizadas pelas misturas de QBS e β -Ig sob as condições avaliadas no presente estudo. Os valores de diâmetro médio de gota são também apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Diâmetro médio de gota (z-médio) e índice de polidispersidade (PDI) das emulsões estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg em diferentes pH e concentrações de NaCl após homogeneização.

Composição da fase contínua		Razão de mistura QBS: β -lg					
		1:0		1:1		0:1	
Concentração de NaCl (mmol L ⁻¹)	pH	z-médio (nm)	PDI	z-médio (nm)	PDI	z-médio (nm)	PDI
0	7	289±3 ^{Abc}	0,405±0,026 ^{Aabc}	323±80 ^{Aa}	0,507±0,141 ^{Aa}	344±39 ^{Aab}	0,426±0,009 ^{Aa}
0	8	275±39 ^{Abc}	0,371±0,076 ^{Abc}	283±8 ^{Aa}	0,368±0,016 ^{Aa}	282±22 ^{Ab}	0,389±0,035 ^{Aa}
0	9	236±1 ^{Bc}	0,300±0,036 ^{Bc}	246±4 ^{Ba}	0,325±0,002 ^{ABa}	335±13 ^{Aab}	0,514±0,076 ^{Aa}
100	7	345±16 ^{Aabc}	0,460±0,018 ^{Aab}	277±37 ^{Aa}	0,386±0,023 ^{Aa}	289±3 ^{Aab}	0,476±0,068 ^{Aa}
100	8	387±37 ^{Aab}	0,518±0,008 ^{Aa}	293±6 ^{Aa}	0,498±0,061 ^{Aa}	279±45 ^{Ab}	0,357±0,123 ^{Aa}
100	9	302±39 ^{Bbc}	0,393±0,020 ^{Babc}	246±4 ^{Ba}	0,381±0,050 ^{Ba}	491±20 ^{Aa}	0,536±0,016 ^{Aa}
200	7	273±6 ^{Bc}	0,355±0,013 ^{Abc}	265±19 ^{Ba}	0,322±0,057 ^{Aa}	462±71 ^{Aab}	0,512±0,062 ^{Aa}
200	8	416±52 ^{Aa}	0,498±0,001 ^{Aab}	274±5 ^{Aa}	0,376±0,022 ^{Aa}	355±41 ^{Aab}	0,434±0,046 ^{Aa}
200	9	282±9 ^{Abc}	0,354±0,058 ^{Ac}	261±12 ^{Aa}	0,314±0,025 ^{Aa}	320±36 ^{Aab}	0,373±0,136 ^{Aa}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: compara diferenças entre composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl) para uma mesma razão de mistura de QBS e β -lg. Letras maiúsculas: compara diferenças entre razão de mistura de QBS e β -lg para uma mesma composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl).

De acordo com a Tabela 4, as emulsões apresentaram diâmetro médio de gota relativamente pequeno (z -médio < 500 nm), indicando que tanto as soluções puras quanto a mistura de QBS e β -lg foram efetivas em produzir gotas pequenas sob as condições avaliadas, o que pode ter favorecido a estabilidade das emulsões ao longo do período de armazenamento.

O diâmetro médio de gota da emulsão estabilizada pela mistura de QBS e β -lg não foi significativamente influenciado pelo pH nem pela concentração de NaCl de suas fases contínuas ($p > 0,05$). Por outro lado, o pH e a interação pH \times concentração de NaCl mostraram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre o diâmetro médio das gotas estabilizadas puramente por β -lg e por QBS, sendo ainda o efeito da concentração de NaCl significativo para emulsão de QBS ($p < 0,05$). Contudo, esses efeitos não apresentaram uma tendência de variação simples, visto que diversas composições (combinações de pH e concentração de NaCl) apresentaram diâmetros médios de gota estatisticamente semelhantes (Tabela 4).

De modo geral, observa-se que para emulsões de QBS, maior e menor diâmetro médio de gota (416 nm em 200 mmol L⁻¹ de NaCl pH 8 e 236 nm em pH 9 sem adição de NaCl) apresentaram menor e maior magnitude de potencial ζ (-21,4 mV e -86,6 mV), respectivamente. Esses resultados indicam que a formação de gotas menores por QBS provavelmente pode ter sido viabilizada pela maior carga superficial das gotas, uma vez que forças de repulsão eletrostática mais intensas podem ter reduzido o processo de recoalescência das gotas durante a homogeneização. Por outro lado, para emulsões de β -lg, gotas menores não apresentaram necessariamente maior magnitude de potencial ζ . Algumas das emulsões de menor diâmetro médio de gota exibiram baixa carga superficial, apresentando valores de potencial ζ (em módulo) menores do que 20 mV, condição de pouca estabilidade eletrostática (Müller *et al.*, 1996). Esse resultado indica que outras propriedades favoreceram a formação de gotas menores por β -lg, como a formação de interfaces viscoelásticas e a repulsão estérica, que são comuns às membranas recobertas por proteínas (McClements, 2004).

Os efeitos do pH e da concentração de NaCl da fase contínua não foram significativos ($p > 0,05$) na polidispersidade das emulsões, exceto para as estabilizadas puramente por QBS. Para essas emulsões, maiores valores

de PDI foram encontrados para formulações em pH 8 com adição de NaCl, enquanto menor polidispersidade foi observada na emulsão formulada em pH 9 sem a adição do sal. De modo geral, o grau de polidispersidade das emulsões de QBS está relacionado à carga superficial e ao tamanho das gotas, visto que emulsões menos polidispersas apresentaram maior repulsão eletrostática e menor diâmetro médio de gota, enquanto as mais polidispersas exibiram menor repulsão eletrostática entre as gotas e maior diâmetro médio de gota (Tabelas 3 e 4).

Quando considerado o tipo de emulsificante utilizado para formar as emulsões, a razão de mistura entre QBS e β -lg teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o diâmetro médio da gota e a polidispersidade das emulsões em apenas algumas das combinações de pH e concentração de NaCl, a saber: pH 9 sem adição de NaCl e com adição de 100 mmol L^{-1} para PDI e diâmetro médio de gota, e pH 7 com adição de 200 mmol L^{-1} NaCl para diâmetro médio de gota. Para essas condições, o diâmetro médio das gotas e a polidispersidade das emulsões estabilizadas puramente por β -lg foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) quando comparados aos parâmetros obtidos para as emulsões estabilizadas puramente por QBS e pela mistura de QBS e β -lg, cujos parâmetros da distribuição de tamanho não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Esse maior tamanho das gotas e, conseqüentemente, do PDI observados para as emulsões de β -lg sob essas composições podem estar associados à menor magnitude do potencial ζ das gotas quando comparada à magnitude do potencial ζ das emulsões de QBS, cujas magnitudes foram significativamente maiores ($p < 0,05$) (Tabela 3). Já para as demais composições de fase contínua (maioria das condições avaliadas), o diâmetro médio das gotas e o PDI das emulsões estabilizadas pelas soluções de QBS e de β -lg e por sua mistura não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos da análise de tamanho das gotas indicaram então que tanto as soluções quanto a mistura de QBS e β -lg apresentaram capacidade emulsificante semelhante, uma vez que produziram emulsões com diâmetro médio de gota estatisticamente iguais na maioria das condições de pH e concentração de NaCl avaliadas (Tabela 4). Sob as formulações em pH 9 sem adição de NaCl e com adição de 100 mmol L^{-1} de NaCl, e em pH 7

com adição de 200 mmol L⁻¹ NaCl, QBS e a mistura de QBS e β-Ig levaram à formação de gotas menores quando comparadas às formadas puramente por β-Ig, indicando maior capacidade emulsificante da QBS e da mistura nessas condições, o que no caso da mistura indica uma interação sinérgica entre a proteína e o biossurfactante sob tais condições de pH e concentração de NaCl.

