

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

SEPARAÇÃO DE COLESTEROL
DO ÓLEO DE MANTEIGA UTILIZANDO
EXTRATOS DE *Quillaja saponaria* Molina

PARECER

Este exemplar corresponde
redação final da tese defendida
Esdras Sundfeld aprovada
Comissão Julgadora em 30
setembro de 1999.

Autor: Esdras Sundfeld

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Campinas, 30 de setembro de 1999



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
Presidente da Banca

**Dissertação submetida à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade
de Engenharia de Alimentos, como parte dos requisitos necessários
para obtenção do grau de doutor em Engenharia de Alimentos**

Campinas - SP
Julho de 1999



| | |
|----------|-----------|
| UNIDADE | BC |
| CHAMADA: | |
| EX | 39242 |
| REC | 229/99 |
| PREÇO | R\$ 11,00 |
| DATA | 28/10/99 |
| OPD | |

CM-00136609-0

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

Su72s

Sundfeld, Esdras

Separação de colesterol do óleo de manteiga
utilizando extratos de *Quillaja saponaria* Molina. /
Esdras Sundfeld. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Theo Guenter Kieckbush.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Colesterol. 2. Manteiga. 3. Saponinas. 4. *Quillaja*
saponaria. I. Kieckbush, Theo Guenter. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora
constituída pelos professores:



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

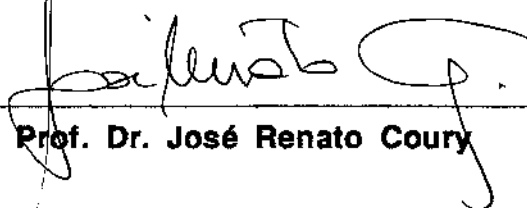
Prof. Dr. Fernando Galembeck



Profa. Dra. Lireny A. G. Gonçalves



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana



Prof. Dr. José Renato Coury



Prof. Dr. José Gilberto Jardine

Prof. Dr. Omar A. El - Seoud

Campinas,

de

de 1999

**Dedico esta dissertação
aos meus pais, irmãos e
à Vania, Andrei e Marta.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch pela orientação, dedicação e apoio dispensados em todas as etapas do programa de doutorado;

Ao Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana e ao Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed, pela valiosa colaboração no desenvolvimento da tese;

Ao Prof. Dr. John M. Krochta, ao Prof. Dr. Thomas Richardson e ao Prof. Dr. J. Bruce German pelo encorajamento, orientação e apoio, e a Cheryl Wick e Susan Yun pelo trabalho duro e companheirismo, durante o desenvolvimento dos trabalhos na Universidade da California - Davis;

Aos Membros das Bancas Examinadoras do Exame de Qualificação Específico e de Defesa de Tese, pela revisão e sugestões apresentadas ao trabalho;

Aos Professores das Faculdades de Engenharia de Alimentos - FEA e de Engenharia Química - FEQ, de quem obtive proveitosas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, por propiciar-me a oportunidade e os meios financeiros para consecução deste programa de doutorado;

Ao Dr. José Gilberto Jardine, orientador de curso por parte da EMBRAPA, pelo apoio e orientação;

Ao National Dairy Promotion and Research Board - NDPRB, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, pelo apoio financeiro a este trabalho;

A todos que, de forma direta ou indireta, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| Lista de Figuras | vi |
| Lista de Tabelas | x |
| Resumo | xii |
| Abstract | xiv |
| I. Introdução | 1 |
| 1. Relevância da pesquisa | 1 |
| 2. Objetivos | 4 |
| II. Revisão de literatura | 7 |
| 1. Colesterol na gordura do leite | 7 |
| 1.1. Colesterol | 7 |
| 1.2. Teor de colesterol em produtos lácteos | 7 |
| 1.3. Determinação quantitativa de colesterol | 11 |
| 2. Tecnologias para remoção de colesterol de produtos lácteos | 13 |
| 3. Saponinas e suas interações com o colesterol | 14 |
| 3.1. Saponinas: características gerais | 15 |
| 3.2. Saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> Molina | 15 |
| 3.3. Determinação quantitativa de saponinas | 17 |
| 3.4. Perspectiva analítica: a formação de complexos insolúveis | 19 |
| 3.5. A atividade hemolítica de saponinas | 20 |
| 3.6. Perspectiva nutricional: a ação hipocolesterolêmica de saponinas | 21 |
| 3.7. A escolha das saponinas de quilaia | 22 |
| 4. Fenômenos de formação de estruturas coloidais em solução aquosa e solubilização | 23 |
| 4.1. Formação de micelas | 23 |

| | |
|---|----|
| 4.2. Formação de outras estruturas coloidais em solução | 25 |
| 4.3. Solubilização em estruturas coloidais | 26 |
| 4.4. Solubilização de colesterol em estruturas coloidais | 29 |
| 4.5. Formação de estruturas coloidais e solubilização em soluções aquo- sas de saponinas | 31 |
| 5. Processos de separação baseados em surfatantes | 34 |
| 5.1. Separações baseadas na extração | 34 |
| 5.2. Separações baseadas na adsorção | 35 |
| 6. Estado da arte da separação de colesterol usando saponinas | 39 |
| III. Material e método | 45 |
| 1. Detalhamento dos experimentos | 45 |
| 1.1. Primeira Fase: Avaliação dos processos de separação líquido-líquido (LL) e sólido-líquido-líquido (SLL) para remoção de colesterol do óleo de manteiga | 45 |
| 1.1.1. Efeito de parâmetros do processo de separação sólido-líquido- líquido (SLL) nos níveis de remoção de colesterol | 45 |
| 1.1.2. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo nas etapas dos processos de separação LL e SLL | 49 |
| 1.1.3. Distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL | 51 |
| 1.1.4. Efeito da procedência das quilaia nos níveis de remoção de colesterol dos processos de separação LL e SLL | 54 |
| 1.1.5. Caracterização das quilaia | 56 |
| 1.2. Segunda Fase: Formação de micela e solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia | 59 |
| 1.2.1. Formação da micela em soluções aquosas de quilaia | 60 |
| 1.2.2. Evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções de quilaia | 61 |
| 1.2.3. Solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia ... | |
| 1.2.4. Correlação entre os fenômenos de formação de micelas e remoção de colesterol pelo contato com soluções aquosas de quilaia | 65 |

| | |
|--|-----|
| 2. Materiais | 68 |
| 2.1. Óleo de manteiga | 68 |
| 2.2. Soluções de colesterol em decano | 68 |
| 2.3. Extratos de quilaia | 69 |
| 2.4. Terra diatomácea | 70 |
| 2.5. Outros insumos | 70 |
| 2.6. Equipamentos | 71 |
| 3. Métodos de análise | 72 |
| 3.1. Determinação quantitativa do teor de colesterol | 72 |
| 3.2. Determinação do teor de óleo na fase sólida | 75 |
| 3.3. Determinação do teor de umidade | 76 |
| 3.4. Determinação do teor de sapogeninas em extratos de quilaia | 76 |
| 3.5. Determinação da tensão superficial em soluções aquosas de quilaia | 77 |
| 3.6. Determinação da condutividade elétrica e turbidez em soluções aquosas de quilaia | 78 |
| 3.7. Determinação da concentração de micela crítica (CMC) das quilaías através da tensão superficial, condutividade elétrica e turbidez das soluções aquosas | 79 |
| 3.8. Determinação da mobilidade eletroforética e do diâmetro de Stokes das partículas presentes em soluções aquosas de quilaia | 80 |
| IV. Resultados e discussão | 83 |
| 1. Primeira Fase: Avaliação dos processos de separação líquido-líquido (LL) e sólido-líquido-líquido (SLL) para remoção de colesterol do óleo de manteiga | 83 |
| 1.1. Efeito de parâmetros do processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL) nos níveis de remoção de colesterol | 84 |
| 1.2. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo nas etapas dos processos de separação LL e SLL | 95 |
| 1.3. Distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL | 100 |
| 1.4. Efeito da procedência das quilaías nos níveis de remoção de colesterol dos processos de separação LL e SLL | 114 |
| 1.5. Caracterização das quilaías | 118 |
| 1.6. Mecanismos operantes na separação de colesterol | 134 |

| | |
|---|-----|
| 2. Segunda Fase: Formação de micela e solubilização do colesterol em soluções aquosas de quilaia..... | 138 |
| 2.1. Formação da micela em soluções aquosas de quilaia | 138 |
| 2.2. Evolução do teor de colesterol na fase decano com o tempo de contato com em soluções aquosas de quilaia | 147 |
| 2.3. Solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia | 149 |
| 2.4. Correlação entre os fenômenos de formação de micelas e remoção de colesterol pelo contato com soluções aquosas de quilaia | 164 |
| V. Conclusões | 173 |
| VI. Sugestões para trabalhos futuros | 175 |
| VII. Bibliografia | 177 |
| VIII. Apêndices..... | 193 |
| A. Balanço de massa para estimativa da distribuição de colesterol entre fases resultantes do processo sólido-líquido-líquido (SLL) | 194 |
| B. Balanço de massa para estimativa da distribuição de colesterol entre fases resultantes do processo líquido-líquido (LL) | 198 |
| C. Resultados detalhados do estudo do efeito da temperatura nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL) | 200 |
| D. Resultados detalhados do estudo do efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo sólido-líquido-líquido (SLL) | 202 |
| E. Resultados detalhados do estudo do efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo sólido-líquido-líquido (SLL) | 205 |
| F. Resultados detalhados do estudo da evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato nas etapas dos processos de separação LL e SLL | 209 |

| | |
|---|-----|
| G. Resultados detalhados do estudo da distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL | 211 |
| H. Resultados detalhados do estudo do efeito da procedência das quilaia nos níveis de remoção de colesterol dos processos de separação LL e SLL | 218 |
| I. Resultados detalhados da determinação da concentração de micela crítica (CMC) das quilaia PENCO e BELL | 220 |
| J. Verificação do efeito da filtração nas medidas de mobilidade eletroforética e tamanho das partículas em soluções aquosas de quilaia | 226 |
| L. Mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes das partículas e condutividade das soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL | 229 |
| M. Resolução de sub-populações de partículas através de medidas de mobilidade eletroforética com resolução aumentada | 231 |
| N. Resultados detalhados dos estudos de formação da micela em soluções aquosas de quilaia | 233 |
| O. Resultados detalhados dos estudos de solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia | 242 |
| P. Obtenção gráfica da concentração de micela crítica (CMC) da quilaia SIGMA em várias condições de temperatura, pH e adição de NaCl | 251 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|---------------|---|----|
| FIGURA II.1. | Estrutura e propriedades do colesterol | 7 |
| FIGURA II.2. | Estrutura de esteróis selecionados | 9 |
| FIGURA II.3. | Saponina de <i>Quillaja saponaria</i> Molina | 17 |
| FIGURA II.4. | Isoterma típica de adsorção de um surfactante iônico, a partir de uma solução aquosa, em óxido mineral | 37 |
| FIGURA II.5. | Processos alternativos para separação de colesterol do óleo de manteiga utilizando quilaia | 41 |
| FIGURA III.1. | Fluxograma experimental do processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL) | 47 |
| FIGURA III.2. | Fluxograma experimental do processo de separação líquido-líquido (LL) | 53 |
| FIGURA III.3. | Determinação gráfica da concentração da micela crítica (CMC) através da tensão superficial, condutividade e turbidez das soluções | 79 |
| FIGURA III.4. | Diagrama do Sistema Pen Kem 3000 | 81 |
| FIGURA IV.1. | Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com a variação de temperatura no processo SLL | 85 |
| FIGURA IV.2. | Evolução do teor de colesterol na torta de terra diatomácea com a variação de temperatura no processo SLL | 86 |
| FIGURA IV.3. | Evolução dos teores de colesterol na fase oleosa com a variação do pH da solução de quilaia e da temperatura no processo SLL . | 87 |
| FIGURA IV.4. | Evolução dos teores de colesterol na torta de terra diatomácea com a variação do pH da solução de quilaia e da temperatura no processo SLL | 89 |
| FIGURA IV.5. | Evolução dos teores de colesterol na fase oleosa com a variação da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no processo SLL | 90 |
| FIGURA IV.6. | Evolução dos teores de colesterol na torta de terra diatomácea com a variação da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no processo SLL | 91 |
| FIGURA IV.7. | Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa LL, a várias concentrações da solução de quilaia | 98 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA IV.8. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa SLL, a várias concentrações da solução de quilaia | 99 |
| FIGURA IV.9. Teores de colesterol nos óleos de manteiga e nas fases oleosas resultantes do processo de separação LL, a várias concentrações da solução de quilaia | 103 |
| FIGURA IV.10. Distribuição de colesterol nas fases oleosas e aquosas resultantes do processo de separação LL, a várias concentrações da solução de quilaia | 104 |
| FIGURA IV.11. Teor de colesterol nos óleos de manteiga e nas fases oleosas resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia | 105 |
| FIGURA IV.12. Teor de colesterol nos óleos de manteiga e nas tortas resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia | 106 |
| FIGURA IV.13. Distribuição de colesterol na fase oleosa e seletivamente associado à torta resultante do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia | 107 |
| FIGURA IV.14. Distribuição de colesterol nas fases oleosas e aquosas resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia | 108 |
| FIGURA IV.15. Diagrama ilustrativo do processo de separação SLL em múltiplos estágios, na configuração de fluxo cruzado | 110 |
| FIGURA IV.16. Teores de colesterol nos óleos que entram e saem de estágios de equilíbrio aplicados nos processos de separação LL e SLL | 111 |
| FIGURA IV.17. Simulação do teor de colesterol na fase oleosa em função do número de estágios de equilíbrio aplicados nos processos de separação LL e SLL em fluxo cruzado | 112 |
| FIGURA IV.18. Efeito da procedência da quilaia nos teores de colesterol das fases oleosas resultantes dos processos LL e SLL | 115 |
| FIGURA IV.19. Teores de colesterol nos óleos que entram e saem de estágios de equilíbrio aplicados no processo de separação SLL, utilizando-se quilais PENCO e BELL | 117 |
| FIGURA IV.20. Simulação do teor de colesterol na fase oleosa em função do número de estágios de equilíbrio aplicados no processo de separação SLL em fluxo cruzado, utilizando-se as quilais PENCO e BELL | 117 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA IV.21. Determinação gráfica da CMC da quilaia BELL a 25 °C e pH 4,6, através de várias propriedades das soluções aquosas | 122 |
| FIGURA IV.22. Histograma típico da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia PENCO | 125 |
| FIGURA IV.23. Histograma típico da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia BELL | 125 |
| FIGURA IV.24. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia PENCO obtidos com dois níveis de resolução..... | 127 |
| FIGURA IV.25. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia BELL obtidos com dois níveis de resolução..... | 128 |
| FIGURA IV.26. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética obtidos a várias concentrações da quilaia PENCO (CMC ~ $1,5 \times 10^{-3}$ g/ml) em solução aquosa a 25 °C e pH 4,6 | 131 |
| FIGURA IV.27. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética obtidos a várias concentrações da quilaia BELL (CMC ~ $1,5 \times 10^{-3}$ g/ml) em solução aquosa a 25 °C e pH 4,6 | 132 |
| FIGURA IV.28. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética a 25 °C em amostras de: 1) água desionizada, 2) solução não centrifugada de quilaia PENCO a 0,01 g/ml, e 3) sobrenadante da solução 2 após centrifugação a 16.000 “g” por 30 minutos | 133 |
| FIGURA IV.29. Procedimento típico para obtenção da CMC da quilaia SIGMA em cada condição de temperatura, pH e nível de adição de NaCl, a partir dos dados de tensão superficial e concentração de quilaia em solução aquosa | 139 |
| FIGURA IV.30. Efeito da temperatura na CMC da quilaia SIGMA | 144 |
| FIGURA IV.31. Efeito do pH na CMC da quilaia SIGMA | 145 |
| FIGURA IV.32. Efeito da adição de NaCl na CMC da quilaia SIGMA | 146 |
| FIGURA IV.33. Evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA a três concentrações (CSQ), 35 °C, pH 4,5 e 0,25M de NaCl adicionado | 148 |
| FIGURA IV.34. Efeito da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA | 150 |
| FIGURA IV.35. Efeito do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA | 152 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA IV.36. Efeito da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA | 154 |
| FIGURA IV.37. Efeito principal da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA | 157 |
| FIGURA IV.38. Efeito principal do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA | 158 |
| FIGURA IV.39. Efeito principal da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA | 159 |
| FIGURA IV.40. Efeito principal da concentração de quilaia SIGMA em solução aquosa na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato..... | 160 |
| FIGURA IV.41. Concentrações de colesterol na fase decano, camada intermediária e fase aquosa resultantes do contato entre uma solução de colesterol em decano a 3,0 mg/ml e uma solução de quilaia SIGMA a 0,025 g/ml a 45 °C | 161 |
| FIGURA IV.42. Colesterol recuperado via balanço de massa nas fases aquosa e decano, assumida sua imiscibilidade, em relação ao efetivamente presente no sistema | 162 |
| FIGURA IV.43. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) e da concentração de micela crítica (CMC) com a temperatura a pH 3,0 e sem adição de NaCl | 166 |
| FIGURA IV.44. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) e da concentração de micela crítica (CMC) com o pH a 45 °C e 0,5M de NaCl adicionado | 166 |
| FIGURA IV.45. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) e da concentração de micela crítica (CMC) com a adição de NaCl a 35 °C e pH 4,5 | 167 |
| FIGURA IV.46. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano com a variação da concentração de soluções de quilaia SIGMA a 25 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl | 169 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|---------------|---|-----|
| TABELA II.1. | Teor de colesterol em produtos lácteos, segundo vários autores.. | 10 |
| TABELA II.2. | Teor típico de colesterol em alguns alimentos segundo (PENNINGTON, 1976) | 11 |
| TABELA IV.1. | Efeito da temperatura no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos | 85 |
| TABELA IV.2. | Efeito da temperatura no teor de colesterol da torta de terra diatomácea resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos | 86 |
| TABELA IV.3. | Efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos | 87 |
| TABELA IV.4. | Efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura no teor de colesterol da torta de terra diatomácea resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos | 89 |
| TABELA IV.5. | Efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos | 90 |
| TABELA IV.6. | Efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no teor de colesterol da torta resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos | 91 |
| TABELA IV.7. | Efeito da procedência da quilaia no teor de colesterol das fases oleosas resultantes dos processos LL e SLL: comparação das médias dos tratamentos | 115 |
| TABELA IV.8. | Composição centesimal das quilaia em pó | 118 |
| TABELA IV.9. | Teor de sapogeninas das quilaia em pó | 119 |
| TABELA IV.10. | Concentração de micela crítica (em g/ml x 10 ³) das quilaia a 25 °C e pH 4,6, determinada graficamente através de várias propriedades das soluções | 119 |
| TABELA IV.11. | Valores de pH das soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL 'a concentração de 0,05 g/ml e temperatura de 25 °C | 123 |

| | |
|--|-----|
| TABELA IV.12. Valores da mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes das partículas e condutividade das soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL a pH de 4,6 e temperatura de 25 °C | 124 |
| TABELA IV.13. Efeito da temperatura na CMC da quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos | 144 |
| TABELA IV.14. Efeito do pH na CMC da quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos | 145 |
| TABELA IV.15. Efeito da adição de NaCl na CMC da quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos | 146 |
| TABELA IV.16. Evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA a três concentrações, 35 °C, pH 4,5 e 0,25M de NaCl adicionado: comparação das médias dos tratamentos | 148 |
| TABELA IV.17. Efeito da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos | 150 |
| TABELA IV.18. Efeito do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos | 152 |
| TABELA IV.19. Efeito da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos | 154 |

RESUMO

Existem fatores econômicos, regulamentares, mercadológicos, de estilo de vida, nutricionais e dietéticos para justificar a intensidade das pesquisas dedicadas à formulação de produtos isentos de colesterol ou ao desenvolvimento de tecnologias que reduzam o teor de colesterol nos alimentos. Este trabalho contempla o desenvolvimento de processos baseados na utilização de "quilaia" - extratos de grau alimentício de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina. São estudadas duas alternativas: 1) o processo líquido-líquido (LL), envolvendo o contato do óleo de manteiga com uma solução aquosa de quilaia, e 2) o processo sólido-líquido-líquido (SLL), em que ao meio bifásico resultante do processo LL é adicionada a terra diatomácea; em ambos os casos, a etapa final é a separação e recuperação, por centrifugação, do óleo com teor reduzido de colesterol.

A primeira etapa deste trabalho teve caráter tecnológico. Extratos de quilaia em pó e óleo de manteiga comercialmente disponíveis foram utilizados para avaliar os efeitos de variáveis nos níveis de remoção de colesterol obtidos do processo SLL; também foram comparados os processos LL e SLL. No processo SLL observou-se que: 1) ocorre uma distribuição de colesterol entre todas as três fases (oleosa, aquosa e sólida), resultando uma fase oleosa com teor de colesterol reduzido relativamente ao óleo de manteiga inicial, e 2) níveis crescentes de remoção de colesterol foram obtidos com a diminuição do pH e com o aumento tanto da concentração da solução de quilaia quanto da quantidade de terra diatomácea. As curvas de distribuição de colesterol no equilíbrio entre as fases resultantes dos processos LL e SLL indicaram que o segundo processo é mais efetivo. Observou-se que a procedência da quilaia tem importante impacto nos níveis de remoção de colesterol, e que produtos de fontes comerciais distintas apresentam diferenças substanciais na sua composição química.