Reologia

Do ponto de vista tecnológico, a reologia das dispersões é fundamental, principalmente devido à sua relação com a estabilidade de emulsões (Gallegos *et al.*, 2004). Assim, o comportamento de escoamento e a viscoelasticidade das emulsões foram analisados.

O comportamento de escoamento das emulsões foi descrito pelo modelo de Herschel Bulkley, o qual se ajustou adequadamente aos dados da curva de escoamento ($R^2 \geq 99\%$ e $MAPE < 12\%$). Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros estimados do modelo reológico bem como os valores de viscosidade aparente a uma taxa de deformação de 100 s⁻¹ (η_{100}), a qual é típica de processos como escoamento através de tubulações, agitação e mastigação (McClements, 2004).

Tabela 5. Viscosidade a 100 s^{-1} (η_{100}) e coeficientes do modelo de Herschel Bulkley (τ_0 – tensão inicial, k – índice de consistência e n – índice de comportamento) ajustado aos dados da curva de escoamento das emulsões estabilizadas por QBS e β -lg sob diferentes pH e concentração de NaCl determinados após homogeneização.

Razão de QBS e β -lg	Concentração de NaCl (mmol L ⁻¹)	pH	η_{100} (mPa.s)	k (mPa.s ⁿ)	n	τ_0 (mPa)
1:0	0	7	2,13±0,13 ^{Ac}	1,85±0,07 ^{Ba}	0,94±0,00 ^{Aa}	77,2±3,4 ^{Ba}
	0	8	2,64±0,10 ^{Aab}	2,26±0,33 ^{Aa}	0,91±0,02 ^{Aa}	118,8±15,4 ^{Aa}
	0	9	2,70±0,13 ^{Aab}	2,03±0,01 ^{Ba}	0,92±0,64 ^{Aa}	131,1±15,1 ^{Aa}
	100	7	2,97±0,02 ^{Aa}	2,00±0,00 ^{Aa}	0,94±0,04 ^{Aa}	143,4±4,2 ^{Aa}
	100	8	2,32±0,15 ^{Abc}	1,72±0,07 ^{Ca}	0,95±0,02 ^{Aa}	98,5±8,4 ^{Aa}
	100	9	2,12±0,02 ^{Bc}	1,79±0,32 ^{Ba}	0,95±0,02 ^{Aa}	87,5±7,4 ^{Aa}
	200	7	2,41±0,27 ^{Abc}	2,22±0,04 ^{Aa}	0,91±0,01 ^{Aa}	115,2±44,1 ^{Aa}
	200	8	2,59±0,00 ^{Aabc}	1,58±0,49 ^{Ba}	0,94±0,01 ^{Aba}	131,3±2,3 ^{Aa}
	200	9	2,51±0,00 ^{Aabc}	1,94±0,03 ^{Ba}	0,93±0,01 ^{Aa}	109,7±10,7 ^{Aa}
1:1	0	7	2,03±0,37 ^{Aa}	5,46±0,57 ^{Aa}	0,77±0,02 ^{Bd}	214,8±1,3 ^{Aa}
	0	8	2,40±0,01 ^{Aa}	2,63±0,14 ^{Ab}	0,89±0,01 ^{Ac}	96,4±18,4 ^{Ab}
	0	9	2,13±0,12 ^{Ba}	2,26±0,30 ^{Bb}	0,92±0,03 ^{Aabc}	69,4±7,6 ^{Bbc}
	100	7	2,02±0,18 ^{Ba}	2,10±0,02 ^{Ab}	0,93±0,00 ^{Aabc}	51,1±14,0 ^{Bc}
	100	8	2,09±0,23 ^{Aa}	2,36±0,12 ^{Bb}	0,91±0,01 ^{Abc}	62,5±18,9 ^{Abc}
	100	9	1,96±0,02 ^{Ca}	2,04±0,08 ^{Bb}	0,94±0,01 ^{ABab}	51,0±12,0 ^{Bc}
	200	7	1,98±0,00 ^{Aa}	2,57±0,37 ^{Ab}	0,91±0,01 ^{Abc}	52,3±1,2 ^{Abc}
	200	8	2,31±0,08 ^{Ba}	1,90±0,07 ^{Bb}	0,95±0,02 ^{Aba}	78,1±8,2 ^{Bbc}
	200	9	2,03±0,01 ^{Ba}	2,03±0,12 ^{Bb}	0,93±0,01 ^{Aabc}	51,8±3,3 ^{Bc}
0:1	0	7	1,81±0,06 ^{Ad}	2,52±0,11 ^{Bb}	0,90±0,00 ^{Aab}	24,6±0,6 ^{Cc}
	0	8	1,96±0,13 ^{Bcd}	2,85±0,02 ^{Ab}	0,89±0,01 ^{Aabc}	29,4±7,4 ^{Bc}
	0	9	2,11±0,03 ^{Bcd}	2,99±0,23 ^{Ab}	0,88±0,01 ^{Babc}	36,5±11,9 ^{Bbc}
	100	7	1,94±0,18 ^{Bcd}	2,53±0,23 ^{Ab}	0,91±0,01 ^{Aa}	28,4±10,1 ^{Bc}
	100	8	2,24±0,13 ^{Abc}	3,59±0,22 ^{Aab}	0,85±0,01 ^{Bbc}	37,6±2,1 ^{Bbc}
	100	9	2,64±0,01 ^{Aa}	4,25±0,82 ^{Aa}	0,84±0,03 ^{Bc}	72,9±1,5 ^{Aa}
	200	7	2,00±0,08 ^{Acd}	2,72±0,09 ^{Ab}	0,92±0,01 ^{Aa}	12,9±3,9 ^{Ac}
	200	8	2,20±0,06 ^{Bbc}	3,16±0,04 ^{Aab}	0,89±0,00 ^{Babc}	37,3±2,5 ^{Cbc}
	200	9	2,54±0,04 ^{Aab}	3,32±0,05 ^{Aab}	0,88±0,01 ^{Babc}	58,6±11,1 ^{Bab}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: compara diferenças entre composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl) para uma mesma razão de mistura de QBS e β -lg. Letras maiúsculas: compara diferenças entre razão de mistura de QBS e β -lg para uma mesma composição de fase contínua (pH e concentração de NaCl).

Conforme observado na Tabela 5, as emulsões exibiram comportamento de fluido pseudoplástico ($n < 1$). Esse comportamento, típico de interações associativas fracas (Maskan e Gogus, 2000), é comum à maioria das emulsões alimentícias (McClements, 2004) e polidispersas (Chanamai e McClements, 2000). Diversas razões podem levar à pseudoplasticidade das amostras, como, por exemplo, a alteração da distribuição espacial das gotas devido à aplicação de cisalhamento, a remoção de moléculas de solventes ligadas às gotas, o alinhamento de gotas não esféricas, ou a deformação e ruptura de flocos (Hunter, 1993).

Os valores de índice de comportamento (n) das emulsões estabilizadas por β -lg e pela mistura foram significativamente influenciados ($p < 0,05$) pelo pH e pela concentração de NaCl da formulação, sendo ainda o efeito de interação significativo para as emulsões mistas. Para as emulsões de β -lg, mantendo-se a concentração de NaCl fixa, o aumento no pH levou à diminuição nos valores de n , enquanto nenhuma tendência de variação simples foi observada quanto à variação na concentração de NaCl. Maiores valores de n foram observados em pH 7 com e sem adição de NaCl, já o menor valor foi obtido em pH 9 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl. Para as emulsões mistas não foi observada uma tendência de variação nos valores de n quando o pH da formulação aumentou, mas maior pseudoplasticidade foi observada quando NaCl não foi adicionado à formulação. Assim, menores valores de n foram obtidos em pH 7 e 8 sem adição do sal, enquanto maior valor de n foi obtido em pH 8 na presença de 200 mmol L⁻¹ de NaCl. Emulsões formadas apenas com QBS, por sua vez, não apresentaram variações significativas nos valores de n , uma vez que sua pseudoplasticidade não foi significativamente influenciada pelo pH ou pela concentração de NaCl ($p > 0,05$). A razão de mistura de QBS e β -lg também teve efeito significativo sobre os valores de n na maioria das condições de pH e concentração de NaCl avaliadas. Em geral, as emulsões estabilizadas puramente por QBS e por β -lg apresentaram menor e maior pseudoplasticidade, respectivamente.

O índice de consistência (k) é um indicador da natureza viscosa dos fluidos (Fonseca *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Ibãnescu *et al.*, 2010). Esse índice foi significativamente influenciado pelo pH e pela concentração de NaCl

quando as emulsões foram estabilizadas por β -lg e pela mistura de QBS e β -lg ($p < 0,05$). Para as emulsões de β -lg, o aumento no pH refletiu no aumento dos valores de k , assim como o aumento na concentração de NaCl, especialmente em valores de pH mais elevados. Por outro lado, os efeitos sobre a consistência das emulsões mistas foram diferentes. A adição de NaCl e o aumento no pH diminuíram os valores de k das emulsões mistas. Já a consistência das emulsões de QBS não sofreu influência significativa do pH nem da concentração de NaCl ($p > 0,05$). Para a maioria das condições de pH e concentração de NaCl avaliadas, a razão de mistura de QBS e β -lg influenciou significativamente os valores de k das emulsões ($p < 0,05$). Para a maioria dessas condições, as emulsões mistas e as de QBS apresentaram consistências significativamente semelhantes, enquanto as emulsões de β -lg foram significativamente mais consistentes do que essas ($p < 0,05$). Assim, espera-se que as emulsões estabilizadas pela proteína sejam mais estáveis, visto que a maior consistência do sistema reduz a mobilidade das gotas e, conseqüentemente, a instabilidade do sistema.

A tensão inicial tem sido interpretada como a tensão a ser excedida a fim de fazer um fluido estruturado fluir, sendo assim um fator relevante em diversos processos industriais, como o bombeamento, espalhamento e revestimento (Steffe, 1996). A presença da tensão inicial pode, contudo, ser desejável em alguns produtos, quando se deseja manter as partículas suspensas no meio. Assim, a presença de uma pequena tensão inicial (τ_0), capaz de oferecer resistência ao escoamento a baixas deformações, pode favorecer a estabilidade das emulsões. Os valores de τ_0 das emulsões estabilizadas pela mistura e por β -lg foram significativamente influenciados pelo pH, pela concentração de NaCl e pela interação desses ($p < 0,05$). Os efeitos desses fatores foram, de certa forma, similares aos observados para o índice de consistência. Assim, maiores valores de τ_0 e k foram observados em valores de pH mais básicos e concentração de NaCl mais elevada para as emulsões de β -lg, e em pH 7 sem adição de NaCl para a emulsão mista. Para essas emulsões espera-se uma menor mobilidade da gota e, assim, uma maior estabilidade. Já as emulsões de QBS não tiveram seus valores de τ_0 significativamente influenciados pelo pH ou pela concentração de NaCl da fase contínua ($p > 0,05$). O efeito da razão de mistura de QBS e β -lg foi

significativo sobre os valores de τ_0 ($p < 0,05$) em todas as condições de pH e concentração de NaCl, exceto pH 7 com 200 mmol L⁻¹ de NaCl. Para a maioria das combinações de pH e concentração de NaCl, maiores e menores valores de τ_0 foram obtidos pelas emulsões estabilizadas por QBS e β -lg, (Tabela 5).

Dados de viscosidade aparente a 100 s⁻¹ também são apresentados na Tabela 5. Esse parâmetro reológico permite comparações mais seguras entre as amostras, uma vez que seus valores independem do ajuste de modelo. Os valores de η_{100} das emulsões mistas não foram influenciados significativamente pelo pH ou pela concentração de NaCl ($p > 0,05$). Já as emulsões de β -lg tiveram seus valores de viscosidade aparente significativamente afetados pela concentração de NaCl e pelo pH da fase contínua ($p < 0,05$). Para essas emulsões, variações similares às apresentadas para tensão inicial e índice de consistência foram observadas, de forma que maiores valores para esses parâmetros foram observados em pH 9 com adição de NaCl, indicando a formação de emulsões mais estruturadas, o que está de acordo com a análise do espectro mecânico dessas emulsões. Com relação às emulsões de QBS, apenas o efeito da interação pH \times concentração de NaCl foi significativo ($p < 0,05$). Quando em pH 7, os valores de η_{100} aumentaram com a adição de NaCl, enquanto em pH 8 e 9 o oposto foi verificado. Apenas para as formulações com 100 mmol L⁻¹ de NaCl os valores de η_{100} diminuíram com o aumento do pH.

Para as emulsões estabilizadas por QBS e por β -lg, separadamente, é possível observar a seguinte relação entre a viscosidade e o diâmetro de gota: emulsões com menor diâmetro médio de gota foram mais viscosas do que as emulsões com gotas maiores. O aumento na viscosidade com a diminuição do tamanho da gota pode ter ocorrido devido ao aumento na interação hidrodinâmica entre as gotas, uma vez que, sob uma fração de volume de fase dispersa fixa, a distância de separação entre as gotas diminui com a diminuição de seu tamanho, o que se espera aumentar a interação hidrodinâmica (Pal, 2000). Simultaneamente, a maior viscosidade das emulsões pode ter favorecido a formação de gotas menores ao reduzir a mobilidade das gotas, limitando a colisão e, conseqüentemente, a agregação e recoalescência das mesmas durante a homogeneização. Essa relação entre

viscosidade aparente e diâmetro médio de gota não foi observada para a emulsão mista, uma vez que a viscosidade aparente e o diâmetro médio de gota obtidos em diferentes condições de pH e concentração de NaCl não diferiram significativamente (Tabelas 4 e 5). Assim como para os demais parâmetros reológicos, a razão de mistura de QBS e β -lg influenciou significativamente os valores de η_{100} ($p < 0,05$) na maioria das condições de pH e concentração de NaCl avaliadas. Em geral, maiores valores de η_{100} foram observados para as emulsões de QBS.

As características viscoelásticas das emulsões também foram determinadas. Espectros mecânicos obtidos por reologia dinâmica são uma das medidas mais utilizadas para avaliar o comportamento viscoelástico de uma amostra, pois seus resultados são muito sensíveis à composição química e à estrutura física (Steffe, 1996). Varreduras oscilatórias de frequência foram então realizadas empregando-se deformações dentro do intervalo de viscoelasticidade linear para a obtenção dos espectros mecânicos das emulsões. Dados dos módulos viscoelásticos dos espectros mecânicos foram considerados até 3 Hz (Figura 1), pois a partir dessa frequência foi verificado deslizamento das amostras.