Na segunda etapa, foram utilizadas soluções de colesterol em decano como substitutivos do óleo de manteiga e um extrato de saponinas mais purificado como sistema bifásico modelo. O objetivo foi definir a concentração de micela crítica (CMC) da solução aquosa de quilaia e a distribuição de colesterol no sistema bifásico modelo, verificando-se o efeito das variáveis no processo de formação de micelas e na remoção de colesterol. Também, buscou-se obter evidências do envolvimento de micelas na separação de colesterol. De maneira geral, a formação de micelas foi favorecida (redução da CMC) com a redução do pH e da temperatura, e com a adição de cloreto de sódio. No sistema bifásico modelo, as análises indicaram que o

colesterol removido da fase decano se encontrava efetivamente solubilizado no seio da fase aquosa em concentrações de até quase mil vezes a sua solubilidade aparente em água pura. De maneira geral, a solubilização de colesterol na fase aquosa foi aumentada com o aumento da concentração de quilaia em solução, redução da temperatura e adição de cloreto de sódio; o efeito do pH depende do nível de temperatura empregado.

Como regra geral, a concentração fixa de surfatante, condições que favorecem a formação de micelas (reduzindo a CMC) também favorecem a solubilização de solutos em soluções aquosas micelares. Houve coincidência nas tendências de redução da CMC e de aumento da solubilização de colesterol na fase aquosa com a variação de temperatura, pH e adição de sal em algumas condições experimentais enquanto que, em outras, tendências opostas ou conflitantes foram observadas. Em um experimento específico, observou-se que não ocorreu redução no teor de colesterol na fase decano em contato com soluções de quilaia abaixo da CMC. Na ausência de evidências diretas e considerando os resultados obtidos, a hipótese de que a solubilização em micelas seja um dos mecanismos envolvidos na separação de colesterol não pode ser rejeitada. Por outro lado, devem também ser consideradas alternativas de solubilização associadas a outras estruturas coloidais (cristais líquidos) que poderiam ser formadas em soluções aquosas pelos compostos anfifílicos dos extratos de quilaia.

Além do desenvolvimento técnico-científico, os resultados poderão colaborar para o desenvolvimento econômico através da produção de gordura de leite sem colesterol, abrindo a possibilidade de formulação de uma variada gama de produtos lácteos e não-lácteos com baixos teores ou isentos de colesterol, atraentes a segmentos específicos do mercado consumidor.

ABSTRACT

There are economic, regulatory, marketing, lifestyle, nutritional and dietary factors to justify the intensive research devoted to the formulation of cholesterol-free products or to the development of technologies to reduce cholesterol content in foods. The current work considers the development of processes based on the use of "quillaja" - food grade extracts of saponins from *Quillaja saponaria* Molina. Two alternatives are studied: 1) the liquid-liquid (LL) process, involving the contact of butteroil with an aqueous quillaja solution, and 2) the solid-liquid-liquid (SLL) process, where diatomaceous earth is added to the two-phase medium resulting from the LL process; in both cases, the final step is the separation and recovery of the cholesterol-reduced oil by centrifugation.

The first part of the current work had a technological character. Commercially available powdered quillaja extracts and butteroil were used to determine the effects of variables on the levels of cholesterol removal obtained by the SLL process; also, the LL and SLL processes were compared. It was observed that in the SLL process: 1) there is a distribution of cholesterol among all three phases (oil, aqueous and solid), resulting in an oil phase with reduced cholesterol content relative to the original butteroil, and 2) increased levels of cholesterol removal were obtained by reducing the pH and by increasing the concentration of quillaja solution as well as the amount of diatomaceous earth. The equilibrium distribution curves of cholesterol among phases resulting from the LL and SLL processes indicated that the second process is more effective. It was observed that the source of quillaja has an important impact on the levels of cholesterol removal, and that products from distinct commercial sources exhibit substantial differences in their chemical composition.

In the second part, a more purified quillaja extract and cholesterol solutions in decane as replacers for the butteroil were used as a two-phase model system. The objective was to define the critical micelle concentration (CMC) of the aqueous quillaja solution and the distribution of cholesterol in the two-phase model system, to verify the effect of variables in micelle formation process and cholesterol removal. Also, evidences of the involvement of micelles in cholesterol separation were sought.

In general, micelle formation was favoured (lowering the CMC) by lowering pH and temperature, and by adding sodium chloride. In the two-phase model system, analyses indicated that cholesterol removed from the decane phase was effectively solubilized in the bulk of the aqueous phase, in concentrations up to nearly one thousand times its apparent solubility in pure water. In general, cholesterol

solubilization in the aqueous phase was promoted by increasing the concentration of quillaja solution, reducing the temperature and by adding sodium chloride; the pH effect depends upon the level of temperature used.

As a general rule, at fixed surfactant concentration, conditions that favour micelle formation (lowering CMC) also promote solubilization of solutes in micellar aqueous solutions. There was coincidence in the trends of CMC reduction and cholesterol solubilization increase in the aqueous phase with varying temperature, pH and addition of salt in some experimental conditions, while in others opposing or conflicting trends were observed. In one specific experiment, it was observed that no cholesterol was removed from the decane phase in contact with quillaja solutions below the CMC. In the absence of direct evidences and considering results obtained, the hypothesis that the solubilization in micelles is one of the mechanisms operating in cholesterol separation cannot be rejected. On the other hand, solubilization alternatives associated with other colloidal structures (liquid crystals) that might be formed in aqueous solutions by amphiphilic compounds from quillaja extracts shall be considered as well.

In addition to the technical and scientific development, the results may collaborate to the economic development through the production of cholesterol-free milkfat, opening the possibility for the formulation of a wide range of cholesterol-reduced and cholesterol-free dairy and non-dairy products, attractive to specific segments of the consumer market.

I. INTRODUÇÃO

1. Relevância da pesquisa

Existem fatores econômicos, regulamentares, mercadológicos, de estilo de vida, nutricionais e dietéticos, que justificam a intensidade das pesquisas dedicadas à formulação de produtos isentos de colesterol ou ao desenvolvimento de tecnologias que reduzam apreciavelmente o seu teor nos alimentos (HETTINGA, 1989; BARR, 1990; KANTOR, 1990; MORRIS, 1991; MUCK, 1991).

Um retrato bastante fiel das preocupações dos consumidores com os constituintes dos alimentos foi publicado em artigo intitulado *Fear of food* no Wall Street Journal de 23 de junho de 1988. Neste artigo foram relatados os resultados de uma pesquisa, feita pelo Food Marketing Institute nos EUA, em que aos consumidores foi perguntado *quanto* eles estavam preocupados com alguns constituintes dos alimentos. Dos respondentes, 61% viam as *gorduras* como um risco *sério* à saúde e 35% como apresentando *certo* risco; 59% e 35% viam o *colesterol* como um risco *sério* e *certo* risco, respectivamente (BRADLEY, 1991). Esta situação não mudou desde então e, atualmente, a preocupação nutricional dos consumidores continua focada na gordura em primeiro lugar e no colesterol em segundo (YOKOYAMA, 1996).

É crescente a conscientização do consumidor com a relação entre conteúdo de gordura e colesterol em sua dieta, e doenças coronárias e alguns tipos de câncer. Verifica-se uma mudança de hábitos e costumes que gerou uma pressão sobre a indústria de alimentos no sentido de projetar, modificar, preparar, promover, rotular e distribuir alimentos seguros, atrativos e saborosos, que contenham um teor reduzido de colesterol assim como de ácidos graxos saturados e de gordura total (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 1990; BRAY, 1991; HAMMOCK, 1991; YOKOYAMA, 1996).

A indústria de laticínios dos países industrializados já sofreu um impacto significativo nesse sentido, observando-se nos últimos anos uma redução no consumo de produtos lácteos "integrais", e aumento no dos equivalentes com baixos teores de gordura/colesterol ou mesmo sucedâneos não lácteos (KANTOR, 1990).

Nos EUA, os produtos contendo baixos teores de gordura/colesterol ou calorias estão superando seus equivalentes com teores regulares. Por exemplo, as taxas

recentes de crescimento global dos segmentos de queijo processado e sorvetes/sobremesas congeladas foram de + 2,5% e + 4,0%, enquanto que os componentes destes segmentos com baixos teores de gordura/colesterol ou calorias cresceram + 40% e + 8,0%, respectivamente (GREENWALD, 1991). De 1965 a 1988, a participação do leite integral nas vendas de leite fluído caiu de 86,3% para 43,5% enquanto que a de leites desnatado e com baixos teores de gordura subiu de 11,3% para 51,0%. Entre 1971 e 1988 o consumo per capita de leite integral caiu de 90 para 45 kg, enquanto que o de baixo teor de gordura subiu de 15,7 para 42,1 kg. Há definitivamente uma tendência em favor de produtos lácteos com baixo teor de gordura/colesterol, como indicado pelo número substancial e crescente de novos produtos (queijos, sorvetes, iogurtes, etc) lançados neste segmento a cada ano (MUCK, 1991). Essa tendência da demanda também é observável no Brasil e sua satisfação exigirá o progresso tecnológico do setor industrial.

Uma variedade de tecnologias de processamento que conduz à redução do teor de colesterol em produtos lácteos tem sido investigada, tais como: conversão enzimática de colesterol a esteróis não absorvíveis, destilação por arraste de vapor, extração supercrítica, formação de complexos e/ou adsorção. Guardado o variado estágio de desenvolvimento de cada processo, o potencial de cada um é limitado pelo compromisso entre custos e seletividade da operação, e todas estas tecnologias apresentam vantagens e desvantagens (WISCONSIN MILK MARKETING BOARD, 1989; BRADLEY, 1991; GREENWALD, 1991; MORRIS, 1991). O colesterol obtido como subproduto dos processos tem também um valor comercial considerável, sendo utilizado na fabricação de esteróis e emolientes e em cremes para pele (BRADLEY, 1991).

Este trabalho contempla o desenvolvimento de tecnologia para redução do teor de colesterol que tem como mecanismo de separação proposto a formação de agregados do colesterol com saponinas de quilaia, tecnologia que tem como vantagens potenciais a possibilidade de ser implementada com equipamentos convencionais já disponíveis na indústria de laticínios, com escala de produção flexível e custos operacionais baixos, sem alteração da qualidade e com altos rendimentos de produto final. Este conjunto de vantagens é que torna esta tecnologia potencialmente promissora, e particularmente adequada às condições brasileiras.

O uso de extratos de quilaia para reduzir o teor de colesterol do óleo de manteiga (*butteroil*) foi proposto por SUNDFELD (1992). Pretende-se implementar os conhecimentos técnico-científicos dessa tecnologia, buscando identificar e correlacionar os mecanismos envolvidos nas várias etapas do processo e delimitar a influência de variáveis em sua eficiência global. Espera-se poder contribuir para o

domínio dos princípios que regem esses processos, fornecendo subsídios a ações futuras que levem não só a melhorias na tecnologia existente, mas também a eventuais estudos de ampliação de escala e de viabilidade econômica visando seu repasse e incorporação ao setor industrial.

Neste sentido, o presente trabalho apresenta contribuições originais na definição do efeito combinado de parâmetros (temperatura, pH, concentração da solução de quilaia e quantidade de terra diatomácea) dos processos propostos por SUNDFELD (1992) nos níveis de remoção de colesterol do óleo de manteiga, assim como na construção de curvas de distribuição no equilíbrio de colesterol entre fases resultantes destes processos de separação, permitindo sua simulação em múltiplos estágios. São apresentados ainda os efeitos combinados da temperatura, pH e adição de cloreto de sódio na concentração de micela crítica (CMC) de extratos de quilaia e na distribuição de colesterol entre fases no sistema decano/solução aquosa de quilaia, correlacionando-se os fenômenos de formação de micelas com o de solubilização de colesterol.

É importante ressaltar que, dadas as atitudes e demandas atuais dos consumidores, uma empresa que venha a oferecer produtos lácteos com baixos teores de colesterol a preços competitivos deverá ter uma vantagem substancial a nível de mercado. O desenvolvimento de gordura láctea isenta de colesterol abrirá a possibilidade de formulação de um amplo e variado espectro de produtos lácteos e não-lácteos, isentos ou com baixos teores de colesterol, atraentes a um segmento de consumidores preocupados com sua saúde e com renda suficiente para pagamento de um preço diferenciado. Portanto, a remoção do colesterol da gordura do leite representará uma alternativa de marketing muito útil ao setor industrial de laticínios em particular e de alimentos em geral.

2. Objetivos

O objetivo geral da pesquisa foi o levantamento experimental de subsídios para a compreensão, domínio e desenvolvimento da tecnologia para redução do teor de colesterol da gordura láctea, através do uso de soluções aquosas de extratos de grau alimentício de *Quillaja saponaria* Molina. Foram considerados dois processos de separação alternativos propostos por SUNDFELD (1992) e denominados: 1) Líquido-líquido (LL), envolvendo o contato do óleo de manteiga com uma solução aquosa de quilaia e 2) Sólido-líquido-líquido (SLL), em que ao meio líquido bifásico resultante do processo LL é adicionada a terra diatomácea; a etapa final em ambos os processos é a separação e recuperação, por centrifugação, do óleo com teor reduzido de colesterol. Nestes processos, os mecanismos propostos por SUNDFELD (1992) como operantes na separação foram o de solubilização de colesterol nas micelas de saponinas de quilaia em solução aquosa e em estruturas micelares (admicelas) adsorvidas na terra diatomácea.

Numa primeira fase, de caráter eminentemente tecnológico, foram avaliados os efeitos de variáveis nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo SLL e comparadas as opções de processo LL e SLL aplicadas ao óleo de manteiga. Estes experimentos permitirão uma visão "real" destas alternativas de processo, passíveis de implementação pelo setor industrial, e cuja viabilidade técnica e efetividade convém verificar. A hipótese de trabalho é a de que os níveis de remoção de colesterol são afetados pelos parâmetros de processo e que, através do controle apropriado deles, os níveis de separação do colesterol podem ser controlados. Os objetivos específicos desta fase do trabalho foram:

- verificar o efeito dos parâmetros temperatura, pH, concentração da solução de quilaia e quantidade de terra diatomácea nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo SLL aplicado ao óleo de manteiga;
- verificar o tempo de equilíbrio das etapas e a distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos LL e SLL aplicados ao óleo de manteiga, a várias concentrações da solução de quilaia, e simular a efetividade destes processos em múltiplo estágio;
- verificar se a procedência da quilaia afeta os níveis de remoção de colesterol promovidos pelos processos LL e SLL aplicados ao óleo de manteiga e, caso positivo, buscar identificar as possíveis causas através da caracterização das quilaias.

Numa segunda fase, procurou-se melhor caracterizar a solução aquosa de quilaia e a distribuição de colesterol entre fases num sistema bifásico líquido-líquido análogo ao resultante do processo LL, verificando-se o efeito de variáveis de processo na formação de micelas e na remoção de colesterol. Nestes estudos foi utilizada uma solução de colesterol em decano como substitutivo do óleo de manteiga e um extrato de quilaia mais purificado. A atenção esteve voltada para a fase aquosa (a solução aquosa de quilaia), objetivando obter informações que permitam um melhor entendimento e controle do processo. Considerando que o mecanismo de separação proposto por SUNDFELD (1992) envolve a solubilização de colesterol em micelas presentes na fase aquosa, a hipótese de trabalho é a de que a extensão desta solubilização é função de parâmetros de processo e que, através do controle apropriado destes parâmetros, a formação de micelas em solução aquosa e o nível de separação do colesterol podem ser controlados. Os objetivos específicos desta fase do trabalho foram:

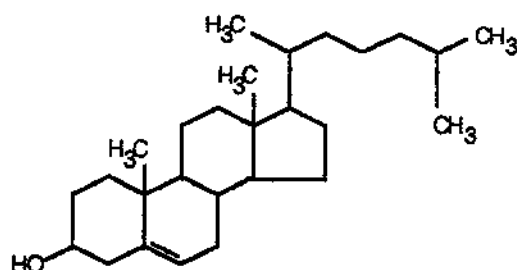
- determinar a faixa de concentração em que extratos de quilaia formam micelas em solução aquosa, assim como o efeito da temperatura, pH e adição de cloreto de sódio na concentração de micela crítica (CMC);
- determinar a quantidade de colesterol que, a partir de uma solução em decano, é solubilizada em soluções aquosas de quilaia a várias concentrações, e como esta quantidade é afetada pela temperatura, pH e adição de cloreto de sódio;
- correlacionar os fenômenos de formação de micelas com o da solubilização de colesterol neste sistema bifásico, buscando evidências que corroborem o mecanismo de separação proposto.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Colesterol na gordura do leite

1.1. Colesterol

O colesterol, um esteroide com fórmula $C_{27}H_{45}OH$, é o precursor dos ácidos biliares, hormônios esteroidais, e pró-vitamina D_3 . A maior parte do colesterol necessário para as funções normais do organismo humano é sintetizada endogenamente, mas quantidade substancial do total de colesterol presente no organismo é também obtida da dieta. Plantas contêm quantidades insignificantes de colesterol, mas contêm outros esteróis similares usualmente denominados fitosteróis. Animais herbívoros possuem tanto o colesterol como outros esteróis em seus tecidos (FEELEY *et al.*, 1972; SWEENEY & WEIHRAUCH, 1976). A Figura II.1 apresenta a estrutura e algumas propriedades relevantes do colesterol.



| | |
|------------------|---|
| Fórmula : | $C_{27}H_{45}OH$ |
| Peso molecular : | 386,87 |
| Ponto de fusão : | 148,5 °C |
| Densidade : | 1,067 (20 °C / 4 °C H ₂ O) |
| Solubilidade : | <div> INSOLÚVEL LIGEIRAMENTE SOLÚVEL SOLÚVEL </div> <div> - H₂O - Álcool - Acetona, Benzeno, Clorofórmio, Eter Óleos vegetais </div> |

FIGURA II. 1. Estrutura e propriedades do colesterol.

1.2. Teor de colesterol em produtos lácteos

Os triacilgliceróis representam a maior porção dos lipídios presentes no leite: 97-98% do total. Pequenas quantidades de mono e diacilgliceróis, colesterol livre e ésteres de colesterol, ácidos graxos livres e fosfolipídios também estão presentes. A presença de quantidades relativamente grandes de glicerídeos parciais e ácidos graxos não esterificados normalmente significa a ocorrência de lipólise como resultado da manipulação inadequada do leite (CHRISTIE, 1987). Os ácidos graxos predominantes na gordura do leite são o palmítico (C16:0), oléico (C18:1) e esteárico (C18:0) (NAWAR, 1985).

O colesterol é encontrado na fração lipídica em três formas: livre na gordura, ligado a lipoproteínas dos glóbulos de gordura, e esterificado com ácidos graxos (JENNESS & PATTON, 1959; THOMPSON *et al.*, 1961). A maior parte do teor de esteróis do leite é formada por colesterol; entretanto, outros esteróis correlatos, incluindo fitosteróis, já foram detectados (PARODI, 1973).

O colesterol está presente principalmente em alimentos de origem animal e as maiores fontes na dieta são geralmente ovos, produtos de laticínios, e produtos cárneos. Muitas compilações de dados do teor de colesterol em alimentos, incluídos produtos de laticínios, foram publicadas (FEELEY *et al.*, 1972; LA CROIX *et al.*, 1973; POSATI & ORR, 1976; SWEENEY & WEIHRAUCH, 1976; REEVES III & WEIHRAUCH, 1979; HOLLAND *et al.*, 1989).

Muitos fatores têm sido relatados como afetando o conteúdo de colesterol e/ou gordura do leite e produtos lácteos, tais como a raça dos rebanhos, estação, estágio de lactação e tipo de ração, e os resultados obtidos por vários autores são controversos (FOX & GARDNER, 1923; NATAF *et al.*, 1948; JENNESS & PATTON, 1959; HOMER & VIRTANEN, 1967; PRASAD & PANDITA, 1987).

Os teores de colesterol livre e esterificado em produtos lácteos relatados por vários autores são sujeitos a controvérsia. A proporção do colesterol total na forma esterificada foi reportada como 0% (NATAF *et al.*, 1948), 5% (HOMER & VIRTANEN, 1967), de 5 a 10% (DE MAN, 1964), 10% (WOOD & BITMAN, 1986; CHRISTIE, 1987) e 15% (JENSEN *et al.*, 1990).

A presença de esteróis que não o colesterol na gordura do leite também foi relatada por vários autores. PARODI (1973) estudou os teores de colesterol e outros esteróis na gordura de leite na Austrália e indicou a presença de 7-deidrocolesterol, campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, e possivelmente ergosterol. O autor também

revisou os dados publicados por vários autores sobre o assunto confirmando a presença destes esteróis na gordura do leite, acrescentando-se também lanosterol e dehidrolanosterol. Os principais esteróis identificados, em teor decrescente, foram β -sitosterol, campesterol, e estigmasterol. O teor de esteróis 3β -hidróxi que não o colesterol na gordura do leite foi definido como de até 3 mg/100g gordura. As estruturas de alguns esteróis relevantes são apresentadas na Figura II.2.