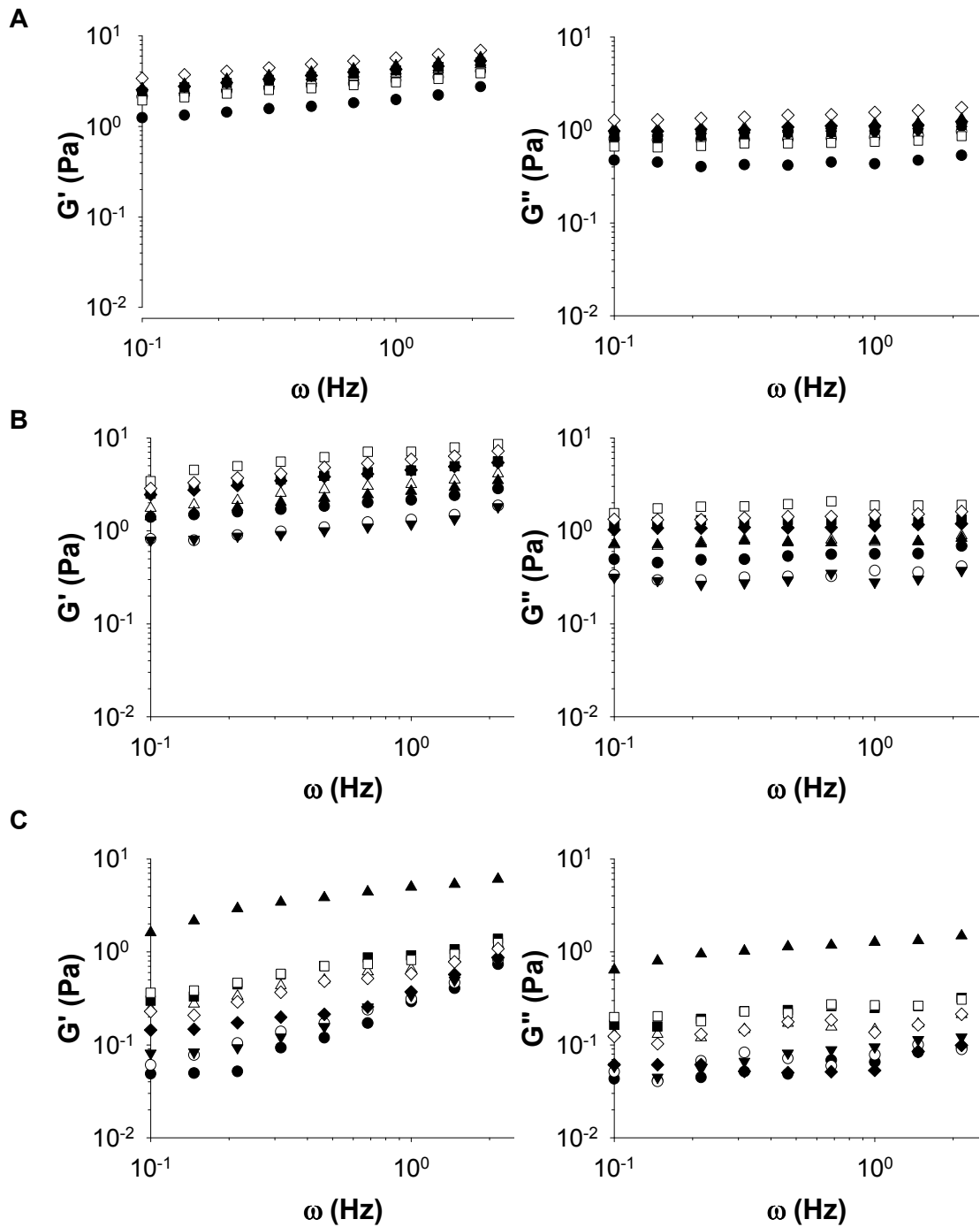


Figura 1. Variação dos módulos elásticos (G') e viscosos (G'') em função da frequência de oscilação (ω) das emulsões estabilizadas pelas misturas QBS: β -LG de razão 1:0 (A), 1:1 (B) e 0:1 (C) sob as seguintes condições: pH 7 e 0 mmol L⁻¹ NaCl (●), pH 8 e 0 mmol L⁻¹ NaCl (○), pH 9 e 0 mmol L⁻¹ NaCl (▼), pH 7 e 100 mmol L⁻¹ NaCl (Δ), pH 8 e 100 mmol L⁻¹ NaCl (■), pH 9 e 100 mmol L⁻¹ NaCl (□), pH 7 e 200 mmol L⁻¹ NaCl (◆), pH 8 e 200 mmol L⁻¹ NaCl (◇), e pH 9 e 200 mmol L⁻¹ NaCl (▲).

De maneira geral, pela análise do espectro mecânico das emulsões é possível observar que os valores de G' foram maiores do que os de G'' , mostrando comportamento predominantemente elástico. As emulsões apresentaram estrutura semelhante à de um gel fraco, uma vez que os módulos dinâmicos apresentaram uma ligeira dependência da frequência de oscilação e não se interceptaram ($G' \neq G''$ em todo intervalo de frequência) e a relação G'/G'' mostrou valores sempre entre 1 e 10 (Steffe, 1996). Géis fracos não são géis verdadeiros, mas sim “líquidos estruturados” (Tokita e Nishinari, 2009), os quais escoam quando submetidos a altas deformações (ensaio de escoamento) (Ikeda e Nishinari, 2001) como observado no presente estudo.

Independente da razão de mistura de QBS e β -LG e das condições da fase contínua (pH e concentração de NaCl), os pequenos valores dos módulos viscoelásticos indicaram que as emulsões apresentaram estruturas frágeis. Valores de G' e G'' maiores e menor dependência desses com a frequência foram observados para as emulsões de QBS, enquanto módulos viscoelásticos menores e maior dependência com a frequência foram observados para emulsões de β -lg. Emulsões mistas apresentaram módulos viscoelásticos e dependência com a frequência intermediários, sendo seus resultados mais próximos aos das emulsões de QBS do que de β -lg. Esses resultados indicam que as emulsões de QBS apresentaram estrutura tridimensional mais elástica e levemente mais estruturada do que as emulsões de β -lg, o que está de acordo com os maiores e menores valores de tensão inicial obtidos para emulsões de QBS e de β -lg, respectivamente.

As emulsões estabilizadas por diferentes razões de QBS e β -lg tiveram seus módulos viscoelásticos influenciados de formas distintas pelas condições da fase contínua. Menor influência de pH e concentração de NaCl parece ter sido exercida sobre os módulos viscoelásticos das emulsões de QBS, os quais apresentaram valores mais próximos entre si, indicando que a estrutura das emulsões de QBS formuladas em diferentes pH e concentração de NaCl foi semelhante. Por outro lado, os módulos viscoelásticos das emulsões de β -lg aparentam ter sofrido maior influência das condições da fase contínua, uma vez que seus valores variaram mais, indicando que as estruturas dessas emulsões não foram tão similares.

De acordo com os espectros mecânicos obtidos, as emulsões podem ser consideradas estáveis, uma vez que os valores de G' foram superiores aos de G'' e ambos os módulos mantiveram-se quase paralelos ao longo das frequências avaliadas (Mezger, 2006). Essa estabilidade foi reforçada pela predominância do módulo G' a baixas frequências, o que indica que as emulsões apresentam certa estabilidade a longo prazo (Mezger, 2006), o que está de acordo com a análise de estabilidade realizada. No entanto, a dependência do módulo G' com a frequência indica que alguma cremação pode ocorrer durante longos períodos de armazenamento (Mezger, 2006). Assim, de acordo com a Figura 1, as emulsões de β -lg mostraram-se mais propícias a eventual cremação uma vez que o módulo elástico dessas apresentou maior dependência com a frequência quando comparado aos módulos das emulsões de QBS e mistas.

3.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES ESTABILIZADAS POR QBS E β -LG

A habilidade emulsificante das misturas de QBS e β -lg também foi avaliada em termos da estabilidade física das emulsões resultantes. A estabilidade da emulsão refere-se à sua habilidade de resistir a variações em suas propriedades ao longo do tempo (Camino *et al.*, 2011). Uma estimativa aproximada da estabilidade física das emulsões pode ser feita a partir da avaliação visual do desenvolvimento da cremação ao longo do armazenamento (Eccleston, 2013).