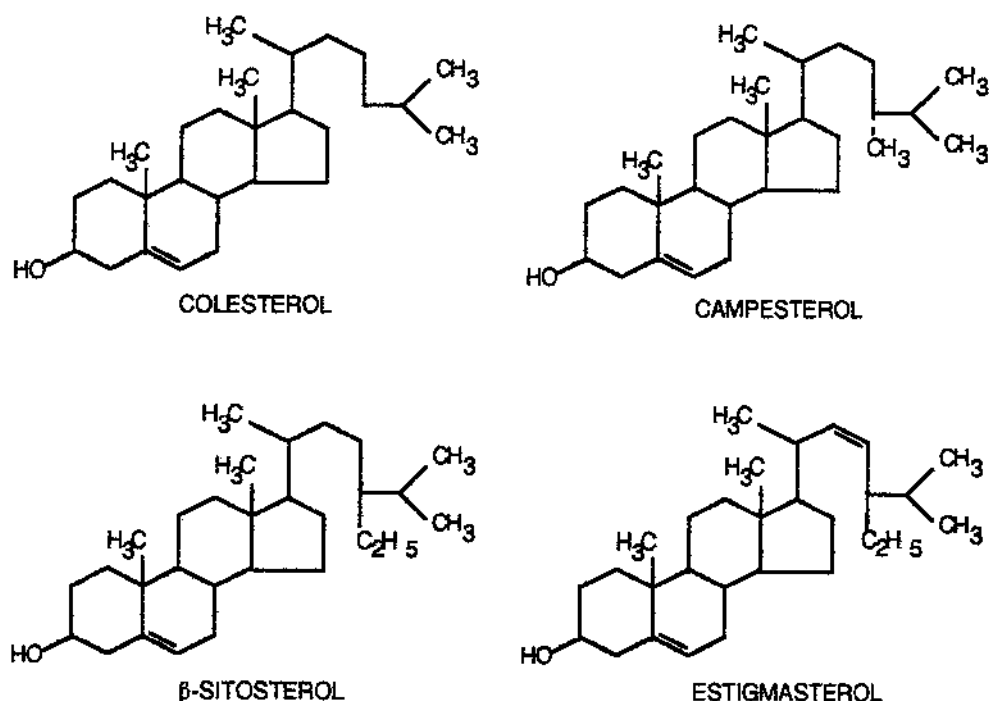


FIGURA II.2. Estrutura de esteróis selecionados.

MC CARTHY *et al.* (1964) examinaram os destilados moleculares de óleo de manteiga (*butteroil*) e relataram que 95% do teor total de esteróis era colesterol. A presença de ésteres de colesterol também foi detectada.

FEELEY *et al.* (1972) observaram que grupos de produtos lácteos com baixo teor de gordura têm mais colesterol, em relação ao seu conteúdo de gordura, do que aqueles produtos com teores mais altos de gordura. Os autores verificaram que enquanto o leite integral tinha ao redor de 4 mg colesterol/g gordura, o leite desnatado líquido tinha aproximadamente 30 mg/g gordura. LA CROIX *et al.* (1973) também observou esta disparidade no teor de colesterol com base no conteúdo de gordura entre produtos lácteos. RUSSEL & GRAY (1979) determinaram o teor de colesterol de produtos lácteos fabricados a partir de um mesmo lote de leite e

relataram que o leite integral e produtos com alto teor de gordura (leite integral em pó, manteiga, queijo e creme) tinham um teor de colesterol ao redor de 3 mg/g gordura, enquanto que em produtos com baixo conteúdo de gordura (leite desnatado, soro, caseínas e concentrados de soro) o teor de colesterol variava de 8 - 50 mg/g gordura. Os autores explicaram que, após a remoção do creme, a gordura remanescente no leite desnatado consistia de uma parte dos glóbulos de gordura menores presentes no leite integral, mais a gordura oriunda de material das membranas. Já que há evidência de que o colesterol se concentra nas membranas dos glóbulos de gordura do leite, o teor relativamente alto na gordura do leite desnatado e produtos correlatos deveria ser esperada.

A faixa de valores para o teor de colesterol relatada na literatura, para um determinado produto, é usualmente larga. Esta amplitude da faixa de valores é devida não somente à variabilidade intrínseca das amostras, mas também resultante dos diferentes métodos usados na determinação de colesterol. A Tabela I.1 apresenta uma compilação dos teores de colesterol em produtos lácteos, relatados por vários autores.

TABELA II.1. Teor de colesterol em produtos lácteos, segundo vários autores.

| Produto | Teor de colesterol (mg/g gordura) | Fonte |
|------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Leite integral | 4,0 | FEELEY <i>et al.</i> , 1972 |
| | 3,68 - 4,49 | LA CROIX <i>et al.</i> , 1973 |
| | 2,23 - 4,82 | SWEENEY & WEIHRAUCH, 1976 |
| Creme de leite | 3,62 - 3,68 | FEELEY <i>et al.</i> , 1972 |
| | 1,90 - 3,78 | LA CROIX <i>et al.</i> , 1973 |
| Manteiga | 3,09 | FEELEY <i>et al.</i> , 1972 |
| | 2,62 - 3,09 | LA CROIX <i>et al.</i> , 1973 |
| | 2,37 - 2,71 | PARODI, 1973 |
| Leite desnatado | 20,0 | FEELEY <i>et al.</i> , 1972 |
| | 9,16 - 15,16 | LA CROIX <i>et al.</i> , 1973 |
| Óleo de manteiga | 2,45 | SWEENEY & WEIHRAUCH, 1976 |

Tabelas de composição de alimentos publicadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) indicaram teores de colesterol (média \pm desvio padrão) de 256 ± 3 mg/100g de óleo de manteiga (*butteroil*) anidro, 219 ± 6

mg/100g de manteiga salgada (equivalente a 2,70 mg/g gordura) e $14,00 \pm 0,17$ mg/100g de leite integral líquido (equivalente a 4,19 mg/g gordura) (REEVES III & WEIHRAUCH, 1979; POSATI & ORR, 1976). McCance & Widdowson indicam teores de colesterol de 280 mg/100 g de manteiga "ghee" (um tipo de óleo de manteiga) e 230 mg/100 g de manteiga (equivalente a 2,82 mg/g gordura) (HOLLAND *et al.*, 1989).

BRAGAGNOLO (1996) apresenta uma compilação de resultados do conteúdo de colesterol em carnes e ovos, indicando sua variabilidade e os muitos fatores que os afetam (raça dos animais, tipo de ração, etc). É importante ressaltar que, comparativamente a alguns alimentos, o leite contém pouco colesterol. SWAISGOOD (1985) relata que, enquanto um copo de leite (227 g) contém aproximadamente 27 mg de colesterol, um ovo grande contém 275 mg. PENNINGTON (1976) apresenta os teores típicos de colesterol para alguns alimentos, contidos na Tabela I.2.

TABELA II.2. Teor típico de colesterol em alguns alimentos (PENNINGTON, 1976).

| Produto | Teor de colesterol (mg/100g de produto) |
|-----------------------------|--|
| Ovos, cozidos | 550 |
| Camarões, cozidos ou fritos | 140 |
| Carne bovina, cozida | 70 |
| Leite líquido integral | 14 |

1.3. Determinação quantitativa de colesterol

As etapas geralmente utilizadas nos métodos para determinação do teor de colesterol em alimentos são: a extração dos lipídios, a separação do colesterol dos outros lipídios e compostos interferentes, e a detecção/medida do colesterol isolado (RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

Para extração do colesterol de produtos lácteos, processos em múltiplo estágio com misturas de solventes polares e apolares apresentam melhores resultados (JENNESS & PATTON, 1959; THOMPSON *et al.*, 1961; HUBBARD *et al.*, 1977; LA CROIX *et al.*, 1972). Os métodos mais populares são: o dos ácidos silícico-sulfúrico (LA CROIX *et al.*, 1972), o de Roese-Gottlieb (AOAC 16064, 1984; AOAC 16176, 1984), o de Folch ou a variante de Bligh & Dyer (FOLCH *et al.*, 1957; BLIGH & DYER, 1959; AOAC 43277, 1984; AOAC 43288, 1984).

Para separação do colesterol e outros β -esteróis, pode ser empregada a precipitação com digitonina ou tomatina (KABARA, 1961; KABARA *et al.*, 1961; SCHWARTZ *et al.*, 1967; KATZ & KEENEY, 1967; AOAC 28097, 1984; AOAC 28104, 1984). A saponificação dos extratos lipídicos e a extração de material insaponificável com solventes tem sido utilizada como uma alternativa eficiente para concentração do colesterol e eliminação de outros lipídios e impurezas (AOAC 28092, 1984; AOAC 43289, 1984).

A medição da quantidade de colesterol tem sido feita por uma variedade de métodos, incluindo a determinação gravimétrica do precipitado com digitonina, colorimetria com uma variedade de reações para desenvolvimento de cor, fluorimetria, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gás-líquido (CGL). Os procedimentos colorimétricos podem envolver uma variedade de reagentes (BLOOR, 1916; BLOOR & KNUDSON, 1916; ZLATKIS *et al.*, 1953; COURCHAINE *et al.*, 1959; HUANG *et al.*, 1961; KABARA, 1961; SWEENEY & WEIHRAUCH, 1976), mas esteróis que não o colesterol e outros compostos podem reagir produzindo cores semelhantes à do colesterol (KABARA, 1961; LA CROIX *et al.*, 1973; SWEENEY & WEIHRAUCH, 1976).

Os métodos de CGL e CLAE são qualitativos e quantitativos, muito específicos e precisos, sendo capazes em condições ótimas de determinar colesterol mesmo em amostras contendo outros esteróis e compostos interferentes (KUKSIS, 1977; CHRISTIE, 1987; JENSEN *et al.*, 1990). A CLAE foi utilizada com sucesso para determinação de colesterol em leite, óleo de manteiga e produtos de cacau (HURST *et al.*, 1983; HURST *et al.*, 1984; HURST *et al.*, 1985). A CGL tem sido o método preferido não somente para quantificar o teor de colesterol em produtos lácteos, mas também para identificar e quantificar fitosteróis resultantes da adulteração pela mistura de óleos vegetais (LA CROIX, 1969; LA CROIX, 1970; KATZ & KEENEY, 1967; PUNWAR, 1975; PUNWAR, 1976). Com o advento das colunas capilares, e consequente incremento da resolução possível, não somente o colesterol e esteróis são separados e quantificados como também produtos de oxidação do colesterol e outros lipídios incluindo-se ácidos graxos (WOOD & BITMAN, 1986; CHRISTIE, 1987; PARK & ADDIS, 1987; CHRISTEN, 1989; ATWAL *et al.*, 1990; PENTON, 1990).

Neste trabalho, a determinação precisa do teor de colesterol na gordura láctea é de importância fundamental. Espera-se que as amostras a serem analisadas contenham, além dos componentes usuais da fração lipídica do leite, compostos oriundos dos extratos de quilaia. Tais compostos poderão ter estruturas análogas à do colesterol (por exemplo, os fitosteróis amplamente difundidos nas plantas) o que representa um complicador a exigir um método com elevada resolução, de modo a

garantir que compostos similares não sejam quantificados como se fossem colesterol. Neste sentido, SUNDFELD (1992) desenvolveu, testou e empregou com sucesso um método de CGL em coluna capilar nos estudos de remoção de colesterol do óleo de manteiga utilizando extratos de quilaia, plenamente adequado às demandas desta pesquisa.

2.Tecnologias para remoção de colesterol de produtos lácteos

A remoção das pequenas quantidades de colesterol presentes na gordura do leite exige o emprego de métodos bastante seletivos, mas também adaptáveis ao processamento em larga escala que é típico nas operações da maioria das indústrias de laticínios (WISCONSIN MILK MARKETING BOARD, 1989).

A redução do teor de colesterol da gordura láctea tem sido relatada valendo-se de muitos métodos distintos, estabelecidos ou em desenvolvimento, tais como: extração com CO₂ supercrítico, destilação por arraste a vapor, cristalização fracionada, formação de complexos, adsorção, conversão enzimática, entre outros (ARUL *et al.*, 1988; SPERBER, 1989; WISCONSIN MILK MARKETING BOARD, 1989; MORRIS, 1990; GREENWALD, 1991; MORRIS, 1991; SUNDFELD, 1992).

A extração com CO₂ supercrítico foi utilizada para processar manteiga e óleo de manteiga anidro, obtendo-se níveis de remoção de colesterol de até 98% com um rendimento de até 90 % de produto final. Este processo tem como vantagens: 1) usa o gás CO₂ que é atóxico, barato, e disponível; 2) baixas temperaturas; 3) problemas insignificantes de resíduos industriais; 4) tecnologia comprovada já com uma série de aplicações comerciais; 5) não foram detectados efeitos adversos no sabor. Desvantagens são os altos níveis de investimento de capital e custos operacionais (energia) (SPERBER, 1989; WISCONSIN MILK MARKETING BOARD, 1989; BRADLEY, 1991; MORRIS, 1991). A remoção de colesterol do leite em pó usando CO₂ supercrítico também foi relatada (Q. P. CORPORATION, 1987).

A destilação por arraste a vapor remove até 95 % do colesterol da gordura anidra com um rendimento de 95 % de produto final. Tem as vantagens de ser um processo convencional, com investimentos de capital razoáveis e custos operacionais relativamente baixos. Uma desvantagem é a perda de alguns componentes do aroma e sabor característicos do produto durante o processo (SPERBER, 1989; WISCONSIN MILK MARKETING BOARD, 1989; MORRIS, 1990; MORRIS, 1991). Este processo foi patenteado pela General Mills Inc. (GENERAL

MILLS INC., 1989) e a patente é atualmente de propriedade da Omega Source Corporation (Burnsville, MN).

A conversão enzimática do colesterol a esteróis pouco absorvidos por seres humanos é a base deste método (SALVA, 1996). Assim, o colesterol é convertido pelas enzimas colesterol-redutase e colesterol-oxidase a coprostanol e colesteno, respectivamente. Estas enzimas podem ser obtidas por síntese microbiana ou por extração de várias plantas. Nas pesquisas realizadas até o momento, índices baixos de conversão foram obtidos em produtos lácteos, comparativamente a outros métodos (DEHAL *et al.*, 1991; MORRIS, 1991). O alto custo das enzimas purificadas e dificuldades legais decorrentes das fontes e formas de obtenção das enzimas para uso em alimentos, são problemas desta abordagem. Esta via de redução do teor de colesterol vem sendo pesquisada pela equipe do Dr. T. J. B. de Menezes, do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL (Campinas, SP).

Ciclo-dextrinas foram utilizadas para remoção de colesterol do leite, manteiga, e gordura do leite. Um complexo de inclusão do colesterol na ciclodextrina é formado em solução aquosa, o qual é removido por centrifugação, resultando em produtos dos quais até 90% do colesterol originalmente presente é removido (MONSERBIO, 1989; OAKENFULL & SIDHU, 1991). Permanecem, entretanto, problemas relacionados à elevada quantidade de complexante necessária e dificuldades na recuperação das ciclo-dextrinas.

A utilização de carvão ativado para adsorção de até 95% do colesterol do óleo de manteiga foi relatada (NEW ZEALAND DAIRY RESEARCH INSTITUTE, 1988). Entretanto, o processo apresenta problemas pois promove também a remoção da cor, aroma e sabor característicos do produto (WISCONSIN MILK MARKETING BOARD, 1989).

3. Saponinas e suas interações com o colesterol

É relevante examinar os antecedentes e evidências que levaram à concepção dos processos de separação de colesterol usando saponinas. Desta análise emergirão os fundamentos sobre os quais os processos se baseiam, particularmente os mecanismos de ação das saponinas, e a justificativa para a seleção de saponinas obtidas de *Quillaja saponaria* Molina.

3.1. Saponinas: características gerais

Saponinas são glicosídeos principalmente, mas não exclusivamente, de origem vegetal. São amplamente distribuídas em plantas e sua presença foi detectada em pelo menos 100 famílias, algumas das quais são utilizadas como alimento humano tais como: soja, feijão, cebola, aspargos, amendoim, espinafre, mandioca, beterraba açucareira (OAKENFULL, 1981; FENWICK & OAKENFULL, 1981; FENWICK & OAKENFULL, 1983; PRICE *et al.*, 1987).

Todas as saponinas são glicosídeos de esteróis ou triterpenóides com atividade em interfaces (tensoativos). Estes compostos anfifílicos (hidrofílico-hidrofóbicos) são compostos por uma aglicona (um esteroi ou triterpenóide, denominado sapogenina) ligada a uma ou mais cadeias de carboidratos. Saponinas triterpênicas predominam em plantas alimentares e um número muito grande de estruturas químicas pode existir em uma mesma planta (OAKENFULL, 1981; PRICE *et al.*, 1987).

Geralmente considera-se que as saponinas compartilham a propriedade de formar espuma quando agitadas em solução aquosa. Entretanto, algumas propriedades atribuídas a saponinas em geral (tais como: atividade hemolítica, formação de complexos com colesterol e sabor amargo) são mais propriamente características de tipos particulares de saponinas e nem sempre compartilhadas por todas elas. Mais ainda, a ocorrência dos vários efeitos biológicos atribuídos às saponinas e as consequências fisiológicas e nutricionais de sua presença em alimentos e rações (interação com membranas celulares, efeito hipocolesterolêmico, toxicidade, entre outros) são dependentes tanto da sua concentração quanto das estruturas químicas particulares presentes (PRICE *et al.*, 1987).

A toxicidade das saponinas foi revista em algumas ocasiões (OAKENFULL, 1981; PRICE *et al.*, 1987). Saponinas distintas demonstram considerável variação de toxicidade quando ingeridas, e uma compilação foi feita por GEORGE (1965) que também apresentou sua situação legal como aditivos alimentares.

3.2. Saponinas de *Quillaja saponaria* Molina

Quillaja é comercialmente uma denominação genérica para uma série de produtos obtidos das cascas de *Quillaja saponaria* Molina, uma árvore nativa do Chile e Peru e cultivada no sul da Califórnia. A parte utilizada das cascas é a interna,

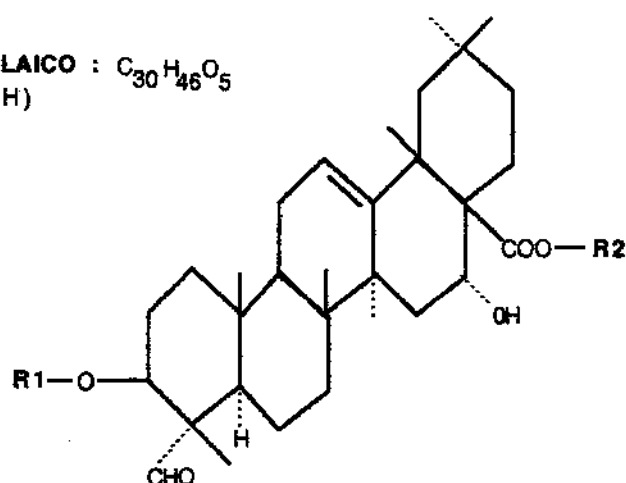
seca e sem cortiça, que contém de 9 a 10% de saponinas, além de taninos, oxalato de cálcio, açúcares, amido e outros componentes. Produtos comerciais de quilaia incluem as cascas em pó (produto cru), extratos líquidos ou em pó (com variado grau de purificação) e concentrados de saponinas (LEUNG, 1980) sendo, portanto, misturas complexas de saponinas com outros componentes das cascas.

Quilaia tem uma utilização comercial extensiva em alimentos, especialmente concentrados de saponinas como agentes espumantes em refrigerantes do tipo *root beer* e em misturas para coquetéis e, em forma não especificada, em sobremesas lácteas congeladas, doces, produtos de confeitaria, gelatinas e pudins. É também empregada na forma de extratos em produtos farmacêuticos e cosméticos, cremes para a pele, xampus e tônicos capilares, e na medicina popular (LEUNG, 1980; OAKENFULL, 1981). Sob ponto de vista da legislação, a quilaia é permitida para uso em alimentos na Inglaterra e classificada como *generally recognized as safe* - GRAS nos EUA (GEORGE, 1965).

As propriedades espumantes e emulsificantes das saponinas de quilaia são uma consequência direta de suas estruturas químicas. São compostos anfifílicos, com uma aglicona hidrofóbica (a sapogenina) determinada como sendo um triterpenóide: ácido quilaico ou ácido gipsogênico (ELLIOT & KON, 1939; ELLIOT *et al.*, 1940; VARSHNEY *et al.*, 1985). As partes hidrofílicas são duas cadeias complexas de carboidratos ligadas aos carbonos C₃ e C₂₈ da sapogenina; estes açúcares foram identificados como ácido glicurônico, galactose, glicose, arabinose, xilose, fucose, ramnose e apiose. O número de espécies moleculares individuais presentes em um extrato de *Quillaja* é enorme, como resultado das diferentes combinações possíveis da aglicona e dos açúcares (LABRIOLA & DEULOFEU, 1969; KARTNIG & RI, 1973; HIGUCHI *et al.*, 1987; HIGUCHI & KOMORI, 1987; HIGUCHI *et al.*, 1988; DEV *et al.*, 1989; KENSIL *et al.*, 1991; ROUHI, 1995). Na Figura II.3 apresenta-se, como exemplo, uma das espécies químicas de saponinas encontradas em quilaia.