De acordo com a avaliação visual das emulsões (Figura 2) observou-se a presença de uma fina camada na parte superior, proveniente da espuma gerada durante o processo de homogeneização, e um aumento gradativo da intensidade da cor rosa ao longo do eixo vertical das amostras, sendo a coloração ligeiramente mais intensa na parte superior. A formação de espuma ocorreu devido ao fato de que ambos os emulsificantes utilizados (QBS e β -lg) são também agentes formadores de espuma (Oakenfull, 1981; Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007; Stanimirova *et al.*, 2011; Golemanov *et al.*, 2012; Piotrowski *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Essa formação de espuma também

foi verificada em outros estudos reportados na literatura, como no trabalho de Yang e colaboradores (2013), ao estudarem o encapsulamento de vitamina E em emulsões estabilizadas por saponina de *Quillaja*, e no trabalho de Piotrowski e colaboradores (2012), ao estudarem misturas de QBS e β -lg em interfaces ar-água e óleo-água.

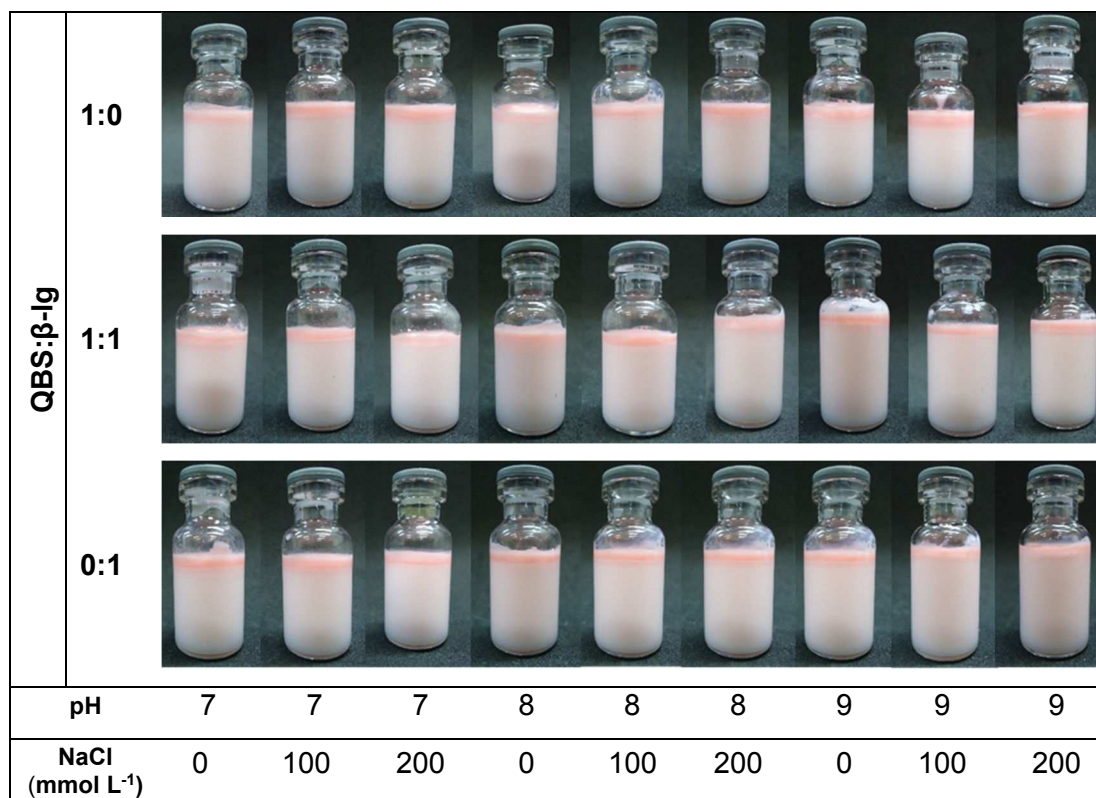


Figura 2. Aparência visual das emulsões O/A estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg nas razões molares 1:0, 1:1 e 0:1 em diferentes condições de pH e concentração de NaCl 7 dias de armazenamento a 25 °C.

O gradiente de cor observado ao longo do comprimento dos frascos contendo as emulsões está relacionado à heterogeneidade de tamanho das gotas (confirmada pelos valores elevados de PDI da Tabela 4), o que levou a diferentes velocidades de cremação devido aos diferentes tamanhos das gotas presentes. Assim, gotas maiores e eventuais flocos que possam ter se formados moveram-se para cima mais rapidamente, intensificando a cor rosa na parte superior das emulsões devido à maior concentração de gotas de óleo vermelho nessa região. Por outro lado, gotas menores devem ter permanecido dispersas na parte inferior, o que resultou na coloração menos intensa nessa

área. Esse gradiente de cor ao longo do eixo vertical indica, portanto, a ocorrência de um rearranjo espacial das gotas dentro das emulsões durante o período de armazenamento. No entanto, conforme observado na Figura 2, em nenhuma das emulsões avaliadas foi observada a separação em duas fases distintas e bem definidas. Consequentemente, o índice de separação de fases foi nulo e as emulsões mostraram-se estáveis frente à separação de fase.

A evolução do tamanho da gota com o tempo é um dos principais parâmetros para caracterizar a estabilidade das emulsões, pois fenômenos de instabilidade afetam ou são afetados pelo tamanho das gotas (McClements, 2004). Desta forma, a estabilidade física das emulsões foi avaliada não somente em termos do índice de separação de fases, mas também pela evolução do tamanho médio das gotas e do potencial ζ após o período de armazenamento. Como as emulsões não se apresentaram homogêneas quanto à distribuição espacial das gotas de diferentes tamanhos (como verificado pela presença do gradiente de cor ao longo da vertical) e os resultados da análise de tamanho de gota dependem do local onde a amostra é selecionada, alíquotas foram coletadas nas partes superior (abaixo da camada resultante da espuma) e inferior, bem como no meio dos frascos. Os resultados obtidos pelas análises de distribuição de tamanho e de carga superficial após o armazenamento são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Diâmetro médio de gota (z-médio), índice de polidispersidade (PDI) e potencial ζ das emulsões estabilizadas pelas misturas de QBS e β -lg em diferentes pH e concentrações de NaCl após 7 dias de armazenamento a 25 °C.

Concentração de NaCl (mmol L ⁻¹)	pH	1:0 (QBS: β -lg)			1:1 (QBS: β -lg)			0:1 (QBS: β -lg)		
		z-médio (nm)	PDI	ζ (mV)	z-médio (nm)	PDI	ζ (mV)	z-médio (nm)	PDI	ζ (mV)
0	7	258±4 [†]	0,282±0,004	-77,5±0,2	358±9	0,470±0,040	-71,0±0,1	355±65	0,447±0,031	-56,8±1,2
0	8	274±6 [†]	0,335±0,009	-80,0±0,6	336±22	0,437±0,008	-72,8±0,2	427±69	0,553±0,021	-61,0±5,2
0	9	330±32	0,411±0,024	-84,8±1,0	334±40	0,431±0,018	-76,3±0,8	322±7 [†]	0,417±0,031	-71,9±0,7
100	7	283±7 [†]	0,305±0,001	-30,7±0,9	421±119	0,465±0,065	-28,8±0,1	528±7	0,588±0,033	-21,2±0,2
100	8	416±4	0,485±0,019	-29,2±0,1	344±85	0,450±0,073	-29,0±0,1	252±34 [†]	0,289±0,095	-29,0±0,3
100	9	311±51	0,376±0,042	-30,6±0,4	315±12	0,425±0,001	-29,6±0,8	320±31 ^{†*}	0,460±0,088	-25,4±0,3
200	7	284±21	0,349±0,052	-21,0±0,6	251±22 [†]	0,307±0,069	-20,1±0,3	440±37 [†]	0,465±0,004	-18,6±0,7
200	8	425±42	0,448±0,016	-22,0±0,3	439±150	0,490±0,096	-20,0±0,1	358±7	0,414±0,037	-17,9±5,4
200	9	273±12 [†]	0,352±0,036	-23,0±0,7	348±16 [*]	0,431±0,010	-24,3±0,8	297±3 [†]	0,304±0,003	-19,2±0,7

* Diâmetros médios após o armazenamento que diferiram significativamente dos respectivos diâmetros médios iniciais de acordo com o teste t pareado ($p < 0,05$).