Saponinas de quilaia, sendo usadas como aditivos para alimentos, foram submetidas a testes toxicológicos intensivos. Não foram observados efeitos tóxicos significativos em estudos de curta duração (13 semanas) de alimentação de ratos com dietas contendo até 4,0 % de extratos de quilaia (GAUNT *et al.*, 1974) ou de longa duração (84 semanas) com camundongos aos quais foram administradas dietas com níveis de saponinas tão altos quanto 1,5 % (PHILLIPS *et al.*, 1979). DRAKE *et al.* (1982) relataram a ausência de efeitos tóxicos em estudos de longa duração em ratos alimentados com rações contendo saponinas de *Quillaja* a níveis tão altos quanto 3,0 % por 2 anos.

ACIDO QUILAICO : $C_{30}H_{46}O_5$
(R1 = R2 = H)



SAPONINA DE QUILAIA

| R1 | R2 |
|--|---|
| $\begin{array}{c} \text{xil} \text{ --- } \text{glr} \text{ ---} \\ \\ \text{gal} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{fuc} \\ \\ \text{api} \text{ --- } \text{xil} \text{ --- } \text{ram} \\ \\ \text{glc} \end{array}$ |

FIGURA II.3. Saponina de *Quillaja saponaria* Molina.

3.3. Determinação quantitativa de saponinas

Os métodos para a análise qualitativa e quantitativa de saponinas em produtos vegetais são muitos e variam tanto em natureza quanto em confiabilidade. Incluem desde a medida de simples propriedades físicas (por exemplo, sua habilidade de formar espuma) e biológicas (por exemplo, seus efeitos hemolíticos), até o emprego de modernas técnicas cromatográficas e espectrofotométricas. Assim sendo, o método a ser utilizado dependerá, primordialmente, do tipo de informação desejada. As técnicas empregadas incluem gravimetria, hemólise, ensaio biológico, espectrofotometria e cromatografia (em camada delgada, em fase gasosa, líquida de alta eficiência, entre outras) (PRICE *et al.*, 1987).

A extração com solventes orgânicos tem sido utilizada para o isolamento de saponinas de plantas ou para purificação de extratos comerciais (BIRK *et al.*, 1963; APPLEBAUM *et al.*, 1969; BRAWN *et al.*, 1981; OAKENFULL, 1981).

Para a determinação de espécies químicas individuais, assim como do teor total de saponinas, técnicas cromatográficas foram desenvolvidas. Cromatografia em camada delgada tem sido o método mais empregado para a separação de frações intactas de saponinas (HIGUCHI *et al.*, 1987; KENSIL *et al.*, 1991) embora tenha sido também usada em análises quantitativas (FENWICK & OAKENFULL, 1981; FENWICK & OAKENFULL, 1983). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido utilizada para a quantificação e identificação de saponinas intactas, saponinas derivatizadas, e sapogenóis liberados assim com seus derivados (KAIZUKA & TAKAHASHI, 1983). A medição do teor total de saponinas tem sido feito com sucesso através da determinação das sapogeninas por CLAE ou cromatografia gasosa (CG). Os métodos envolvem a hidrólise ácida das saponinas para liberação das sapogeninas, que são extraídas do hidrolizado com solventes orgânicos e purificadas por cromatografia em coluna. As sapogeninas purificadas são quantificadas diretamente por CLAE ou derivatizadas e quantificadas por CG (BRAWN *et al.*, 1981; IRELAND & DZIEDZIC, 1985).

KENSIL *et al.* (1991) sugeriu que a separação de espécies individuais de saponinas em solução aquosa utilizando diálise, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão, não tem se mostrado efetiva devido à tendência das saponinas a formar micelas que interferem na separação. Portanto, para uma separação efetiva, é requerido o uso de solventes orgânicos ou sistemas água/solvente que solubilizam as saponinas anfífilas como monômeros. Os autores relataram que o uso de adsorção e cromatografia em fase reversa em solventes orgânicos permitiu a purificação de saponinas individuais a um nível significativamente maior que o atingido por outros autores.

As técnicas gravimétricas, baseadas simplesmente na quantificação do teor de saponinas purificadas, tem sido amplamente utilizadas na determinação do teor total de saponinas. Exemplos clássicos são a adsorção em carvão ativo, a precipitação pela adição de CaO em excesso, e a formação de compostos de adição com colesterol (PRICE *et al.*, 1987).

Alternativamente, muitos dos métodos utilizados para detecção de saponinas podem ser modificados para fornecer informação quantitativa (OAKENFULL, 1981). Neste sentido, estudos para definição das estruturas das saponinas tem sido historicamente conduzidos nas agliconas (sapogeninas) e oligosacarídeos resultantes da hidrólise ácida, usualmente realizada em ácidos minerais a quente. As sapogeninas assim liberadas podem ser quantificadas por métodos gravimétricos ou cromatográficos (BRAWN *et al.*, 1981; IRELAND & DZIEDZIC, 1985; HIGUCHI *et al.*, 1987; PRICE *et al.*, 1987).

3.4. Perspectiva analítica: a formação de complexos insolúveis

A formação de complexos entre algumas saponinas e 3 β -esteróis livres (colesterol em particular) é reconhecida há bastante tempo e utilizada na sua determinação quantitativa. Este fato constitui um dos antecedentes fundamentais para a concepção do processo.

WINDAUS (1909) descobriu que quando soluções alcoólicas de digitonina e colesterol eram misturadas, um complexo insolúvel era formado. Esta reação acontecia com o colesterol livre e não com seus ésteres, e compostos insolúveis eram também formados com sitosterol, β -colestanol, coprosterol e estigmasterol. WINDAUS (1910) propôs um método gravimétrico para determinação de colesterol baseado nesta reação, e determinou a solubilidade do complexo em etanol como 14 e 160 mg/100 ml a 18 e 72 °C, respectivamente; o complexo era insolúvel em água, acetona, éter, acetato de etila e benzeno.

A reação entre a digitonina e vários esteróis foi revista por BLADON (1958), focalizando as exigências estruturais para a formação de complexos. O autor indicou que a formação de complexos insolúveis com o colesterol não estava restrita à digitonina; as saponinas tigonina e gitonina e o alcalóide tomatina também produziam precipitados. As solubilidades dos complexos com tigonina e gitonina em álcool a 18 °C foram determinadas como 150 e 10 mg/100 ml, respectivamente.

Muitos outros glicosídeos também foram estudados como agentes precipitantes de colesterol, em sistemas onde o solvente era capaz de solubilizar tanto os lípidios como as saponinas em uma única fase, e muitos deles efetivamente formaram complexos com colesterol. Entretanto, estes glicosídeos foram descartados devido à alta solubilidade dos complexos formados em solução (e portanto pequena precipitação do complexo quando comparado à digitonina), ou ao fato de que produziam cores marcantes com o reagente de Liebermann-Burchard. Um exemplo é a tigonina, que forma um complexo com colesterol que é dez vezes mais solúvel que o formado com a digitonina (KABARA, 1961).

A formação de complexos com a digitonina tem sido utilizada na determinação de colesterol. SCHWARTZ *et al.* (1967) e KATZ & KEENEY (1967) desenvolveram procedimentos quantitativos rápidos para remoção de colesterol e fitosteróis da gordura do leite, utilizando uma coluna de terra diatomácea (Celite® 545) impregnada com digitonina. A gordura do leite solubilizada em hexano é passada através da coluna, seguida pela passagem de benzeno. Os esteróis são eluídos da

coluna com sulfóxido dimetila, que dissolve o complexo colesterol-digitonina, sendo o colesterol então recuperado por extração com uma mistura hexano-benzeno (1:1).

MICICH (1990) relatou que a digitonina, covalentemente ligada a polímeros, complexou colesterol a partir de soluções de colesterol e de óleo de manteiga em vários solventes (hexano, etanol 84%, água saturada com acetato de etila e benzeno). Os níveis de complexação de colesterol se mostraram dependentes do solvente: a complexação a partir do hexano foi máxima. Diferenças significativas de complexação existiram a partir das soluções colesterol-hexano e óleo de manteiga-hexano, sendo a última apenas 30% da primeira. A recuperação do colesterol das amostras de polímero foi feita com sucesso pela extração com benzeno a temperatura ambiente.

3.5. A atividade hemolítica de saponinas

A habilidade das saponinas de fazer inchar e finalmente romper eritrócitos, assim como de interagir com membranas de lipossomos, é reconhecida há bastante tempo e associada com sua interação com esteróis livres e ligados à membrana. Entretanto, cada saponina demonstra estas propriedades em grau diferente, dependendo de sua estrutura química característica e concentração (NAKAMURA *et al.*, 1979).

NISHIKAWA *et al.* (1984) estudaram a interação da saponina digitonina e seus análogos com variado comprimento da cadeia de carboidrato no que diz respeito à hemólise de eritrócitos, ativação de granulócitos e dano à membrana de lipossomos. Foi demonstrado que a alteração da cadeia de carboidrato afeta a atividade: removendo-se sucessivamente unidades de carboidratos, a atividade da digitonina diminui. Esta interação pode levar à formação de estruturas análogas a micelas (poros) em locais específicos na membrana, alterando sua permeabilidade (BANGHAM & HORNE, 1962; GLAUERT *et al.*, 1962; SEEMAN, 1974; AKIYAMA *et al.*, 1980; MILLER, 1984). Devido a suas propriedades de surfatante, as saponinas a concentrações mais altas podem também destruir completamente as membranas através da solubilização de seus componentes (BANGHAM & LEA, 1978; NAKAMURA *et al.*, 1979; AKIYAMA *et al.*, 1980).

As saponinas de quilaia apresentam atividades adjuvante e hemolítica potentes (DALSGAARD, 1974). KENSIL *et al.* (1991) obtiveram diversas frações purificadas de saponinas a partir de extratos aquosos de *Quillaja saponaria* e descobriram que

estas variam consideravelmente em toxicidade (medida pela letalidade em ratos) e atividades adjuvante e hemolítica; não foi encontrada correlação entre atividade hemolítica, letalidade e atividade adjuvante.

3.6. Perspectiva nutricional: a ação hipocolesterolêmica de saponinas

Embora com alguma controvérsia, há evidências abundantes de que saponinas presentes na dieta causam a diminuição da concentração de colesterol no sangue em várias espécies de animais e no homem. Alguns autores chegaram a propor que a ingestão de alimentos contendo saponinas poderia ser útil para reduzir o risco de ataques cardíacos em pacientes com altos teores de colesterol no sangue (POTTER *et al.*, 1980; OAKENFULL, 1981; OAKENFULL & TOPPING, 1983; OAKENFULL *et al.*, 1984; OAKENFULL & SIDHU, 1990).

TOPPING *et al.* (1980) e OAKENFULL *et al.* (1984) demonstraram que saponinas de quilaia reduzem a hipercolesterolemia induzida via dieta em ratos, e levam a aumentos significativos da eliminação de esteróis neutros nas fezes. RAO & KENDALL (1986) relataram efeitos hipocolesterolêmicos significativos mesmo em ratos não submetidos a uma dieta com alto teor de colesterol, o que sugere uma redução na reabsorção de ácidos biliares.

Os mecanismos propostos para o efeito hipocolesterolêmico incluem formação de agregados (micelas mixtas) ou de complexos pelas saponinas com colesterol ou com ácidos biliares no trato gastrointestinal. No caso do colesterol da dieta, seria evitada sua absorção. No caso dos ácidos biliares, estes se tornariam indisponíveis para reabsorção e seria aumentada sua eliminação pelas fezes, uma perda compensada pelo aumento da síntese a partir do colesterol endógeno, resultando em redução nos níveis de colesterol no sangue e fígado (OAKENFULL & SIDHU, 1983; SIDHU & OAKENFULL, 1986; OAKENFULL & SIDHU, 1990).

É relevante mencionar que efeito hipocolesterolêmico foi observado em estudos de ingestão de taninos por ratos (MURAMATSU *et al.*, 1986; YUGARANI *et al.*, 1992). Tais compostos estão usualmente presentes em extratos de quilaia, em quantidades variáveis e por vezes significativas, e podem estar envolvidos em sua ação hipocolesterolêmica.

3.7. A escolha das saponinas de quilaia

As evidências apresentadas até o momento demonstram a existência de interações preferenciais e específicas do colesterol com algumas saponinas. A formação de complexos insolúveis assim como de agregados micelares foi observada, dependendo da estrutura química da saponina utilizada e de sua concentração no sistema, entre outros fatores.

As saponinas de quilaia apresentam interações específicas com o colesterol, como demonstrado em estudos de sua ação sobre membranas e efeito hipocolesterolêmico de sua presença na dieta, pré-condição para uma eventual utilização em processos para remoção de colesterol. Considerando que objetiva-se o processamento de alimentos para consumo humano, a quilaia atende ainda a outros requisitos fundamentais: não é tóxica, apresenta um histórico de utilização como aditivo alimentar, e está disponível em escala comercial. Este conjunto de características é que justifica a seleção da quilaia como agente de remoção do colesterol da gordura láctea.

Observe-se que os mecanismos de ação das saponinas propostos incluem tanto 1) formação de complexos colesterol-saponinas insolúveis como 2) solubilização de colesterol em micelas e outras estruturas coloidais presentes em soluções aquosas de saponinas. O primeiro já foi descrito anteriormente na interação da digitonina (e seus análogos) com membranas, e na utilização da digitonina (e outras saponinas) em química analítica para determinação quantitativa de colesterol. O segundo fenômeno ainda não foi suficientemente abordado e uma pequena revisão sobre a formação de micelas e outras estruturas coloidais em solução aquosa e solubilização é apresentada a seguir.

4. Fenômenos de formação de estruturas coloidais em solução aquosa e solubilização

4.1. Formação de micelas

As moléculas individuais ou monômeros que podem tomar parte no processo de formação de micelas e outras estruturas coloidais formadas por tensoativos em solução aquosa são caracterizadas por possuírem duas regiões em sua estrutura química. Uma é a região hidrofóbica, e a outra é um grupo ionizado ou solúvel em água - a região hidrofílica da molécula. Esta natureza dupla é responsável pelas propriedades de formação de micela e outras estruturas coloidais, atividade de superfície e solubilização (ELWORTHY *et al.*, 1968; HALL & TIDDY, 1981; EVERETT, 1989).

A concentração limite do tensoativo na qual começa um extensivo processo de formação de micelas em solução é conhecida como "concentração de micela crítica" (CMC). Os processos de formação e destruição de micelas podem ser observados através da variação das propriedades físicas das soluções com a concentração do agente tensoativo. Na CMC, muitas propriedades da solução apresentam uma descontinuidade, e exemplos são condutividade, turbidez, pressão osmótica e tensão superficial. Informação sobre a CMC também pode ser obtida através da medida de outras propriedades coligativas como a elevação do ponto de ebulição e depressão do ponto de congelamento (ELWORTHY *et al.*, 1968; HALL & TIDDY, 1981; HIEMENZ, 1986).

Muitos fatores afetam a CMC, o tamanho e forma das micelas, tais como: a estrutura e comprimento da cadeia da região hidrofóbica e a natureza do grupo polar do surfatante, a adição de aditivos (sais, agentes rompedores da estrutura da água, álcoois, e outros agentes com atividade de superfície), temperatura, entre outros. Quando todos os outros fatores são iguais, algumas generalizações sobre o efeito individual de cada um destes fatores podem ser feitas como segue (ELWORTHY *et al.*, 1968; ROSEN, 1976; HALL & TIDDY, 1981; HIEMENZ, 1986; BOURREL & SCHECHTER, 1988):

- o número de agregação aumenta e a CMC diminui com o aumento do comprimento da cadeia de hidrocarboneto.

- detergentes não-iônicos formam micelas a concentrações mais baixas que os iônicos com comprimentos de cadeia de hidrocarboneto equivalente, devido à ausência do trabalho elétrico na transferência de monômeros dos primeiros da solução para as micelas.
- a adição de um eletrólito a soluções de surfatantes iônicos aumenta o número de agregação e diminui a CMC, principalmente como resultado da diminuição da espessura da atmosfera iônica que circunda os grupos iônicos e consequente redução da repulsão eletrostática entre estes grupos na estrutura micelar.
- os efeitos da temperatura na CMC para a maioria dos surfatantes iônicos são pequenos e, usualmente, a CMC aumenta continuamente com o aumento de temperatura.

Muitos métodos têm sido utilizados no estudo de sistemas micelares. Alguns exemplos são espalhamento de luz, equilíbrio de sedimentação, ultrafiltração, condutância, eletroforese, difração de raios X, e ressonância magnética nuclear. O espalhamento de luz é uma das ferramentas mais poderosas para a determinação de pesos moleculares e de micelas em solução; esta técnica também fornece informações sobre a CMC, a carga efetiva das micelas, e pode dar uma idéia da forma das micelas. Para a determinação da CMC de agentes tensoativos iônicos em água, além da técnica clássica de tensão superficial, a condutância é frequentemente utilizada devido à alta precisão possível nestes experimentos (ELWORTHY *et al.*, 1968; HALL & TIDDY, 1981; HIEMENZ, 1986; ADAMSON, 1990).

Dada a natureza anfifílica das moléculas de surfatantes, as micelas formam-se em solução aquosa como uma alternativa à acumulação em superfícies ou interfaces. Quando uma fase não-polar está presente, o surfatante então se acumula na interface e reduz sua tensão. Se a disponibilidade de interfaces é nula ou insuficiente, e a concentração de surfatante na água é aumentada, as micelas se formam. Portanto, a formação de micelas é uma alternativa à acumulação em interfaces (HARTLEY, 1976).

Em sistemas onde estão presentes interfaces ar-água e óleo-água assim como um adsorvente sólido, a formação de micelas em solução é um processo que compete com qualquer dos outros processos possíveis (por exemplo: acumulação nas interfaces, adsorção ao sólido, formação de estruturas organizadas que não as micelas como filmes e cristais líquidos) em que os monômeros participam (MITTAL & MUKERJEE, 1976).

4.2. Formação de outras estruturas coloidais em solução

Além da adsorção em interfaces, são muitos os modos de organização de surfatantes em soluções aquosas, resultando na formação de variadas estruturas de dimensões coloidais incluindo micelas e micelas reversas, cristais líquidos, bicamadas, vesículas e microemulsões. Estas estruturas coloidais são formadas como resultado de interações físicas (não ligações covalentes) entre moléculas anfifílicas (HIEMENZ, 1986).

A estrutura de micelas existentes a concentrações iguais ou pouco acima da CMC é bastante diferente da forma de organização das moléculas de surfatante em sistemas aquosos concentrados (HIEMENZ, 1986). Considerados fatores geométricos no empacotamento dos monômeros do surfatante, as micelas com baixo número de agregação (ca. 50 a 60) são usualmente esféricas; formas para micelas cujo número de agregação é muito alto para serem esféricas incluem cilindros e elipsóides (HALL & TIDY, 1981; BOURREL & SCHECHTER, 1988). A forma das micelas também pode ser alterada com a variação da temperatura, adição de eletrólitos ou concentração de surfatante (BOURREL & SCHECHTER, 1988).

Soluções contendo micelas que essencialmente não interagem entre si estão limitadas a uma faixa estreita de concentração localizada em regiões de concentração baixa de surfatante. Entretanto, de concentrações intermediárias para altas, fases líquidas conjugadas denominadas mesofases se formam, que são intermediárias entre as fases micelares (diluídas e isotrópicas) e as fases cristalinas de surfatantes puros. Estas mesofases são usualmente denominadas fases liotrópicas para denotar o fato de que as moléculas de solvente não estão uniformemente distribuídas nas estruturas, sendo mais numerosos em algumas regiões que em outras. Em soluções aquosas, água é concentrada naquelas partes contendo as porções hidrofílicas (BOURREL & SCHECHTER, 1988).

Assim, mesmo em misturas binárias de água e surfatante, uma ampla gama de estruturas e fases se formam. Usualmente as várias estruturas se sucedem numa sequência definida, relacionada com a proporção de água e surfatante (BOURREL & SCHECHTER, 1988). A baixas concentrações de surfatante acima da CMC observam-se as soluções micelares isotrópicas (S1). Aumentando a concentração de surfatante, fases liotrópicas cristalinas líquidas podem surgir, sendo usualmente a primeira a surgir formada por cilindros mutuamente paralelos em arranjo hexagonal (M1, "middle phase"). A concentrações mais elevadas pode surgir uma fase anisotrópica com estrutura de lamela ou bicamadas (G, "neat phase"). Entre M1 e G

outras mesofases às vezes ocorrem: uma anisotrópica, na qual cilindros longos mutuamente paralelos estão em arranjo retangular, e outra isotrópica, bastante viscosa, que acredita-se seja constituída de elementos cilíndricos pequenos, com relação axial próxima de um, arrançados em cubo e formando uma rede tridimensional (HALL & TIDY, 1981; BOURREL & SCHECHTER, 1988).

4.3. Solubilização em estruturas coloidais

A solubilização pode ser definida como a "preparação de uma solução isotrópica termodinamicamente estável de uma substância normalmente insolúvel ou muito pouco solúvel (o solubilizado) em um determinado solvente, pela introdução de um componente ou componentes anfífilicos adicionais" (ELWORTHY *et al.*, 1968).

Há um volume consistente de informações na literatura demonstrando que soluções de surfatantes acima da CMC são capazes de dissolver quantidades substanciais de solutos insolúveis em água. Portanto, o aumento de solubilidade tem sido correlacionado com propriedades coloidais. Mais ainda, a ausência de solubilização abaixo da CMC tem sido observada por vários autores, e esta observação desdobrou-se em um dos métodos muito utilizados para a determinação da CMC de um agente tensoativo (ELWORTHY *et al.*, 1968; HALL & TIDY, 1981; EVERETT, 1989).

A determinação da concentração de solubilizado que pode ser incorporada em um determinado sistema surfatante-água, com a manutenção de uma solução isotrópica, é do maior interesse. A concentração de saturação (máxima) do solubilizado para uma determinada concentração de surfatante é denominada a "concentração máxima do aditivo" (CMA). Há vários fatores que influenciam a solubilização em sistemas aquosos e uma lista parcial incluiria as naturezas do agente tensoativo e do solubilizado, a concentração do agente tensoativo, temperatura, e a possível adição de outros compostos (eletrólitos e não-eletrólitos). Em geral, fatores que promovem a formação de micelas aumentam a solubilidade dos solubilizados a uma determinada concentração de surfatante (MUKERJEE, 1976). Assim, surfatantes com menor CMC irão solubilizar solutos hidrofóbicos a concentrações menores de surfatante que um de maior CMC. Uma micela com maior número de agregação geralmente tem uma melhor capacidade de solubilizar solutos hidrofóbicos (MACKAY, 1987); o tamanho da micela usualmente determina também sua propensão a extrair solutos.

A visão apresentada até o momento é de que, acima da CMC, solutos que seriam normalmente insolúveis ou muito pouco solúveis em água dissolvem extensivamente em soluções de surfatantes, resultando em soluções isotrópicas e termodinamicamente estáveis, nas quais o soluto é incorporado em micelas. Esta é uma visão estreita da solubilização, na qual se considera somente a incorporação do solubilizado a partir de soluções aquosas de surfatantes.

Este sistema de 3 (três) componentes pode tomar uma proporção muito maior e diagramas de fase, construídos experimentalmente, descrevem todas as possibilidades. Tais diagramas ternários podem ser bastante complexos em sistemas contendo surfatantes e, construídos a pressão e temperatura constantes, permitem a presença de várias regiões compostas de uma, duas ou três fases em equilíbrio. Em regiões de duas fases, linhas retas são traçadas entre pontos apresentando as composições das fases em equilíbrio. As regiões de três fases tem forma triangular e as coordenadas dos vértices destas regiões fornecem as composições das fases em equilíbrio (HIEMENZ, 1986).

Na descrição do comportamento de fases dos sistemas ternários água - surfatante - líquido orgânico, as seguintes fases estão usualmente presentes (BOURREL & SCHECHTER, 1988):

- solução micelar (S1): opticamente isotrópica, composta por micelas normais mais ou menos esféricas, contendo líquidos orgânicos solubilizados.
- solução contendo cilindros indefinidamente longos, mutuamente paralelos, em arranjo hexagonal (M1, "normal middle phase"): trata-se de uma fase opticamente anisotrópica, com os cilindros consistindo de surfatantes arranjados mais ou menos radialmente. As partes hidrofílicas estão em contato com a fase aquosa contínua que envolve tais estruturas cilíndricas. As estruturas cilíndricas formadas pelo surfatante contém o líquido orgânico.
- solução opticamente anisotrópica, contendo camadas duplas de moléculas de surfatante, com as partes hidrofílicas posicionadas nas interfaces com camadas de água intermediárias (G, "neat phase").
- solução contendo cilindros indefinidamente longos, mutuamente paralelos, em arranjo hexagonal (M2, "inverted middle phase"): fase opticamente anisotrópica, análoga estruturalmente à M1, mas com as partes lipofílicas arranjadas de modo que fiquem em contato com a fase orgânica contínua. As estruturas cilíndricas formadas pelo surfatante contém a água.

- solução micelar inversa (S2): opticamente isotrópica, composta por micelas reversas mais ou menos esféricas contendo água solubilizada.

HIEMENZ (1986) apresentou um exemplo simples ilustrativo, representado pelo diagrama de fases do sistema ternário água - ácido hexanóico - dodecil sulfato de sódio (SDS) a 25 °C, identificando 7 (sete) regiões diferentes indicadas a seguir:

- região de dois líquidos: região de 2 fases na qual duas soluções líquidas, cada uma contendo os três componentes, estão em equilíbrio.
- região de micela normal (S1): região de 1 única fase - solução líquida isotrópica e homogênea, na qual o solvente é água e micelas de SDS contêm ácido hexanóico.
- região de micela reversa (S2): região de 1 única fase - solução líquida isotrópica e homogênea, na qual o solvente é o ácido hexanóico e micelas de SDS contêm água.
- região de cristal líquido: região de 1 única fase - solução líquida anisotrópica, nas quais os 3 componentes combinam-se para formar estruturas organizadas.
- região de S1 + cristal líquido: região de 2 fases, em que a fase líquida isotrópica micelar (S1) existe em equilíbrio com a fase cristalina líquida.
- região de S2 + cristal líquido: região de 2 fases, em que a fase líquida isotrópica de micelas reversas (S2) existe em equilíbrio com a fase cristalina líquida.
- região sólida: região em que o sistema se torna saturado pelo surfatante, e o surfatante sólido precipita.

Diagramas de fase de sistemas ternários podem ser bastante complexos, podendo conter vários cristais líquidos diferentes e várias regiões triangulares (nas quais três fases distintas estão em equilíbrio). O aparecimento de algumas ou todas as fases intermediárias de cristais líquidos (M1, G, M2, entre outras) depende de vários fatores, incluindo a estrutura do surfatante, temperatura, adição de sais e presença ou ausência de certos aditivos (HIEMENZ, 1986; BOURREL & SCHECHTER, 1988).

4.4. Solubilização de colesterol em estruturas coloidais

Praticamente insolúvel em água, o colesterol é facilmente solubilizado em soluções contendo compostos anfifílicos. BRUCKDORFER & SHERRY (1984) mediram a solubilidade aparente de colesterol em água pura a 37 °C: as solubilidades "sem centrifugação" e "após centrifugação" (a 20.000 x g por 30 minutos, com colesterol determinado no sobrenadante) obtidas foram de 1,64 e 0,31 µg/ml, respectivamente. A solubilização de colesterol em soluções aquosas de surfatantes tem sido estudada numa variedade de sistemas distintos, particularmente objetivando o entendimento de suas funções estruturais e funcionais em sistemas biológicos.

Foi descoberto que fosfolipídeos proporcionam um ótimo veículo para solubilização de colesterol em meio aquoso, tendo sido preparadas soluções límpidas na faixa de 1,65 mg/ml (FLEISCHER & BRIERLEY, 1961). HOYES & SAUNDERS (1966) relataram a dispersão de colesterol e de vários esteróis em sós de lecitinas de ovos, nos quais o colesterol demonstrou comparativamente a maior extensão de solubilização. LUCY & GLAUERT (1964) e BANGHAM & HORNE (1964) estudaram as estruturas macromoleculares formadas em soluções de várias misturas de lecitinas, colesterol e saponinas.

LUCY & GLAUERT (1964) estudaram as estruturas macromoleculares formadas por saponinas comerciais de *Gypsophila* (estruturalmente análogas às de *Quillaja*) e por estas saponinas e colesterol, utilizando soluções aquosas a concentrações de saponinas de 0,05 e 0,5 % (0,5 e 5 g/ml, respectivamente). Em soluções aquosas contendo somente saponinas a 0,05 % observaram-se estruturas globulares (micelas) de diâmetro entre 4 e 7,4 nm, enquanto que a 0,5 % estruturas cilíndricas e arranjos hexagonais destas em paralelo (cristal líquido - "middle phase") foram observadas. As estruturas formadas pela dissolução de colesterol nas soluções contendo saponinas nas mesmas concentrações foram identificadas como cristais líquidos (cilindros em arranjo hexagonal - "middle phase" ou lamelas - "neat phase").

É reconhecida a importância de micelas e micelas mistas no transporte e absorção de lipídios e como solubilizadores de colesterol em sistemas fisiológicos. Os sais biliares (tensoativos formadores de micelas) em particular foram extensivamente estudadas pela sua ação nos processos de absorção de gorduras (FLORENCE, 1976).

Uma representação esquemática das transformações físico-químicas envolvidas na transferência de lipídios da dieta, presentes na forma de uma emulsão no trato gastro-intestinal, para os tecidos, foi apresentada por BORGSTROM (1964). Neste processo, a bile (cujos componentes principais de interesse são os ácidos biliares, os fosfolipídios, principalmente lecitina, e colesterol) é um dos principais sucos digestivos envolvidos. Os ácidos biliares, como detergentes aniônicos acima da CMC, solubilizam em suas micelas lipídios polares e não-polares, incluídos os ácidos graxos e monoglicerídeos gerados pela ação da lipase pancreática, em um processo seletivo de partição.

Os sistemas ternários lecitina - colato de sódio - água e lecitina - mistura de sais biliares - água foram estudados por SMALL *et al.* (1966), que relataram a existência de 17 e 15 regiões distintas, respectivamente, nos diagramas de fase. Ambos os sistemas apresentaram 4 regiões de uma única fase (uma de solução isotrópica e três de cristais líquidos: hexagonal, cúbico e lamela). Foram também indicadas nestes sistemas, respectivamente, 8 e 7 regiões de duas fases e 5 e 4 regiões de três fases.

BOURGÉS *et al.* (1967a) estudaram os sistemas ternários colesterol-lecitina-água e demonstraram a existência de 1 região de uma única fase (cristal líquido), 2 de duas fases (colesterol cristalino - cristal líquido e água - cristal líquido) e 1 de três fases (colesterol cristalino - água - cristal líquido).

BOURGÉS *et al.* (1967b) estudaram o sistema quaternário lecitina - colato de sódio - colesterol - água e demonstraram a existência de 4 regiões distintas de uma única fase (uma isotrópica micelar e três de cristais líquidos: cúbico, hexagonal e lamela). A região isotrópica micelar diminui com o aumento da concentração global de colesterol no sistema, deixando de existir a concentrações acima de 4 %. O ponto de maior concentração de colesterol solubilizado em solução micelar, corresponde a 35% água, 31% lecitina, 31% colato de sódio e 4% colesterol (65% de sólidos totais).

Uma revisão dos trabalhos sobre a solubilidade de colesterol em bile artificial (sistema quaternário ácidos biliares - lecitina - colesterol - água) foi feita por CAREY & SMALL (1975), que relataram importantes efeitos da metodologia empregada, temperatura, força iônica, porcentagem de sólidos totais e tempo de contato nos dados de solubilidade no equilíbrio obtidos.

A distribuição de colesterol entre as fases de um sistema óleo-micela, composto por glicerídeos e ácidos graxos em contato com uma solução micelar de sais biliares, foi estudada por FELDMAN & BORGSTROM (1966) usando filtração em gel. Estes autores relataram que, na presença da fase de óleo dispersa em uma solução de

surfatante acima da CMC, um equilíbrio é atingido entre as duas fases e o colesterol se distribui entre elas. Na presença da fase de óleo, a saturação da fase aquosa micelar não foi atingida, ou seja, menos colesterol era incorporado nas micelas do que poderia ser previsto de sua solubilidade em soluções aquosas de sais biliares. A concentração de colesterol solubilizado na fase micelar aumentou continuamente com o aumento de concentração dos sais biliares acima da CMC, e resultou em aumento do tamanho da micela.

4.5. Formação de estruturas coloidais e solubilização em soluções aquosas de saponinas

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

MITRA & DUNGAN (1997) utilizaram medidas de tensão superficial e solubilização de corante para demonstrar que saponinas de quilaia formam micelas em solução aquosa acima de CMC's bem definidas, na faixa de 0,5 a 0,8 g/l a 25 °C. Valores da CMC aumentaram com a elevação de temperatura e pH, enquanto que o aumento da concentração de sal promoveu sua redução. As micelas apresentaram raio hidrodinâmico entre 3,4 e 3,7 nm a concentrações entre 2,5 e 14 g/l, em boa concordância com OAKENFULL (1986). Algumas diferenças entre saponinas de quilaia obtidas de fontes comerciais distintas foram observadas quanto à CMC, capacidade de solubilizar diclorofluoresceína, tamanho e número de agregação das micelas.

Utilizando técnicas de viscometria e espalhamento de luz, OAKENFULL & SIDHU (1983) demonstraram que saponinas de *Saponaria officinalis* purificadas formavam grandes micelas mistas com ácidos biliares *in vitro*; a micelização também reduziu em 73% a diálise do colato de sódio através de uma membrana. Efeitos similares foram observados *in vivo*, com saponinas reduzindo em muito a taxa de absorção do colato a partir de soluções circuladas através de seções dos intestinos de ratos (SIDHU & OAKENFULL, 1986). A formação de micelas mistas foi proposta como um mecanismo para o aumento observado na eliminação de sais biliares pelas

fezes, em resposta à ingestão de saponinas, e consequente diminuição dos níveis de colesterol no sangue.

Saponinas purificadas de *Quillaja saponaria* e *Saponaria officinalis* formam grandes agregados micelares com ácidos biliares em soluções aquosas "in vitro". Medidas de espalhamento de luz e depressão do ponto de congelamento indicaram que saponinas de *Quillaja* isoladamente formam grandes micelas em solução aquosa, com aproximadamente 3 nm de raio hidrodinâmico e 50 moléculas cada (peso micelar de 58.500), e que micelas mistas muito maiores são formadas com ácidos biliares (peso micelar de 350.000). A microscopia eletrônica das micelas mistas de saponinas de quilaia com colato de sódio mostrou estruturas cilíndricas alongadas, com comprimento médio de 56 nm, estruturas propostas como sendo resultado do "empilhamento" das agliconas das saponinas entremeadas por dímeros de ácidos biliares (OAKENFULL & SIDHU, 1983; OAKENFULL, 1986).

Saponinas de *Saponaria officinalis* e saponinas de soja também formaram micelas em solução aquosa, tanto isoladamente como com ácidos biliares, mas as características das micelas formadas eram diferentes para cada saponina (OAKENFULL & SIDHU, 1983; OAKENFULL, 1986). A formação destas micelas mistas no intestino delgado foi sugerida como uma explicação de base molecular para os efeitos de saponinas no metabolismo dos ácidos biliares e colesterol (SIDHU & OAKENFULL, 1986).

BARLA et al. (1979) construíram o diagrama de fases do sistema ternário saponinas (*Gypsophila* spp) - monoglicerídeos - água e relataram a existência de regiões de uma, duas e três fases. Foram identificadas regiões de micelas normais, micelas reversas e cristais líquidos (em arranjos cúbicos e de lamela).

Extratos de quilaia são misturas complexas de saponinas com outros componentes das cascas de *Quillaja saponaria* Molina, dentre os quais os taninos (LEUNG, 1980). Efeito hipocolesterolêmico foi observado na ingestão de taninos por ratos (MURAMATSU et al., 1986; YUGARANI et al., 1992). SIMON et al. (1994) e HUH et al. (1996) estudaram a interação entre taninos (ácido tânico e seus análogos) e bicamadas de fosfolipídios. Os autores demonstraram que a incorporação de taninos em bicamadas resultou em maior interpenetração das cadeias de hidrocarboneto das monocamadas, reduzindo sua espessura. O aumento da adesão entre bicamadas justapostas foi provocado pela partição de taninos na região interfacial, num efeito ponte, reduzindo o espaço fluido entre elas. Estes efeitos foram associados ao caráter anfifílico e características estruturais dos taninos, que permitem sua inserção em bicamadas e na região interfacial entre elas. Tais constatações são relevantes

quando consideradas em conjunto porque sugerem o potencial de atuação associada de taninos e saponinas, ambos presentes nos extratos de quilaia, no efeito hipocolesterolêmico e, sendo ambos anfifílicos, poderiam participar nas estruturas coloidais propostas como atuantes no efeito hipocolesterolêmico de extratos de quilaia.

MOREIN *et al.* (1984) relataram que saponinas de *Quillaja* se associam com glicoproteínas para formar micelas a uma concentração igual ou maior que 0,03%. Relatos também foram feitos sobre saponinas como agentes da solubilização de outros compostos insolúveis (ou muito pouco solúveis) em água, tais como outras saponinas e corantes sintéticos.

MORITA *et al.* (1986) relataram que: 1) a solubilidade da saikosaponina-A (pouco solúvel em água) foi significativamente aumentada em soluções aquosas de outras saponinas (hemslosideos Ma2 e Ma3) próximo à CMC; 2) a tensão superficial das soluções destes hemslosideos diminuiu com o aumento de sua concentração em solução; 3) a tensão superficial e a CMC das soluções do hemslosideo Ma3 diminuíram com a diminuição do pH, mantidos fixos a temperatura e a força iônica. Estas descobertas são relevantes pois ambos os hemslosideos tem como aglicona um triterpeno, ambos são bisdesmosídicos (isto é, contém duas cadeias de carboidratos ligadas à aglicona) e são aniônicos (devido à presença do ácido glicurônico), características estruturais análogas às das saponinas de *Quillaja saponaria*.

KASAI *et al.* (1986) isolaram e identificaram o tubeimosídeo I, uma saponina bisdesmosídica triterpênica, e demonstraram a solubilização de 78,4 μM do corante sintético amarelo OB (completamente insolúvel em água) nas soluções aquosas desta saponina, além de um aumento significativo da solubilidade da saponina A (de 0,017 mg/ml em água pura para 30 mg/ml em uma solução de tubeimosídeo I a 1 mg/ml). Saponinas bisdesmosídicas triterpênicas isoladas de *Sapindus mukurossi* também aumentaram substancialmente as solubilidades em meio aquoso de outras saponinas monodesmosídicas, além de mostrar efeito solubilizador do corante amarelo OB e progesterona (NAKAYAMA *et al.*, 1986).

5. Processos de separação baseados em surfatantes

Há um movimento global que busca o desenvolvimento de uma nova geração de processos industriais de separação, baseados no uso de surfatantes, que encontrarão crescente utilização em áreas de aplicação que incluem a biotecnologia, o controle de poluição e a conservação de energia. Exemplos destas técnicas, de interesse particular para o presente trabalho, foram apresentados na publicação de SCAMEHORN & HARWELL (1989), e incluem as separações baseadas na extração (solubilização/partição dos solutos em micelas, micelas reversas, e outras estruturas coloidais) e aquelas baseadas na adsorção (solubilização/partição dos solutos em camadas de surfatantes adsorvidos em suportes sólidos). No segundo grupo se inclui a cromatografia admicelar (*admicellar-enhanced chromatography* - AEC), um novo processo de separação em leito fixo baseado no uso de surfatantes para induzir a adsorção de um soluto a partir de uma solução aquosa, descrito por SCAMEHORN & HARWELL (1989).

Introduzir as separações baseadas na extração e na adsorção é relevante para este trabalho uma vez que se admite a inserção de colesterol em estruturas coloidais de saponinas como possível mecanismo de separação. Neste caso, estariam contempladas tanto as separações baseadas unicamente na extração, com a solubilização/partição dos solutos em estruturas coloidais (micelas e/ou cristais líquidos) presentes em solução aquosa, como também as baseadas na adsorção, com a solubilização/partição dos solutos em camadas de surfatantes adsorvidos em suportes sólidos.

5.1. Separações baseadas na extração

CHRISTIAN & SCAMEHORN (1989) descreveram processo de remoção de compostos orgânicos dissolvidos em soluções aquosas, baseado na solubilização em micelas associada à ultrafiltração. Neste processo, surfatante é adicionado à solução aquosa contendo os compostos orgânicos, de modo que uma elevada fração do surfatante esteja na forma de micelas. A solução resultante é passada através de um ultrafiltro cujos poros seja menores que as micelas, de modo que a maior parte do surfatante e do soluto orgânico permanecem nas micelas do retentado. A solução que permeia através da membrana é, em muitos casos, praticamente água pura.

HATTON (1989) descreveu a extração de proteínas em micelas reversas, no sistema água - hidrocarboneto - surfatante. Trata-se de um processo de extração líquido - líquido, no qual proteínas contidas em soluções aquosas particionam em micelas reversas formadas em solventes orgânicos. Fatores que afetam a solubilização da proteína incluem pH, força iônica, tipo de sal, estrutura do solvente e concentração do surfatante.