[†] Diâmetros que diminuíram após armazenamento.

Pequenas variações na carga superficial das gotas foram observadas após 7 dias de armazenamento, o que sugere que a camada de emulsificantes adsorvida na superfície da gota sofreu alguma modificação com o tempo, como por exemplo alguma reorientação de moléculas. Quanto à análise de tamanho, assim como na determinação da distribuição de tamanho de gota após a homogeneização, todas as emulsões apresentaram curva de distribuição multimodal após o armazenamento (dados não apresentados) e permaneceram polidispersas (Tabela 6).

Pela análise dos diâmetros médios após o armazenamento seria de se esperar que as variações no tamanho de gota, quando ocorressem, fossem sempre positivas. No entanto, algumas variações foram negativas, indicando que as gotas surpreendentemente diminuíram de tamanho após o armazenamento.

Essa diminuição no diâmetro médio das gotas de algumas das emulsões avaliadas pode possivelmente ser atribuída às seguintes suposições:

- (i) gotas maiores e possíveis flocos formados durante o armazenamento podem ter cremeado rapidamente, movendo-se para a parte superior da cubeta de medição do equipamento, ficando fora do alcance do *laser*. Conseqüentemente, apenas as gotas menores foram detectadas e medidas;
- (ii) flocos compostos por gotas fracamente ligadas podem ter sido parcialmente dissociados antes da análise de dimensionamento de partícula, uma vez que as amostras avaliadas após o armazenamento foram mais diluídas do que as avaliadas após homogeneização.
- (iii) uma vez que as emulsões foram polidispersas, diferentes taxas de coalescência podem ter ocorrido. Como as gotas médias e maiores coalescem mais rapidamente do que as menores, gotas médias e grandes tornaram-se maiores e menos numerosas, enquanto gotas menores ainda não coalesceram e tornam-se mais numerosas em relação às gotas maiores (Jafari *et al.*, 2012).

Assim, de acordo com qualquer uma das suposições, a redução de tamanho da gota após o armazenamento está relacionada a mecanismos de instabilidade que podem ter sido favorecidos pela menor intensidade da repulsão eletrostática entre as gotas, uma vez que a maioria dessas emulsões exibiram valores, em módulo, de potencial ζ inferiores a 30 mV, valor limite para que as emulsões sejam consideradas moderadamente estáveis (Malvern Zetasizer, 2014).

Outras situações envolvendo a diminuição do tamanho de gota foram também encontradas na literatura, como verificado por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz de emulsões de tetradecano em água estabilizadas puramente por QBS e por sua mistura com β -lg (Piotrowski *et al.*, 2012), e de emulsões de azeite de oliva em água estabilizadas somente por QBS e por suas misturas com β -caseína (Wojciechowski *et al.*, 2014).

Das variações de tamanho de gota (positivas ou negativas) observadas no presente estudo, apenas aquelas correspondentes à emulsão mista em pH 9 e 200 mmol L⁻¹ NaCl e à emulsão de β -lg em pH 9 e 100 mmol L⁻¹ foram significativas de acordo com o teste t de comparação pareada ($p < 0,05$).

Segundo Tcholakova e colaboradores (2006), a estabilidade de emulsões estabilizadas por proteínas globulares do leite em pH > 6 e baixa concentração de eletrólito (≤ 50 mmol L⁻¹) é governada principalmente por forças de van der Waals e eletrostática de longo alcance. Sob essas condições, a repulsão eletrostática provavelmente mantém as moléculas de proteína absorvidas a certa distância uma das outras e não permite a formação de ligações covalentes e não covalentes dentro da camada adsorvida nem entre as camadas de gotas vizinhas. Assim, a estabilidade da emulsão não varia significativamente com o tempo (Tcholakova *et al.*, 2006), como verificado no presente estudo. Sob a adição de NaCl porém, a estabilidade eletrostática provavelmente diminuiu devido à menor magnitude do potencial ζ das emulsões nessa condição (Tabela 6). Ainda de acordo com Tcholakova e colaboradores (2006), em alta concentração de proteína e eletrólito ($\geq 0,1$ % m/m e ≥ 100 mmol L⁻¹, respectivamente) a estabilidade está relacionada à repulsão estérica conferida pela adsorção em camadas sobrepostas. Contudo, deve-se destacar que emulsões estabilizadas por proteínas globulares são geralmente resistentes à coalescência devido à

formação de uma forte interface viscoelástica, a qual é capaz de resistir a tensões tangenciais que iniciam a ruptura do filme interfacial (McClements, 2004; Tcholakova *et al.*, 2006). Assim, a agregação e, conseqüentemente, a coalescência das gotas estabilizadas por β -lg foram provavelmente prevenidas pela formação de uma forte interface viscoelástica, bem como pelas repulsões eletrostática e estérica quando as emulsões foram formuladas sem e com a adição de NaCl, respectivamente.

Para as emulsões de QBS, tanto a repulsão eletrostática quanto a repulsão estérica são importantes para manter a estabilidade das emulsões contra a agregação (Yang *et al.*, 2013). De acordo com Yang e colaboradores (2013), em baixa concentração de sal a força eletrostática de longo alcance é forte o suficiente para prevenir a agregação, mas quando a concentração de sal aumenta, as forças atrativas de longo alcance (forças de van der Waals) sobressaem, levando à agregação das gotas. No entanto, a repulsão estérica de curto alcance entre as gotas parece ser forte suficiente para evitar que essas se aproximem a ponto de se fundirem e coalescerem (Yang *et al.*, 2013). Essa importante contribuição do efeito estérico para a estabilização das gotas revestidas por QBS é atribuída à presença de grandes grupos laterais constituídos por moléculas de açúcares que se estendem dentro a fase aquosa (Ikeda *et al.*, 1996; Stanimirova *et al.*, 2011; Maier *et al.*, 2014). Deve-se ressaltar que embora a QBS utilizada não fosse de elevado grau de pureza (apenas 32 % de saponina presente no extrato), supõe-se que seja a saponina a principal responsável pela formação e estabilização das emulsões, pois Stanimirova e colaboradores (2011) verificaram que as propriedades de superfície de extratos de saponina não purificados são governadas pelas moléculas de saponina, enquanto outros componentes extraídos (proteínas, polissacarídeos e polifenóis) têm importância secundária sobre essas propriedades.

Emulsões mistas de QBS e β -lg mantiveram-se estáveis em praticamente todas as condições de pH e concentração de NaCl avaliadas, uma vez que o diâmetro médio das gotas não variou significativamente com o tempo e apenas uma das condições de pH e concentração de NaCl resultou em encolhimento da gota (o que provavelmente está relacionado a mecanismos de instabilidade). Os mecanismos de estabilização apresentados

pelas emulsões mistas são muito provavelmente os mesmos que os apresentados pelas emulsões estabilizadas por seus componentes puros. Nesse caso, a agregação provavelmente foi prevenida pela forte repulsão estérica entre as gotas, uma vez que tanto a proteína quanto o surfactante apresentam essa característica quando adsorvidos na interface, e adicionalmente pela forte repulsão eletrostática entre as gotas, principalmente quando formuladas sem adição de NaCl, quando a magnitude do potencial ζ é bastante elevada ($|\text{potencial } \zeta| > 70 \text{ mv}$).