FRIBERG & NEOGI (1989) descreveram a possibilidade de separações em sistemas água - óleo - surfatante baseadas no fato de que a capacidade de solubilização de hidrocarbonetos de surfatantes não - iônicos apresenta extrema dependência da temperatura. Assim, as variações dos diagramas de fase com a temperatura podem oferecer, em princípio, um método de extração / separação eficiente e elegante.

Generalizando os princípios apresentados anteriormente e nesta seção, o conhecimento dos diagramas de fase pode oferecer oportunidades bastante interessantes de separação de solutos insolúveis ou pouco solúveis em água, em sistemas quaternários água - óleo - surfatante - soluto, de interesse particular no presente trabalho. Através do manuseio das proporções dos componentes e de parâmetros de processo (tais como temperatura, força iônica, pH (para surfatantes ácidos), entre outros), pode-se posicionar a composição global do sistema em regiões que apresentem uma separação adequada de fases, entre as quais existam diferenças substanciais de concentração do soluto de interesse. Deste modo, o soluto pode ser concentrado na fase aquosa (contendo micelas e/ou cristais líquidos), permitindo sua extração do óleo.

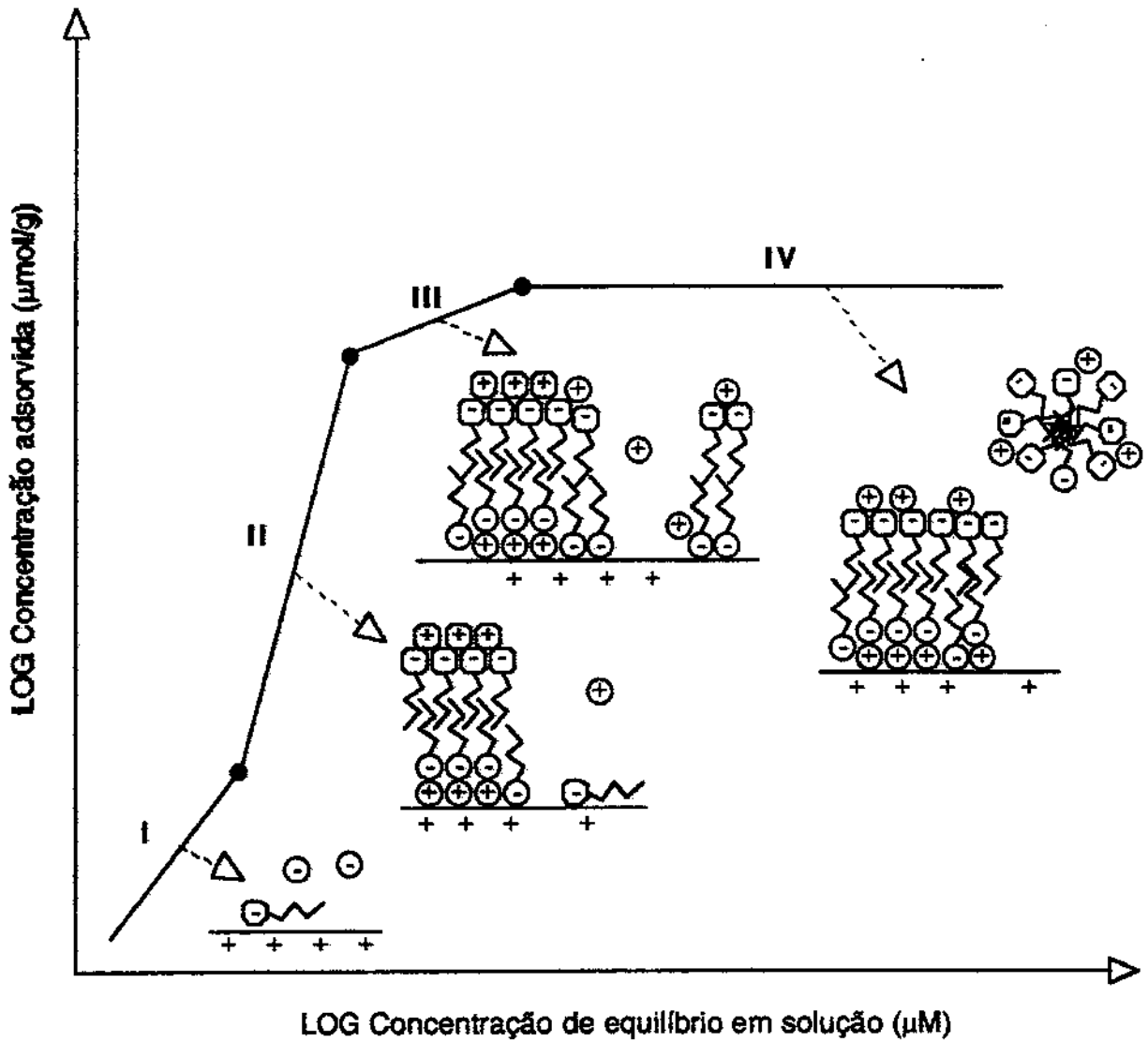
5.2. Separações baseadas na adsorção

É um fato conhecido que surfatantes tendem a agregar na interface sólido-líquido, formando monocamadas (hemimicelas) ou bicamadas (admicelas) de surfatantes adsorvidos reversivelmente numa fase sólida. Os fatores que controlam a adsorção incluem os tipos de surfatante, solvente e substrato, assim como a temperatura, o pH, a concentração do eletrólito adicionado, a ligação de contra-ions, e a presença de solutos adsolubilizados (HARWELL & O'REAR, 1989).

O fenômeno de formação da admicela é de importância crucial para a cromatografia admicelar (AEC), e descrito através de isotermas de adsorção dos surfatantes. Uma típica isoterma de adsorção de um surfatante iônico em um óxido

metálico é mostrada na Figura II.4, que ilustra a existência de várias regiões distintas, explicitadas a seguir (SOMASUNDARAN & FUERSTENAU, 1966; BISIO *et al.*, 1980; SCAMEHORN *et al.*, 1982; HARWELL *et al.*, 1985; BITTING & HARWELL, 1987; HARWELL & O'REAR, 1989):

- Região I: corresponde a uma baixa cobertura da superfície pelo surfatante e à ausência de indicação de formação de agregados de surfatante na superfície. Nesta região, a quantidade adsorvida cresce linearmente com a concentração da solução de surfatante em equilíbrio com a superfície. Propõe-se como mecanismo predominante a adsorção individual de monômeros de surfatante no substrato.
- Região II: a transição da região I para região II ocorre quando inicia-se a formação de agregados de surfatante na superfície do óxido mineral, como indicado pelo brusco aumento da inclinação da isoterma. Estes agregados, denominados hemimicelas (monocamadas) ou admicelas (bicamadas) para enfatizar que aspectos de sua estrutura e comportamento são análogos às micelas, são formados de maneira localizada, ocorrendo a adsorção em determinados sítios da superfície. Monômeros ainda são adsorvidos individualmente em sítios menos energéticos da superfície, mas esta contribuição para a adsorção total é desprezível. A concentração na qual a transição I-II ocorre é denominada concentração da hemimicela, concentração crítica da hemimicela, ou concentração crítica da admicela.
- Região III: esta região, de reduzida inclinação da isoterma, é distinguida em alguns trabalhos. Há controvérsia sobre se há ou não uma mudança no mecanismo de adsorção na transição II-III, assim como se os agregados formados na região III são admicelas, hemimicelas, ou uma combinação das duas. Há trabalhos conflitantes sugerindo que somente monocamadas são formadas, que a formação de bicamadas somente começa após a conclusão da monocamada, ou que estruturas de monocamada e de bicamada convivem nas regiões II e III. Acredita-se que esta redução na inclinação se origina da repulsão eletrostática de íons da superfície (devido à mudança de sinal da carga da superfície) ou da existência de uma distribuição de energias dos sítios de adsorção.
- Região IV: a transição III-IV ocorre usualmente quando a concentração crítica de micela (CMC) do surfatante no sobrenadante é atingida. Esta região IV é um platô onde a adsorção é máxima, resultante da saturação ou completa cobertura da superfície por uma bicamada.



Fonte: BITTING & HARWELL (1987)

FIGURA II.4. Isoterma típica de adsorção de um surfatante iônico, a partir de uma solução aquosa, em óxido mineral.

Independentemente da natureza exata das estruturas adsorvidas, a questão principal é que agregados de surfatantes podem ser criados na superfície do suporte de modo a viabilizar a separação de solutos por AEC. A partir da Figura II.4, nota-se que a adsorção de surfatante aumenta com o aumento da sua concentração na solução até a estabilização (isto é, até atingimento do platô onde a adsorção é máxima). Este platô de adsorção máxima, que ocorre quando a CMC do surfatante no sobrenadante é atingida, resulta da saturação da superfície em sistemas aplicáveis à AEC.

As forças primordiais envolvidas na formação destes agregados de surfatantes iônicos em superfícies de óxidos metálicos são as interações eletrostáticas, entre as cargas existentes nas partes hidrofílicas do surfatante e na superfície mineral, e as interações das "caudas" de hidrocarbonetos, explicadas usualmente em termos do efeito hidrofóbico. Outro aspecto de primordial importância na adsorção de surfatantes é o papel de heterogeneidades na superfície, com a forma da isoterma sendo relacionada com a distribuição de energias de adsorção (HARWELL *et. al*, 1985; BITTING & HARWELL, 1987).

No processo de solubilização, moléculas de solutos e íons podem ser concentrados ou associados a micelas do surfatante em solução. Um processo similar ocorre com admicelas e hemimicelas na adsolubilização, com a localização de moléculas de soluto na interface sólido-líquido através da interveniência de moléculas de surfatante adsorvidas. A partição de espécies químicas em admicelas aparenta ser bastante geral, com solutos adsolubilizados incluindo alcanos lineares de baixo peso molecular, alcoóis alifáticos, e fenóis (HARWELL & O'REAR, 1989).

Em AEC, uma camada adsorvida de surfatante é formada reversivelmente na superfície de empacotamento, usualmente um óxido metálico. Moléculas de soluto de um fluido em processo particionam na camada de surfatante em um fenômeno chamado adsolubilização, que é um análogo em superfície da solubilização em micelas. Quando a camada de surfatante - ou, equivalentemente, o leito - se torna saturada com o soluto, a camada de surfatante contendo o soluto é removida do empacotamento através de uma mudança de pH no fluido que está sendo admitido ao leito. Isto pode ser facilmente realizado devido à natureza do fenômeno de carregamento elétrico da superfície que é inicialmente utilizado para induzir a formação da camada de surfatante. A concentração do soluto no fluido contendo o material removido do leito pode ser ajustada através do controle de pH da solução removedora, e pode ser muito mais alta que a concentração original do soluto no fluido em processo. A AEC tem sido empregada em aplicações em escala de bancada, tanto para concentrar como para separar solutos de soluções aquosas, e mostra potencial como um método em escala industrial de separação (HARWELL & O'REAR, 1989).

6. Estado da arte da separação de colesterol usando saponinas

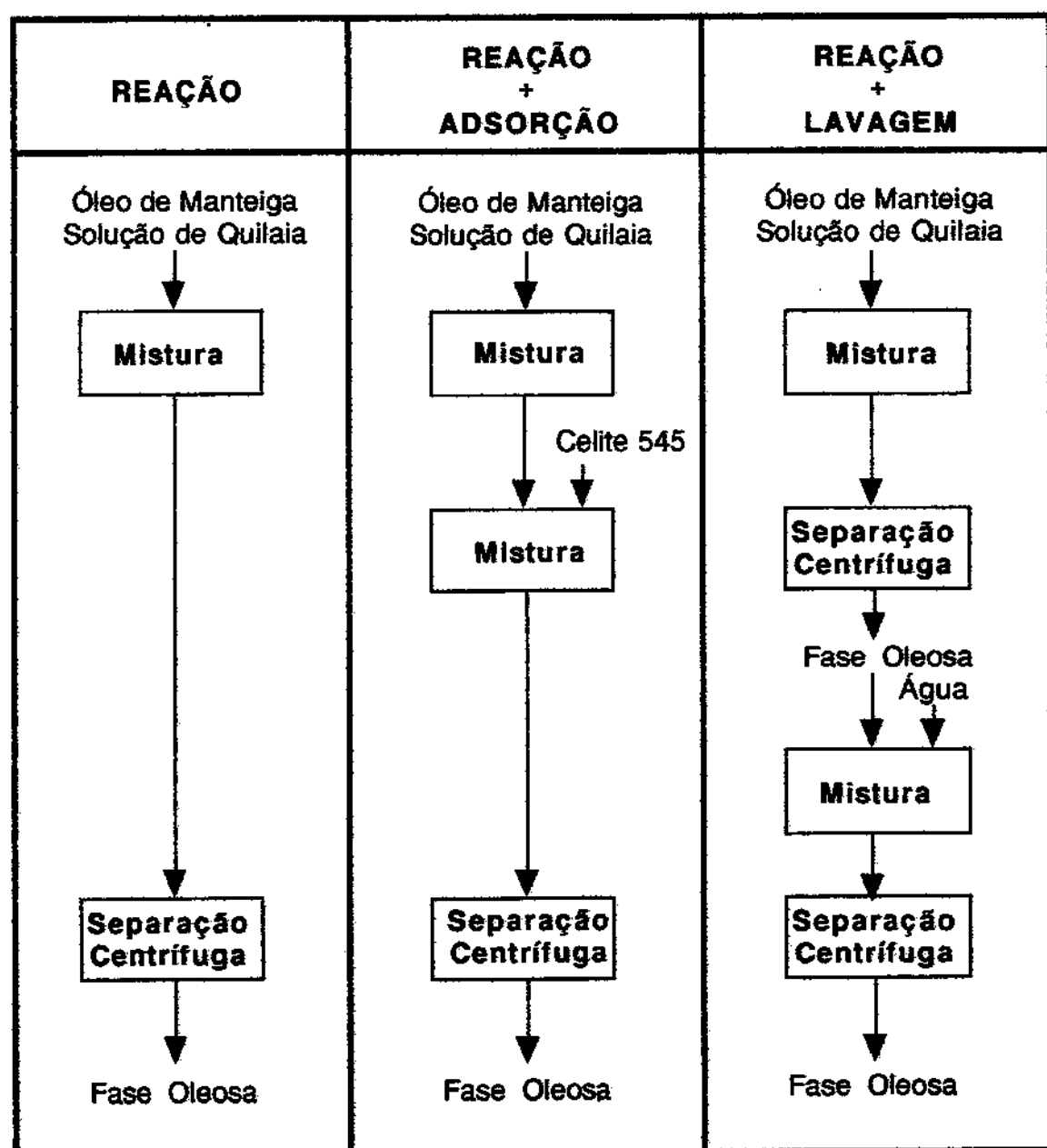
As maiores preocupações na utilização de compostos que interagem seletivamente com colesterol, com a formação de complexos ou agregados, são: baixo rendimento, qualidade do produto final (devido à interação não específica com componentes do aroma e sabor), custos de produção (se a reciclagem dos agentes da separação não é feita), assim como problemas com a legislação de alimentos associados à toxicidade do agente da separação e à sua eventual presença no produto final como um contaminante residual (WISCONSIN MILK MARKETING BOARD, 1989; MORRIS, 1990).

Processos baseados na utilização de compostos que interagem seletivamente com colesterol têm, entretanto, o potencial de serem implementados com equipamentos já disponíveis na indústria de laticínios e com custos operacionais mais baixos. Baixos rendimentos e alteração na qualidade do produto podem ou não vir a acontecer, dependendo da seletividade do agente de separação pelo colesterol, e da eficiência do processo utilizado para separar os complexos ou agregados da gordura final. Problemas legais devem ser mínimos (ou mesmo inexistentes) se agentes de separação com grau alimentício (como a quilaia) forem empregados.

Saponinas de beterraba foram propostas como agentes para remoção de colesterol numa patente de processo (INDUSTRIAL Y FORESTAL S.A.C., 1991). No processo proposto, as saponinas de beterraba purificadas são adicionadas ao leite líquido, promovendo-se a formação de complexos insolúveis com o colesterol livre, os quais são removidos por filtração. O produto final apresenta teor de colesterol reduzido em até 95%. Entretanto, nada se comenta quanto a: 1) disponibilidade comercial das saponinas purificadas e sua situação frente à legislação de alimentos, 2) eventual presença de saponinas residuais no produto tratado e suas implicações legais e sensoriais, ou 3) viabilidade de sua recuperação para reutilização.

A remoção de colesterol do óleo de manteiga (*butteroil*) utilizando soluções aquosas de um extrato comercial de *Quillaja saponaria* em pó (sem nenhuma purificação adicional) foi proposta em estudos realizados na Universidade da Califórnia-Davis (SUNDFELD, 1992; SUNDFELD *et al.*, 1993a; SUNDFELD *et al.*, 1993b; THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 1994). Este produto, comercialmente denominado "quilaia", está disponível no mercado e é oferecido como aditivo para alimentos. Os processos estudados são apresentados esquematicamente na Figura II.5 e os resultados obtidos sumarizados a seguir:

- o processo denominado REAÇÃO, envolvendo a exposição do óleo de manteiga a soluções aquosas de quilaia, resultaram em uma significativa redução do teor de colesterol do óleo, particularmente quando soluções de quilaia a concentrações mais elevadas foram utilizadas.
- o processo denominado REAÇÃO+LAVAGEM, envolvendo a lavagem com água do óleo resultante do processo de Reação, resultou em remoção adicional de colesterol.
- o processo denominado REAÇÃO+ADSORÇÃO, envolvendo a adição de terra diatomácea (Celite® 545) ao sistema bifásico óleo de manteiga/solução de quilaia resultante do processo de Reação, eleva ainda mais os níveis de remoção de colesterol.
- em estudos em que a influência de cada parâmetro foi estudada individualmente, demonstrou-se que os níveis de remoção de colesterol alcançados pelos processos são dependentes da concentração da solução de quilaia, da quantidade de terra diatomácea adicionada, do pH e da temperatura; não foi examinada a possibilidade de ação conjunta destes parâmetros.
- componentes da quilaia utilizada estavam presentes no óleo resultante do processo de Reação, mas tanto a etapa de Adsorção quanto a de Lavagem promoveram sua remoção.
- em operação (não otimizada) em um único estágio, os processos de REAÇÃO e de REAÇÃO+ADSORÇÃO resultaram em reduções de até 21 e 83% dos teores iniciais de colesterol, respectivamente.
- em operação em um único estágio, o processo de REAÇÃO+LAVAGEM produziu um nível menor de remoção de colesterol que o alcançado pelo processo de REAÇÃO+ADSORÇÃO, mas resultou em um óleo com níveis menores de resíduos de quilaia.



Fonte: SUNDFELD *et al.* (1993a)

FIGURA II.5. Processos alternativos para separação de colesterol do óleo de manteiga utilizando quilaia.

Nos trabalhos desenvolvidos por SUNDFELD (1992) e SUNDFELD *et al.* (1993a, 1993b), o processo denominado REAÇÃO+ADSORÇÃO é uma variante evidente do método para separação de colesterol com fins analíticos desenvolvido por SCHWARTZ *et al.* (1967) e KATZ & KEENEY (1967), que se baseia na formação de um complexo entre a saponina digitonina, imobilizada num leito de Celite® 545, e o colesterol; tal complexo é insolúvel em meio aquoso. No processo denominado REAÇÃO, em que a gordura foi colocada em contato com uma solução aquosa de saponinas de quilaia, não se confirmou o mecanismo de formação de um complexo insolúvel, como esperado pelos autores, para justificar os níveis de separação de colesterol observados: o precipitado existente era composto pela fração da quilaia insolúvel em meio aquoso e continha quantidades desprezíveis de colesterol que, portanto, estava solubilizado na fase aquosa.

Considerando estes resultados em conjunto com a bibliografia referente à formação de micelas mistas de saponinas de quilaia e ácidos biliares (que são compostos análogos ao colesterol) em meio aquoso (OAKENFULL & SIDHU, 1983; OAKENFULL, 1986) e o efeito hipocolesterolêmico decorrente de sua ingestão (TOPPING *et al.*, 1980; OAKENFULL *et al.*, 1984; RAO & KENDALL, 1986), assim como os estudos de formação de admicelas e adsolubilização de solutos (HARWELL & O'HEAR, 1989), SUNDFELD (1992) propôs os seguintes mecanismos básicos como envolvidos na separação de colesterol: 1) partição do colesterol, a partir da fase oleosa, numa dispersão coloidal das saponinas, com solubilização do colesterol nas micelas das saponinas presentes em solução aquosa, e 2) na presença da terra diatomácea, a adsorção das saponinas na superfície deste sólido ensejaria a formação de admicelas, nas quais o colesterol também poderia se inserir.

Numerosos estudos mencionados anteriormente revelam a formação de camadas de surfatante adsorvidas na superfície de sólidos, denominadas hemimicelas ou admicelas (BISIO *et al.*, 1980; SCAMEHORN *et al.*, 1982; HARWELL *et al.*, 1985; SOMASUNDARAN & FUERSTENAU, 1986; BITTING & HARWELL, 1987; SIRACUSA & SOMASUNDARAN, 1987), que podem funcionar como solventes bidimensionais para uma variedade de solutos (HARWELL & O'HEAR, 1989), constituindo um dos muitos processos de separação baseados no uso de surfatantes (SCAMEHORN & HARWELL, 1989). Estes antecedentes, considerados em conjunto com os resultados obtidos por SUNDFELD (1992), sugerem a solubilização de colesterol em admicelas formadas na superfície de terra diatomácea como um dos mecanismos plausíveis de separação. Não há, entretanto, evidências diretas de que este mecanismo esteja operando.