De modo geral, os resultados mostraram que tanto as emulsões estabilizadas puramente por QBS e β -lg quanto por sua mistura exibiram boa estabilidade quando armazenadas por 7 dias a 25 °C, não exibindo separação de fases e, em sua maioria, sem variações significativas no tamanho de gota com o tempo. Contudo, se considerarmos as variações de tamanho de gota negativas como indícios de instabilidade, pode-se dizer que as emulsões mistas apresentaram maior estabilidade quando comparadas às emulsões de QBS e de β -lg. Esse resultado revela um efeito sinérgico entre a proteína e o biossurfactante, que juntos foram mais eficientes em estabilizar emulsões O/A sob as condições avaliadas. Emulsões mistas e de β -lg exibiram características que influenciam na estabilidade (como diâmetro de gota, índice de polidispersidade e viscosidade) muito semelhantes, o que pode indicar que a repulsão eletrostática ligeiramente mais intensa entre as gotas das emulsões mistas pode ter sido um dos fatores cruciais para sua maior estabilidade quando comparada às emulsões de β -lg.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a habilidade emulsificante de QBS e β -lg isoladamente e em misturas sob condições básicas (pH 7, 8 e 9) na presença de baixa concentração de NaCl ($< 200 \text{ mmol L}^{-1}$). Todas as condições avaliadas levaram à formação de emulsões polidispersas, com distribuição de tamanho de gota multimodal. No entanto, gotas relativamente pequenas (diâmetro médio $< 500 \text{ nm}$) foram formadas, o que indicou que tanto as soluções quanto a mistura foram efetivas em produzir gotas pequenas sob as

condições avaliadas, além de ter favorecido a estabilidade das emulsões. Independente da razão de QBS e β -lg utilizada para formar as emulsões, o comportamento ao escoamento foi caracterizado por baixa pseudoplasticidade, com presença de pequena tensão inicial e baixa viscosidade aparente. As emulsões apresentaram também comportamento viscoelástico típico de gel fraco. O pH e a concentração de NaCl influenciaram as propriedades físicas das emulsões de formas distintas, dependendo da razão de mistura de QBS e β -lg utilizada. Efeitos significativos desses fatores foram verificados para a carga superficial, diâmetro médio de gota e viscosidade aparente das emulsões estabilizadas por QBS e por β -lg, separadamente, e para os coeficientes do modelo reológico de Herschel Bulkley das emulsões mistas e de β -lg. A razão de mistura de QBS e β -lg utilizada também mostrou efeito significativo sobre as propriedades das emulsões. Em geral, maiores valores de potencial ζ (em módulo), viscosidade aparente, tensão inicial e índice de comportamento foram obtidos para emulsões estabilizadas puramente por QBS. O diâmetro médio de gota não foi influenciado pela razão de mistura de QBS e β -lg em grande parte das combinações de pH e concentração de NaCl avaliadas. As emulsões mostraram-se estáveis à separação de fases e com pequenas variações de tamanho de gota durante o armazenamento. Mecanismos de repulsão estérica e eletrostática mostraram-se importantes para conferir estabilidade às diferentes emulsões. Quando comparadas, tanto as soluções de QBS e de β -lg quanto sua mistura apresentaram desempenho equivalente na formação de emulsões com gotas pequenas sob as condições avaliadas, no entanto, a mistura de QBS e β -lg parece ter conferido melhor estabilidade às emulsões quando comparada a seus componentes puros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOTTOMLEY, R. C. E.; M. T. A.; PARKINSON, D. J. . (1990). Whey proteins. In P. HARRIS (Ed.), *Food Gels* (pp. 435-466). London/New York: Elsevier Applied Science,.
- CAMINO, N. A.; SÁNCHEZ, C. C.; RODRÍGUEZ PATINO, J. M.; PILOSO, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 1-11.
- CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D. J. (2000). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172(1–3), 79-86.
- CHEFTEL, J.-C. CUQ, J.-L. LORIENT, D. (1992). *Protéines alimentaires biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques*. Paris: Technique et documentation-Lavoisier.
- DEPREE, J. A.; SAVAGE, G. P. (2001). Physical and flavour stability of mayonnaise. *Trends in Food Science & Technology*, 12(5–6), 157-163.
- DICKINSON, E. (1998). Proteins at interfaces and in emulsions Stability, rheology and interactions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 94(12), 1657-1669.
- DICKINSON, E.; MILLER, R.; CHEMISTRY, R. S. O. (2001). *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*: Royal Society of Chemistry.
- ECCLESTON, G. M. (2013). Emulsions and Creams In M. E. a. T. Aulton, K. M. G. (Ed.), *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines* (4 edition ed.; pp. 908): Churchill Livingstone/Elsevier.
- FONSECA, V. C.; HAMINIUK, I. W. C.; IZYDORO, R. D.; WASZCZYNSKYJ, N.; SCHEER, A. P.; SIERAKOWSKI, M.-R. (2009). Stability and rheological behaviour of salad dressing obtained with whey and different combinations of stabilizers. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 777-783.
- GALLEGOS, C.; FRANCO, J.M. & PARTAL, P. (2004). Rheology of food dispersions. The British Society of rheology, pp19 – 65.
- GEE, J. M.; WAL, J. M.; MILLER, K.; ATKINSON, H.; GRIGORIADOU, F.; WIJNANDS, M. V. W.; PENNINKS, A. M.; WORTLEY, G.; JOHNSON,

- I. T. (1997). Effect of saponin on the transmucosal passage of β -lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and β -lactoglobulin-sensitized rats. *Toxicology*, 117(2–3), 219-228.
- GOLEMANOV, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N.; PELAN, E.; STOYANOV, S. D. (2012). Surface Shear Rheology of Saponin Adsorption Layers. *Langmuir*, 28(33), 12071-12084.
- GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231-258.
- HONG, Y.-H.; MCCLEMENTS, D. J. (2007). Formation of Hydrogel Particles by Thermal Treatment of β -Lactoglobulin–Chitosan Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5653-5660.
- HOSTETTMANN, K. M. A. (1995). *Saponins*. Cambridge; New York: Cambridge University Press.
- HUNTER, R. J. (1993). *Introduction to Modern Colloid Science*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- HUNTER, R. J.; WHITE, L. R. (1987). *Foundations of colloid science*: Clarendon Press.
- IBĂNESCU, C.; DANUU, M.; NANU, A.; LUNGU, M.; SIMIONESCU, B. C. (2010). Stability of disperse systems estimated using rheological oscillatory shear tests. *Revue Roumaine de Chimie*, 55, 933-940.
- IKEDA, S.; NISHINARI, K. (2001). "Weak-gel" type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated r-carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4436-4441.
- IKEDO, S.; SHIMOYAMADA, M.; WATANABE, K. (1996). Interaction between Bovine Serum Albumin and Saponin As Studied by Heat Stability and Protease Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 792-795.
- JAFARI, S.; HE, Y.; BHANDARI, B. (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 733-741.
- JAFARI, S. M.; BEHESHTI, P.; ASSADPOOR, E. (2012). Rheological behavior and stability of d-limonene emulsions made by a novel hydrocolloid

(Angum gum) compared with Arabic gum. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 1-8.

KEZWON, A.; WOJCIECHOWSKI, K. (2014). Interaction of *Quillaja* bark saponins with food-relevant proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209(0), 185-195.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(3), 187-201.

KOTSMAR, C.; GRIGORIEV, D. O.; XU, F.; AKSENEKO, E. V.; FAINERMAN, V. B.; LESER, M. E.; MILLER, R. (2008). Equilibrium of Adsorption of Mixed Milk Protein/Surfactant Solutions at the Water/Air Interface. *Langmuir*, 24(24), 13977-13984.

KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. (2009). Surfactants Used in Food Industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363-1383.

LOSSO, J. N.; NAKAI, S. (2002). Stabilization of Oil-in-Water Emulsions by β -Lactoglobulin-Polyethylene Glycol Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1207-1212.

MAIER, C.; ZEEB, B.; WEISS, J. (2014). Investigations into aggregate formation with oppositely charged oil-in-water emulsions at different pH values. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117(0), 368-375.

MALVERN (2007). *Malvern Instruments Zetasizer Nano User Manual*, Issue 1.1. UK: Worcestershire.

MALVERN ZETASIZER (2014). Zeta potential: an introduction in 30 minutes. Disponível em: <<http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/zeta.pdf>>. Acessado em 30 de janeiro de 2014.