Por outro lado, a proposta de SUNDFELD (1992) de solubilização de colesterol em micelas (isotrópicas) de saponinas presentes em solução aquosa, pode ser encarada como um caso particular de um sistema potencialmente bastante mais complicado. Os complexos diagramas de fase exibidos por sistemas quaternários óleo - água - surfatante - soluto, em que a presença de várias regiões (contendo uma, duas ou três fases em equilíbrio) e os limites das regiões são alterados pela composição global do sistema e por vários fatores (tais como temperatura, força iônica, pH, entre outros) (HIEMENZ, 1986; BOURREL & SCHECHTER, 1988), sugerem outras possibilidades de separação envolvendo, por exemplo, cristais líquidos. Note-se que LUCY & GLAUERT (1964) relataram a formação de cristais líquidos por saponinas e colesterol em solução aquosa. A participação no processo de separação de outros compostos anfifílicos presentes nos extratos de quilaia, como por exemplo os taninos, também representa uma possibilidade a ser considerada.

Assim, a proposta de mecanismo operante na separação deve ser ampliada, de modo a incorporar as várias possibilidades potencialmente presentes no diagrama de fases do sistema. A construção do diagrama, com caracterização das fases e identificação das estruturas presentes, de maneira análoga à realizada nos estudos de bile artificial (SMALL *et al.*, 1966; BOURGÉS *et al.*, 1967ab) permitirá a identificação clara do mecanismo operante.

III. MATERIAL E MÉTODO

1. Detalhamento dos experimentos

Para o aprimoramento da tecnologia de extração do colesterol utilizando extratos contendo saponinas de *Quillaja* foram realizados 09 (nove) estudos, divididos em 02 (duas) fases distintas e bem caracterizadas.

1.1. Primeira Fase: Avaliação dos processos de separação líquido-líquido (LL) e sólido-líquido-líquido (SLL) para remoção de colesterol do óleo de manteiga

Nesta primeira fase, de caráter eminentemente tecnológico, 05 (cinco) estudos serviram para avaliar as opções de processo assim como o efeito de variáveis nos níveis de remoção de colesterol. Nesta fase foram utilizados extratos de quilaia em pó e óleo de manteiga (*butteroil*) comercialmente disponíveis.

Estes experimentos permitem uma visão "real" das alternativas de processo, inclusive o da extração líquido-líquido do óleo de manteiga com uma solução aquosa de quilaia (que é reproduzido no sistema modelo empregado na segunda fase deste trabalho), passíveis de implementação pelo setor industrial e cuja viabilidade convém verificar. Estes estudos são apresentados a seguir.

1.1.1. Efeito de parâmetros do processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL) nos níveis de remoção de colesterol

• Introdução

Estes experimentos visaram definir, para o processo de separação SLL, a significância dos efeitos da concentração e pH da solução aquosa de quilaia, temperatura e quantidade de terra diatomácea, nos níveis de remoção de colesterol. Procurou-se estabelecer as tendências dos níveis de remoção de colesterol com estas variáveis, definindo os parâmetros de maior relevância.

• Delineamento experimental

Foram empregados delineamentos fatoriais completos (WALPOLE & MYERS, 1989; MONTGOMERY, 1991) e as faixas de concentração e pH da solução de quilaia, quantidade de terra diatomácea, temperatura, assim como os níveis de agitação e tempos de contato definidos nos estudos de SUNDFELD (1992).

Inicialmente o efeito da temperatura foi avaliado de maneira isolada em 3 níveis (45, 55 e 65 °C), resultando em 3 tratamentos. Os demais parâmetros experimentais foram mantidos fixos: proporção óleo de manteiga/solução de quilaia de 50 g / 50 ml, concentração de quilaia em solução de 0,10 g/ml, terra diatomácea a 0,10 g/g óleo de manteiga, pH da solução de quilaia de 4,2, tempo de contato solução de quilaia/óleo de manteiga de 30 min, tempo de contato terra diatomácea/suspensão de 30 min e nível baixo (#6) de agitação.

Os efeitos da temperatura e do pH da solução de quilaia foram avaliados num delineamento fatorial completo, onde a temperatura foi estudada em 2 níveis (45 e 65 °C) e o pH em 3 níveis (3,0 , 4,2 e 7,0), resultando em 6 tratamentos. Os demais parâmetros experimentais foram mantidos fixos: proporção óleo de manteiga/solução de quilaia de 50 g / 50 ml, concentração de quilaia em solução de 0,10 g/ml, terra diatomácea a 0,10 g/g óleo de manteiga, tempo de contato solução de quilaia/óleo de manteiga de 30 min, tempo de contato terra diatomácea/suspensão de 30 min e nível baixo (#6) de agitação.

Os efeitos da concentração da solução de quilaia e da quantidade de terra diatomácea foram avaliados num delineamento fatorial completo, onde a concentração da solução de quilaia foi estudada em 4 níveis (0,05 , 0,15 , 0,25 e 0,35 g quilaia BELL/ml solução) e a quantidade de terra diatomácea em 3 níveis (0,05 , 0,15 e 0,25 g/g óleo), resultando em 12 tratamentos. Os demais parâmetros experimentais foram mantidos fixos: proporção óleo de manteiga/solução de quilaia de 50 g / 50 ml, temperatura a 65 °C, pH da solução de quilaia de 4,2, tempo de contato solução de quilaia/óleo de manteiga de 60 min, tempo de contato terra diatomácea/suspensão de 60 min. e nível baixo (#6) de agitação.

Todos os tratamentos foram realizados pelo menos em triplicata.

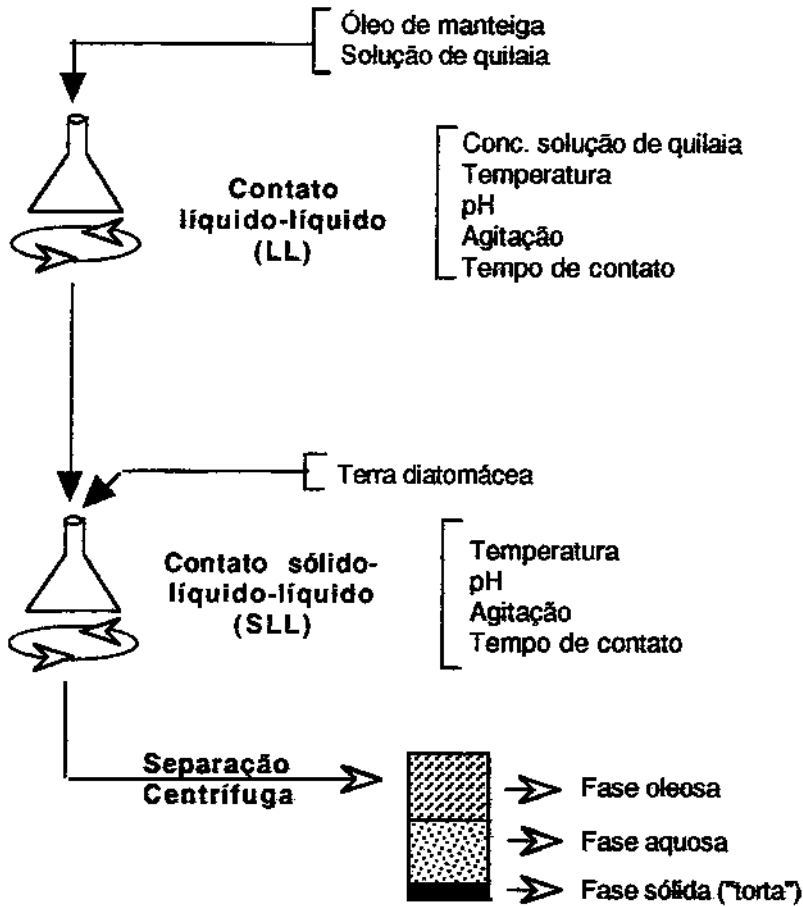
• Preparo das soluções de quilaia

Foram preparadas nas concentrações exigidas com água desionizada, a temperatura ambiente, utilizando placa agitadora magnética. O pH das soluções foi

ajustado com soluções 0,1 M de HCl ou NaOH. As soluções foram centrifugadas por 20 minutos, a temperatura ambiente (25 °C) e 10.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman #1 e utilizado nos experimentos.

• Processo sólido-líquido-líquido (SLL)

O processo SLL, análogo ao denominado Reação+Adsorção (R+A) por SUNDFELD *et al.* (1993a, 1993b), é ilustrado na Figura III.1.



Fonte: SUNDFELD *et al.* (1993 a, 1993 b)

FIGURA III.1. Fluxograma experimental do processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL).

No processo SLL 50 g de óleo de manteiga e 50 ml de solução de quilaia (na concentração e pH desejados), previamente aquecidos até a temperatura definida,

III. Material e Método

foram colocados em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml e duas esferas de vidro de 1,3 cm de diâmetro inseridas em cada frasco para intensificar o processo de mistura. Os frascos foram então tampados e colocados no banho, com agitação e temperatura controladas, pelo tempo de contato (LL) definido. Seguiu-se a adição da quantidade definida de Celite® 545 diretamente nos frascos, sendo o processo continuado no banho, nas mesmas condições de temperatura e agitação, pelo tempo de contato (SLL) definido. A agitação foi então desligada, as esferas de vidro retiradas, e o conteúdo dos frascos transferido para tubos de centrifuga e centrifugado por 20 minutos, a temperatura ambiente (25 °C) e 10.000 rpm. Após a centrifugação as fases oleosa e sólida ("torta" de terra diatomácea) foram retiradas e as amostras guardadas em frascos herméticos a -20 °C.

- Determinação do teor de colesterol

Amostras de fase oleosa e torta de terra diatomácea foram avaliadas pelo procedimento de SUNDFELD *et al.* (1993 a), como detalhado na seção de métodos de análise.

- Determinação do teor de óleo

Amostras de torta de terra diatomácea foram avaliadas pelo método de BLIGH & DYER (1959), como detalhado na seção de métodos de análise.

- Determinação do teor de umidade

Amostras de torta de terra diatomácea foram avaliadas pelo método AOAC 43.287, como detalhado na seção de métodos de análise.

- Análise estatística

As variáveis independentes foram a concentração e pH da solução de quilaia, a quantidade de terra diatomácea, e a temperatura. As variáveis dependentes foram os teores de colesterol nas fases oleosa e tortas resultantes dos diferentes tratamentos. Foi feita a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a significância dos efeitos principais e interações das variáveis independentes através de testes F e a

comparação múltipla das médias dos vários tratamentos pelo teste de Tukey HSD (NETER *et al.*, 1990).

1.1.2. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo nas etapas dos processos de separação LL e SLL

• Introdução

Estes experimentos visaram definir, para as etapas de contato líquido-líquido (LL) e sólido-líquido-líquido (SLL) independentemente, a evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo, variando-se a concentração de quilaia na solução aquosa. Os parâmetros temperatura, pH e quantidade de terra diatomácea foram mantidos fixos em níveis definidos como aceitáveis no estudo anterior.

Procurou-se estabelecer o tempo necessário para alcance de uma condição "prática" de equilíbrio, isto é, o tempo de contato após o qual supõe-se que as mudanças na concentração de colesterol na fase oleosa, se ocorrerem, o farão a uma taxa muito baixa, proibitiva para aplicações práticas.

• Delineamento experimental

Para definição do tempo de alcance de uma condição "prática" de equilíbrio nas etapas de contato líquido-líquido (LL) e sólido-líquido-líquido (SLL) independentemente, foram construídas curvas descrevendo a evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato em cada uma destas etapas individualmente. Foram empregadas soluções de quilaia BELL em 3 concentrações (0,05 , 0,20 e 0,35 g quilaia/ml solução) e considerados 6 tempos de contato (zero, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos), resultando 6 curvas. Cada ponto das curvas foi realizado pelo menos em triplicata.

O tempo de contato zero na etapa LL corresponde ao óleo de manteiga utilizado nos ensaios. O tempo de contato zero na etapa SLL corresponde à amostra de fase oleosa retirada logo após a adição e mistura da terra diatomácea na suspensão óleo de manteiga/solução de quilaia.

Nestes ensaios, foram mantidos fixos no valor médio das faixas de interesse a temperatura (55 °C), o pH da solução de quilaia (4,35), o nível de agitação (baixo, #6) e a quantidade de terra diatomácea (0,15g/g óleo de manteiga).

III. Material e Método

- Preparo das soluções de quilaia

Foram preparadas de maneira análoga à descrita na seção 1.1.1.

- Preparo do óleo de manteiga

Foi preparada uma amostra de óleo de manteiga “enriquecida” com colesterol, adicionando-se ao óleo de manteiga anidro uma solução de colesterol em clorofórmio. A dissolução foi feita sobre placa agitadora magnética a 50 - 55 °C por 1 hora, e a eliminação do clorofórmio pelo aquecimento a 65 °C sob vácuo por 1 hora.

- Processos de separação LL e SLL

Seguiu-se um procedimento análogo ao descrito na seção 1.1.1.

No estudo da etapa de contato LL, 50 g de óleo de manteiga “enriquecido” e 50 ml de solução de quilaia (na concentração desejada), previamente aquecidos até a temperatura definida, foram colocados em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml e duas esferas de vidro de 1,3 cm de diâmetro inseridas em cada frasco para intensificar o processo de mistura. Os frascos foram então tampados e colocados no banho, com agitação e temperatura controladas. Nos tempos de contato definidos, a agitação foi desligada e rapidamente 1,5 ml do conteúdo dos frascos foi coletado e transferido com pipeta para tubos Eppendorf. Seguiu-se a centrifugação por 10 minutos, a temperatura ambiente (25 °C) e 14.000 rpm (equivalente a 16.000 vezes a aceleração da gravidade). As amostras da fase oleosa foram retiradas e guardadas em frasco hermético a - 20 °C.

No estudo da etapa de contato SLL, adicionou-se a quantidade definida de Celite® 545 diretamente nos frascos contendo a suspensão obtida após 90 minutos de contato LL. O processo foi continuado no banho, nas mesmas condições de temperatura e agitação vigentes, procedendo-se à coleta de amostras da fase oleosa nos tempos de contato definidos como descrito anteriormente.

- Determinação do teor de colesterol

Realizada no óleo de manteiga “enriquecido” inicial e nas amostras das fases oleosas pelo procedimento de SUNDFELD *et al.* (1993 a), como detalhado na seção de métodos de análise.

- Análise estatística

Para definição dos tempos de equilíbrio foram calculadas, para cada concentração da solução de quilaia, as médias e os intervalos com 95% de confiança (NETER *et al.*, 1990) dos teores de colesterol nas fases oleosas resultantes de cada tempo de contato das etapas de contato LL e SLL.

1.1.3. Distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL

- Introdução

Estes experimentos visaram estabelecer as curvas de distribuição de colesterol entre as fases (oleosa, aquosa e de torta de terra diatomácea) em contato, tanto para o processo LL como para o SLL, variando-se a concentração de quilaia na solução aquosa. Os parâmetros temperatura, pH e quantidade de terra diatomácea foram mantidos fixos em níveis definidos como aceitáveis na seção 1.1.1; o tempo de contato foi o da condição "prática" de equilíbrio definido na seção 1.1.2.

A partir das curvas de distribuição foram efetuadas simulações dos processos, em múltiplo estágio, estabelecendo-se a evolução dos níveis de colesterol na fase oleosa com o número de estágios de contato.

- Delineamento experimental

Foram construídas as curvas de distribuição de colesterol entre as fases em contato (oleosa, aquosa e torta) para os processos de separação LL e SLL. Foram determinados os teores de colesterol presentes nas fases oleosas e tortas resultantes dos tratamentos e, utilizando-se balanços de massa, obtidos os teores de colesterol presentes nas fases aquosas resultantes do processo LL e estimativas daqueles presentes nas fases aquosas resultantes do processo SLL.

Os resultados das concentrações de colesterol nas fases em contato foram colocados na forma de curvas de distribuição, uma curva para cada concentração da solução de quilaia. Resultaram 6 curvas nas quais cada ponto foi realizado pelo menos em triplicata.

III. Material e Método

Foram empregadas soluções de quilaia BELL em 3 concentrações (0,05 , 0,20 e 0,35 g quilaia/ml solução) e amostras de óleo de manteiga com 5 teores de colesterol (0,73 , 1,20 , 1,69 , 2,24 e 2,74 mg colesterol/g óleo). Nestes ensaios foram mantidos fixos, em níveis definidos nos estudos anteriores, a temperatura (55 °C), o pH da solução de quilaia (4,15), o nível de agitação (baixo, #6) e a quantidade de terra diatomácea (0,15g/g óleo de manteiga). Os tempos de contato das etapas de contato LL e SLL foram de 60 minutos, maiores que os definidos no estudo anterior como suficientes para o alcance da condição "prática" de equilíbrio.

A partir das curvas de distribuição foram efetuadas simulações dos processos de separação LL e SLL em múltiplo estágio, com configuração de fluxo cruzado, estabelecendo-se a evolução dos níveis de colesterol na fase oleosa com o número de estágios de contato.

• Preparo das soluções de quilaia

Foram preparadas de maneira análoga `a descrita na seção 1.1.1.

• Preparo do óleo de manteiga

Para estes ensaios foram preparadas 5 amostras de óleo de manteiga com teor variado de colesterol, através da mistura de diferentes proporções do óleo de manteiga anidro tradicional com aquele submetido `a destilação por arraste a vapor.

• Processos de separação LL e SLL

O procedimento experimental empregado para o processo de separação SLL foi o descrito na seção 1.1.1, detalhado a seguir. Neste processo, 50 g de óleo de manteiga e 50 ml de solução de quilaia (nas concentrações e pH definidos) previamente aquecidos até a temperatura definida, foram colocados em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml e duas esferas de vidro de 1,3 cm de diâmetro inseridas em cada frasco para intensificar o processo de mistura. Os frascos foram então tampados e colocados no banho, com agitação e temperatura controladas, pelo tempo de contato (LL) definido. Seguiu-se a adição da quantidade definida de Celite® 545 diretamente nos frascos, sendo o processo continuado no banho, nas mesmas condições de temperatura e agitação, pelo tempo de contato (SLL) definido. A agitação foi então desligada, as esferas de vidro retiradas, e o conteúdo dos

frascos transferido para tubos de centrifuga e centrifugado por 20 minutos, a temperatura ambiente (25 °C) e 10.000 rpm. Após a centrifugação as fases oleosas e tortas de terra diatomácea foram retiradas e as amostras guardadas em frascos herméticos a -20 °C.

Para o processo LL, foram empregadas as mesmas condições, equipamentos e materiais; o procedimento experimental é ilustrado na Figura III.2.

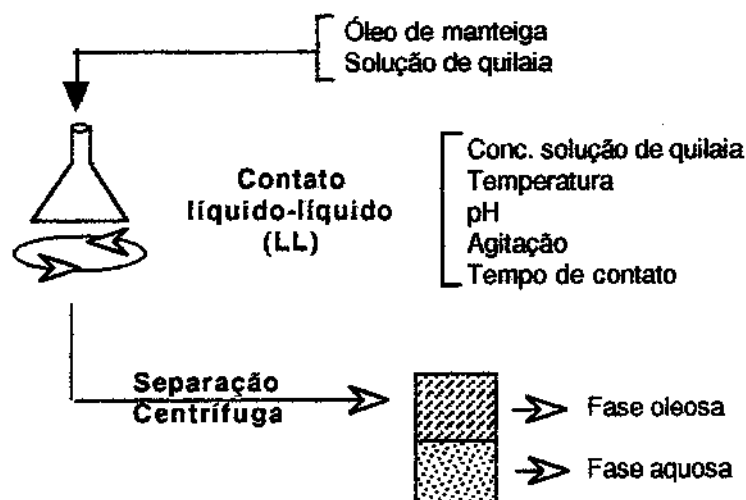


FIGURA III.2. Fluxograma experimental do processo de separação líquido-líquido (LL).

Neste processo, 50 g de óleo de manteiga e 50 ml de solução de quilaia (nas concentrações e pH definidos), previamente aquecidos até a temperatura definida, foram colocados em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml e duas esferas de vidro de 1,3 cm de diâmetro inseridas em cada frasco para intensificar o processo de mistura. Os frascos foram então tampados e colocados no banho, com agitação e temperatura controladas, pelo tempo de contato (LL) definido. A agitação foi então desligada, as esferas de vidro retiradas, e o conteúdo dos frascos transferido para tubos de centrifuga e centrifugado por 20 minutos, a temperatura ambiente (25 °C) e 10.000 rpm. Após a centrifugação as fases oleosas foram retiradas e as amostras guardadas em frascos herméticos a -20 °C.

III. Material e Método

• Determinação do teor de colesterol

Realizada nas amostras dos óleos de manteiga iniciais e nas fases oleosas e tortas resultantes dos tratamentos, pelo procedimento de SUNDFELD *et al.* (1993 a), como detalhado na seção de métodos de análise.