MASKAN, M.; GOGUS, F. (2000). Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil-water emulsions. *Journal of Food Engineering*, 43(3), 173-177.

MCCLEMENTS, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition*: Taylor & Francis.

- MCCLEMENTS, D. J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611-649.
- MEZGER, T. G. (2006). *The Rheology Handbook: For Users of Rotational and Oscillatory Rheometers*: Vincentz Network.
- MITRA, S.; DUNGAN, S. R. (1997). Micellar Properties of *Quillaja* Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt, and pH on Solution Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1587-1595.
- MÜLLER, R. H.; NITZSCHE, R.; PAULKE, B.-R.. (1996) *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis: Einführung in die Theorie, praktische Messdurchführung, Dateninterpretation; Colloidal drug carriers (cdc) 1st expert meeting Berlin 15. - 17. 6 1995 ; mit 24 Tabellen*. Wiss. Verlag-Ges.
- MYERS, D. (1999). *Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications*: Wiley-VCH.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.
- NORD, L. I.; KENNE, L. (1999). Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research*, 320(1–2), 70-81.
- PAL, R. (2000) Shear Viscosity Behavior of Emulsions of Two Immiscible Liquids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 225, 359-366.
- PASHLEY, R. M.; KARAMAN, M. E. (2004). *Applied Colloid and Surface Chemistry*. Nova York: John Wiley & Sons. 188 p.
- PIOTROWSKI, M.; LEWANDOWSKA, J.; WOJCIECHOWSKI, K. (2012). Biosurfactant–Protein Mixtures: *Quillaja* Bark Saponin at Water/Air and Water/Oil Interfaces in Presence of β -Lactoglobulin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(16), 4843-4850.
- OAKENFULL, D. (1981). Saponins in food—A review. *Food Chemistry*, 7(1), 19-40.
- ONSAARD, E.; VITTAYANONT, M.; SRIGAM, S.; MCCLEMENTS, D. J. (2005). Properties and Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Coconut Skim Milk Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5747-5753.

- PIOTROWSKI, M.; LEWANDOWSKA, J.; WOJCIECHOWSKI, K. (2012). Biosurfactant–Protein Mixtures: *Quillaja* Bark Saponin at Water/Air and Water/Oil Interfaces in Presence of β -Lactoglobulin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(16), 4843-4850.
- SARKAR, A.; GOH, K. K. T.; SINGH, R. P.; SINGH, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1563-1569.
- SHIMOYAMADA, M.; OOTSUBO, R.; NARUSE, T.; WATANABE, K. (2000). Effects of Soybean Saponin on Protease Hydrolyses of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(4), 891-893.
- STANIMIROVA, R.; MARINOVA, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; STOYANOV, S.; PELAN, E. (2011). Surface Rheology of Saponin Adsorption Layers. *Langmuir*, 27(20), 12486-12498.
- STEFFE, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*: Freeman Press.
- TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; IVANOV, I. B.; CAMPBELL, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126(0), 259-293.
- TOKITA, M.; NISHINARI, K. (2009). *Gels: Structures, Properties, and Functions: Fundamentals and Applications*: Springer Berlin Heidelberg.
- VERHEUL, M.; PEDERSEN, J. S.; ROEFSS, S. P.; De KRUIF, K. G. (1999). Association behavior of native beta-lactoglobulin. *Biopolymers*, 49(1), 11-20.
- WALSTRA, P. (1983). Formation of emulsions. In P. BECHER (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology* (v. 1, pp. 87-127). New York and Basel: Marcel Dekker.
- WOJCIECHOWSKI, K. (2013). Surface activity of saponin from *Quillaja* bark at the air/water and oil/water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 95-102.
- WOJCIECHOWSKI, K.; KEZWON, A.; LEWANDOWSKA, J.; MARCINKOWSKI, K. (2014). Effect of β -casein on surface activity of *Quillaja* bark saponin at fluid/fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 34(0), 208-216.

- WOJCIECHOWSKI, K.; PIOTROWSKI, M.; POPIELARZ, W.; SOSNOWSKI, T. R. (2011). Short- and mid-term adsorption behaviour of *Quillaja* Bark Saponin and its mixtures with lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 687-693.
- WU, W.; CUI, W.; ESKIN, M. A. N.; GOFF, D. H. (2009). An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. *Food Research International*, 42, 1141–1146.
- YANG, Y.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; MCCLEMENTS, D. J. (2013). Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: *Quillaja* saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 589-596.

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho demonstrou que saponina de *Quillaja* (QBS), β -lactoglobulina (β -lg) e a mistura 1:1 de QBS e β -lg podem ser empregadas com sucesso na formação e estabilização de emulsões óleo em água (O/A) em condições de pH básico (7, 8 e 9) e baixa concentração de NaCl (< 200 mmol L⁻¹).

O método de homogeneização à alta pressão e as condições do meio (pH e concentração de NaCl) permitiram a obtenção de emulsões com gotas com diâmetro médio inferior a 500 nm quando estabilizadas por QBS e/ou β -lg. As emulsões apresentaram gotas negativamente carregadas nos pH avaliados (7, 8 e 9), sendo a carga superficial das gotas fortemente influenciada pelo pH e, principalmente, pela concentração de NaCl, de modo que a magnitude do potencial ζ diminuiu significativamente ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de NaCl e com a diminuição do pH. As emulsões apresentaram comportamento pseudoplástico com presença de pequena tensão inicial e baixa viscosidade aparente, e comportamento viscoelástico típico de géis fracos, indicando a presença de estrutura tridimensional elástica frágil. As emulsões estabilizadas por QBS e/ou β -lg apresentaram cremeação após 7 dias de armazenamento a 25 °C, no entanto mantiveram-se estáveis quanto à separação de fase e, em geral, à agregação devido à repulsão eletrostática e, muito provavelmente, à repulsão estérica conferida pelos emulsificantes adsorvidos na superfície das gotas.

Embora tanto as soluções de QBS e β -lg quanto a mistura dessas tenham sido capazes de formar emulsões O/A com gotas pequenas, a mistura de QBS e β -lg apresentou melhor controle da desestabilização. Desta forma, a mistura 1:1 de QBS e β -lg mostra-se promissora para aplicações tecnológicas na faixa de pH de 7 a 9 e concentração de NaCl até 200 mmol L⁻¹.

Para estudos futuros, seria interessante:

- avaliar a capacidade emulsificante da mistura de QBS e β -lg em condições de pH ácido, as quais são mais semelhantes a situações reais encontradas em alimentos;

- avaliar a capacidade de emulsificação e de estabilização da mistura em diferentes proporções e concentrações, a fim de determinar a melhor proporção dos emulsificantes e a concentração mínima necessária para formar e estabilizar emulsões O/A;

- avaliar as propriedades físicas (reologia, tamanho de gota e carga superficial) das emulsões e sua estabilidade em temperaturas correspondentes às de tratamentos térmicos e de refrigeração;

- estender o estudo a outros tipos de óleos para avaliar o efeito desses na estabilidade, bem como determinar a concentração máxima de óleo que poderia ser empregada sem comprometer a estabilidade das emulsões;

- utilizar técnicas de microscopia para obter informações a respeito do tamanho das gotas e do estado de agregação das mesmas;

- avaliar a interação entre o biossurfactante e a proteína por meio de técnicas de (i) eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de complexos específicos; (ii) espalhamento de luz dinâmico para obter a massa molecular dos complexos; (iii) espectroscopia de dicroísmo circular para determinação de mudanças conformacionais na proteína induzidas pela associação do surfactante; (iv) espectroscopia de emissão de fluorescência para obtenção de parâmetros termodinâmicos dos complexos proteína-surfactante; e (v) microcalorimetria e titulação calorimétrica para obtenção de dados da entalpia de ligação do surfactante na desnaturação da proteína.