• Análise estatística

A análise estatística compreendeu o cálculo das médias e desvios-padrão dos níveis de colesterol nas fases oleosas e tortas resultantes dos processos LL e SLL, assim como o ajuste de polinômios às curvas de distribuição (NETER *et al.*, 1990).

1.1.4. Efeito da procedência das quilaia nos níveis de remoção de colesterol dos processos de separação LL e SLL

• Introdução

Há uma grande variedade, e potencial variabilidade, da quilaia fornecida pelos vários fornecedores. Portanto, empregando 02 (duas) quilaia em pó obtidas comercialmente, estes experimentos visaram verificar se a procedência da quilaia afeta significativamente os níveis de remoção de colesterol obtidos pelos processos LL e SLL.

• Delineamento experimental

Numa primeira série de experimentos procurou-se verificar se a procedência da quilaia afeta significativamente os níveis de remoção de colesterol, onde foram consideradas 2 quilaia (PENCO e BELL) e 2 processos (LL e SLL). Num delineamento completamente aleatório (WALPOLE & MYERS, 1989; MONTGOMERY, 1991), foram realizados 5 tratamentos: Branco (B), processo LL com quilaia PENCO e BELL, e processo SLL com quilaia PENCO e BELL. O tratamento denominado Branco (B) envolveu o contato líquido-líquido do óleo de manteiga anidro com água. Em todos os ensaios foram mantidos fixos, conforme aplicável, os seguintes parâmetros de processo: concentração de quilaia (0,40 g quilaia/ml solução), quantidade de terra diatomácea (0,25 g Celite® 545/g óleo), temperatura (55 °C), pH

da solução de quilaia (4,65), agitação (média, #7) e tempos de contato (LL e SLL de 60 minutos/cada). Todos os tratamentos tiveram 4 réplicas.

Numa segunda série de experimentos, foi construída para a quilaia PENCO uma curva de distribuição de colesterol entre as fases em contato (oleosa, aquosa e torta) para o processo de separação SLL. Os teores de colesterol presentes nas fases oleosas e tortas resultantes foram colocados na forma de uma curva de distribuição, onde cada ponto foi realizado pelo menos em triplicata. Foi empregada uma solução de quilaia PENCO na concentração de 0,35 g quilaia/ml solução e amostras de óleo de manteiga com 5 teores de colesterol (0,73 , 1,27 , 1,76 , 2,43 e 2,98 mg colesterol/g óleo). Nestes ensaios foram mantidos fixos a temperatura (55 °C), o pH da solução de quilaia (4,3), o nível de agitação (baixo, #6), a quantidade de terra diatomácea (0,15g/g óleo de manteiga) e os tempos de contato das etapas de contato LL e SLL foram de 60 minutos. A partir da curva de distribuição foram efetuadas simulações do processo de separação SLL em múltiplo estágio, com configuração de fluxo cruzado, estabelecendo-se a evolução dos níveis de colesterol na fase oleosa com o número de estágios de contato.

- Preparo das soluções de quilaia para os processos LL e SLL

As soluções de quilaia PENCO e BELL foram preparadas de maneira análoga à descrita na seção 1.1.1.

- Preparo do óleo de manteiga

Nos testes do efeito da procedência das quilais foi utilizado o óleo de manteiga anidro tradicional. Para a construção da curva de distribuição foram preparadas 5 amostras de óleo de manteiga com variado teor de colesterol, através da mistura de diferentes proporções do óleo de manteiga anidro tradicional com aquele submetido à destilação por arraste a vapor.

- Processos de separação LL e SLL e o Branco

Os procedimentos experimentais empregados para os processos de separação LL e SLL foram os descritos na seção 1.1.3. O tratamento denominado Branco envolveu o contato líquido-líquido do óleo de manteiga com água, empregando-se as mesmas condições, equipamentos e materiais utilizados nos processos LL e SLL.

- **Determinação do teor de colesterol**

Nos testes do efeito da procedência das quilaia, a determinação foi realizada nas amostras de fases oleosas resultantes dos tratamentos. Para a construção da curva de distribuição, foi realizada em amostras dos óleos de manteiga iniciais e nas fases oleosas e tortas resultantes do processo SLL. Em todos os casos empregou-se o procedimento de SUNDFELD *et al.* (1993a), como detalhado na seção de métodos de análise.

- **Análise estatística**

Nos testes do efeito da procedência das quilaia foi feita a análise de variância (ANOVA) e a comparação múltipla das médias dos vários tratamentos pelo teste de Tukey HSD. Para a construção da curva de distribuição, a análise estatística compreendeu o cálculo das médias e desvios-padrão dos níveis de colesterol nas fases oleosas e tortas resultantes do processo SLL, assim como o ajuste de polinômios às curvas de distribuição (NETER *et al.*, 1990).

1.1.5. Caracterização das quilaia

- **Introdução**

Estes experimentos visaram caracterizar as 02 (duas) quilaia em pó obtidas comercialmente, e utilizadas nos estudos anteriores, quanto à sua composição química, concentração de micela crítica, propriedades eletrocinéticas e tamanho das partículas em solução aquosa.

Realizados após verificar se haveria um efeito significativo da procedência da quilaia na eficiência dos processos, buscou-se através desta caracterização reunir elementos que, além de propiciar o conhecimento de algumas propriedades básicas dos materiais em estudo, pudessem justificar diferenças eventualmente observadas quanto à sua eficácia na remoção de colesterol.

- Delineamento experimental

A caracterização das 2 quilaia em pó PENCO e BELL foi feita através da determinação de sua composição química, concentração de micela crítica, mobilidade eletroforética e tamanho das partículas presentes em soluções aquosas.

Inicialmente foram determinados os teores de saponinas, através do conteúdo de sapogeninas, realizando-se 06 (seis) réplicas para cada uma das quilaia. Outras determinações relativas à composição química foram feitas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL (Campinas, SP).

Numa segunda série de experimentos, foi determinada a concentração de micela crítica das quilaia, a pH 4,6 e 25 °C. Soluções aquosas a várias concentrações na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-2}$ g/ml foram preparadas e, através de medidas de tensão superficial, condutividade e turbidez, a CMC foi determinada graficamente utilizando-se cada uma destas propriedades independentemente.

Numa terceira série de experimentos foi verificada a existência de diferenças de mobilidade eletroforética (MEF) e diâmetro de Stokes (D_{st}) das partículas presentes nas soluções aquosas destas quilaia, na concentração de 0,05 g/ml e 25 °C. Foi estudado também o efeito da filtração prévia das soluções nestas medidas e pesquisadas evidências de polidispersidade.

Por último, uma quarta série de experimentos foi realizada para verificar a natureza das partículas cujas propriedades estavam sendo medidas, isto é, se eram micelas de saponinas ou outras partículas (que não micelas) presentes nos extratos. Para tanto duas abordagens foram seguidas. Primeiramente, foram obtidos histogramas da MEF nas soluções em concentrações abaixo e acima da CMC, estratégia que se baseou no fato de que micelas se formam em solução ao redor da CMC e, portanto, elas não estão presentes abaixo da CMC. Depois, testes confirmativos foram feitos com base na centrifugação das soluções, uma operação que em condições normais pode promover a separação (sedimentação) das partículas maiores sem exercer qualquer efeito sobre as micelas.

- Determinação do teor de sapogeninas

Amostras de quilaia em pó foram analisadas pelo método detalhado na seção de métodos de análise.

• Preparo das soluções de quilaia

Para determinação da CMC, uma solução aquosa de cada quilaia na concentração de $5,0 \times 10^{-2}$ g quilaia/ml solução foi preparada com água desionizada, a temperatura ambiente, utilizando placa agitadora magnética. O pH da solução foi ajustado a 4,6 pela adição de soluções 0,1 M de HCl ou NaOH. A partir desta solução inicial foram preparadas soluções a várias concentrações até o valor mínimo de $1,0 \times 10^{-4}$ g/ml, por diluição sucessiva, empregando-se água desionizada com pH também ajustado a 4,6.

Para verificar a existência de diferenças de mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes das partículas presentes nas soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL, assim como para pesquisa de evidências de polidispersidade, uma solução aquosa de cada quilaia na concentração de $5,0 \times 10^{-2}$ g quilaia/ml solução foi preparada com água desionizada, a temperatura ambiente, utilizando placa agitadora magnética, ajustando-se o pH da solução a 4,6. Para o estudo do efeito da filtração prévia das soluções nestas medidas, as soluções foram ou não previamente filtradas através de papel de filtro Whatman #1 ou #42.

Nos experimentos para verificar a natureza das partículas, os histogramas da MEF foram obtidos das soluções preparadas para determinação da CMC enquanto que, para os testes baseados na centrifugação, foi empregada uma solução da quilaia PENCO na concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ g quilaia/ml solução sem nenhum ajuste de pH.

• Determinação da CMC das quilaia

Foi realizada graficamente a partir de medidas de tensão superficial, condutividade e turbidez das soluções aquosas das quilaia a várias concentrações, utilizando os procedimentos detalhados na seção de métodos de análise.

• Determinação da mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes das partículas

Foram realizadas nas soluções aquosas das quilaia, utilizando os procedimentos detalhados na seção de métodos de análise.

- **Análise estatística**

Na determinação dos teores de sapogeninas das quilaia, das propriedades das soluções (tensão superficial, condutividade e turbidez) e das partículas (mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes) foram calculadas as médias, desvios-padrão e intervalos com 95% de confiança dos valores obtidos nos vários tratamentos.

Nos testes do efeito da procedência das quilaia e da filtração das soluções nos valores da mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes obtidos, foi feita a análise de variância (ANOVA) e a comparação múltipla das médias dos vários tratamentos pelo teste de Tukey Kramer (NETER *et al.*, 1990).

1.2. Segunda Fase: Formação de micela e solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia

Nesta segunda fase, 04 (quatro) estudos estiveram voltados para uma melhor caracterização da solução aquosa de quilaia e da distribuição do colesterol entre fases em sistema bifásico líquido-líquido, verificando-se o efeito de variáveis de processo na formação de micelas e na solubilização de colesterol.

É relevante ressaltar que, nesta segunda etapa do trabalho, a atenção esteve voltada para a fase aquosa (a solução aquosa de quilaia), objetivando obter informações e definições que permitissem um melhor entendimento e controle do processo, incluindo:

- determinação da faixa de concentração em que extratos de quilaia formam micelas em solução aquosa, assim como o efeito da temperatura, pH e adição de cloreto de sódio na concentração de micela crítica (CMC);
- delimitação do efeito dos parâmetros de processo (temperatura, pH e adição de NaCl) na distribuição de colesterol no sistema bifásico solução aquosa de quilaia - decano, isto é, na quantidade de colesterol solubilizada em soluções aquosas de quilaia;
- correlação dos fenômenos de formação de micelas com o de solubilização de colesterol, buscando evidências que corroborassem um dos mecanismos de separação propostos, isto é, o da solubilização de colesterol em micelas presentes na fase aquosa.

III. Material e Método

Nestes estudos foi utilizado o decano com colesterol adicionado em níveis conhecidos como substitutivo da fase oleosa e um extrato de saponinas de quilaia mais purificado. A substituição do óleo de manteiga pela solução de colesterol em decano resulta numa substancial simplificação e incremento de precisão analítica para determinação de colesterol, uma vez que pode-se injetar diretamente no cromatógrafo as amostras da fase hidrocarboneto, sem as etapas de saponificação e extração necessárias para a análise do óleo. Estes estudos são apresentados a seguir.

1.2.1. Formação da micela em soluções aquosas de quilaia

• Introdução

Estes experimentos visaram determinar a concentração de micela crítica (CMC), isto é, a concentração a partir da qual observa-se a formação de micelas em soluções aquosas de quilaia. Foram verificados os efeitos da temperatura, pH e adição de cloreto de sódio na CMC. Em processos de solubilização em micelas, a CMC é uma informação fundamental, representando o limite inferior de concentração a partir do qual poderá ser observada a solubilização de colesterol.

• Delineamento experimental

Foi feita a determinação da concentração de micela crítica (CMC) em soluções aquosas da quilaia SIGMA, assim como a definição dos efeitos da temperatura, pH, e concentração de sal (NaCl) adicionado.

O delineamento experimental empregado foi o fatorial completo (WALPOLE & MYERS, 1989; MONTGOMERY, 1991), que pressupõe a verificação do efeito individual de cada parâmetro assim como de eventuais efeitos conjuntos. Soluções aquosas da quilaia a várias concentrações na faixa de $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-2}$ g/ml foram preparadas e, através de medidas de tensão superficial, a CMC foi determinada graficamente em três níveis de temperatura (25, 35 e 45 °C), três níveis de pH (3,0, 4,5 e 6,0) e dois níveis de concentração de NaCl adicionado (zero, equivalente à não adição de NaCl, e 0,5 M), resultando num total de 18 tratamentos realizados em triplicata.

- Preparo das soluções de quilaia

Uma solução aquosa de quilaia SIGMA na concentração de $2,0 \times 10^{-2}$ g quilaia/ml solução e com a quantidade requerida de NaCl foi preparada com água desionizada, a temperatura ambiente, utilizando placa agitadora magnética. O pH da solução foi ajustado nos níveis exigidos pela adição de soluções 0,1 M de HCl ou NaOH. A partir desta solução inicial foram preparadas soluções a várias concentrações até o valor mínimo de $2,0 \times 10^{-7}$ g/ml, por diluição sucessiva, empregando-se soluções de NaCl em água desionizada com pH ajustado nas condições exigidas.

- Determinação da CMC das quilaia

Foi realizada graficamente a partir de medidas de tensão superficial das soluções aquosas das quilaia a várias concentrações, pelos procedimentos detalhados na seção de métodos de análise.

- Análise estatística

As variáveis independentes foram temperatura, pH, e concentração de NaCl adicionado. A variável dependente foi o valor da CMC obtido nos 18 tratamentos. Foi feita a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a significância dos efeitos principais e interações das variáveis independentes através de testes F e a comparação múltipla das médias dos vários tratamentos com intervalos com 95% de confiança.

1.2.2. Evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções de quilaia

- Introdução

Estes experimentos visaram definir, no contato de soluções de colesterol em decano com soluções aquosas de quilaia a várias concentrações, a evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo. Os parâmetros temperatura, pH e concentração de NaCl adicionado foram mantidos fixos nos níveis médios das

III. Material e Método

respectivas faixas de interesse. Procurou-se estabelecer o tempo de contato necessário para alcance da condição de equilíbrio.

• Delineamento experimental

Para definição do tempo para alcance de equilíbrio foram construídas curvas descrevendo a evolução, com o tempo, da concentração de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA. Foram empregadas soluções de quilaia em 3 concentrações (0,025 , 0,05 e 0,10 g quilaia/ml solução) e considerados 6 (seis) tempos de contato (zero, 1, 2, 4, 8 e 12 horas), resultando 3 curvas (uma curva para cada concentração de quilaia em solução). Nestes ensaios, a temperatura, o pH e a concentração de NaCl adicionado foram mantidos fixos no valor médio das faixas de interesse (35 °C, 4,5 e 0,25 M, respectivamente) e a agitação a 125 rpm. Cada ponto das curvas, correspondendo a uma condição concentração de quilaia/tempo de contato, foi resultado de 3 repetições (triplicata).

• Preparo das soluções de quilaia

Uma solução aquosa da quilaia na concentração de 0,10 g quilaia/ml solução e com 0,25 M de NaCl adicionado foi preparada com água desionizada, a temperatura ambiente, utilizando placa agitadora magnética. O pH da solução foi ajustado a 4,5 com uma solução 0,1M de HCl. A partir desta solução inicial foram preparadas soluções nas concentrações 0,05 e 0,025 g/ml, por diluição sucessiva, empregando-se soluções 0,25 M de NaCl em água desionizada com pH ajustado a 4,5.

• Contato das soluções de colesterol em decano com as soluções de quilaia

Em todos os experimentos foram empregados frascos do tipo Erlenmeyer com 50 ml de capacidade providos de tampa. A eles foram adicionados com pipeta volumétrica 10 ml de solução de colesterol em decano (com concentração de 3,0 mg colesterol/ml solução) e 10 ml de solução de quilaia. Os frascos foram tampados e colocados em banho com temperatura controlada a $35 \pm 0,5$ °C e agitação a 125 rpm. Para cada tratamento, definido como uma condição concentração de quilaia/tempo de contato, foram empregados 3 frascos (triplicata).

Todos os frascos foram colocados no banho no tempo zero. Decorrido cada tempo de contato previsto, os frascos correspondentes ao tratamento foram retirados

do banho e amostras de 2 ml da fase decano retiradas de cada frasco com pipetas automáticas. Os demais frascos, correspondentes a tempos de contato superiores, permaneceram no banho. Note-se que o tempo de contato zero corresponde à solução inicial de colesterol em decano. Todas as amostras de fase decano foram colocadas em frascos de vidro com tampa e, nos casos em que a análise cromatográfica não foi feita de imediato, conservadas em geladeira.

• Determinação do teor de colesterol

A determinação do teor de colesterol foi feita tanto na solução inicial de colesterol em decano quanto nas amostras da fase decano coletadas após os vários tempos de contato com as soluções de quilaia, empregando-se procedimento detalhado na seção de métodos de análise.

• Análise estatística

Para definição dos tempos de equilíbrio foram calculadas, para cada concentração da solução de quilaia, as médias e os intervalos com 95% de confiança (NETER *et al.*, 1990) das concentrações de equilíbrio de colesterol nas fases decano resultantes de cada tempo de contato.

1.2.3. Solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia

• Introdução

Este estudo visou determinar o efeito da temperatura, do pH e da adição de NaCl na solubilização de colesterol na fase aquosa, a partir da fase decano. Buscou-se definir o efeito destas variáveis na quantidade de colesterol solubilizada em soluções aquosas de quilaia a concentração fixa, definindo as condições que promovem a maior solubilização. O tempo de contato empregado foi o necessário ao alcance de equilíbrio, obtido como descrito na seção 1.2.2.

III. Material e Método

• Delineamento experimental

Foi determinado o efeito dos parâmetros de processo (pH, temperatura e concentração de NaCl adicionado) na quantidade de colesterol que, a partir da fase decano, é solubilizada em soluções aquosas de quilaia SIGMA, definindo as condições que maximizam a solubilização.

O delineamento experimental empregado foi o fatorial completo (WALPOLE & MYERS 1989; MONTGOMERY, 1991). Foram empregadas soluções de quilaia na concentração de 0,025 g quilaia/ml solução e o tempo de contato de 24 horas, definido no estudo anterior como suficiente para alcance do equilíbrio. A temperatura foi estudada em 3 níveis (25, 35 e 45 °C), o pH em 3 níveis (3,0, 4, 5 e 6,0) e a concentração de NaCl adicionado em 2 níveis (zero, equivalente à não adição de NaCl, e a adição de 0,5M), resultando num total de 18 tratamentos. Cada tratamento corresponde a uma combinação temperatura/pH/adição de NaCl e foi realizado em triplicata.

• Preparo das soluções de quilaia

Soluções aquosas de quilaia, na concentração de 0,025 g quilaia/ml solução e com as quantidades requeridas de NaCl, foram preparadas com água desionizada, a temperatura ambiente, utilizando placa agitadora magnética. O pH das soluções foi ajustado nos níveis definidos pela adição de soluções 0,1M de HCl ou NaOH.

• Contato das soluções de colesterol em decano com as soluções de quilaia

Em todos os experimentos foram empregados frascos do tipo Erlenmeyer com 50 ml de capacidade providos de tampa. A eles foram adicionados com pipeta volumétrica 10 ml de solução de colesterol em decano (com concentração de 3,0 mg colesterol/ml solução) e 10 ml da solução de quilaia prevista. Os frascos foram tampados e colocados em banho com temperatura controlada no valor definido e agitação a 125 rpm. Cada tratamento corresponde a uma combinação temperatura/pH/adição de NaCl e foi realizado em triplicata.

Decorrido o tempo de contato de 24 horas (considerado suficiente para alcance do equilíbrio em razão dos resultados do estudo anterior), os frascos foram retirados do banho e amostras de 2 ml da fase decano retiradas de cada frasco com pipetas automáticas. Todas as amostras foram colocadas em frascos de vidro com tampa e,

nos casos em que a análise cromatográfica não foi feita de imediato, conservadas em geladeira.

- **Determinação do teor de colesterol**

A determinação do teor de colesterol foi feita tanto na solução inicial de colesterol em decano quanto nas amostras da fase decano resultantes dos vários tratamentos, empregando-se procedimento detalhado na seção de métodos de análise.

- **Análise estatística**

As variáveis independentes foram temperatura, pH e concentração de NaCl adicionado. A variável dependente foi a concentração de equilíbrio de colesterol nas fases decano obtidas nos 18 tratamentos. Foi feita a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a significância dos efeitos principais e interações das variáveis independentes através de testes F e a comparação das médias dos tratamentos com intervalos com 95% de confiança.

1.2.4. Correlação entre os fenômenos de formação de micelas e remoção de colesterol pelo contato com soluções aquosas de quilaia

- **Introdução**

O mecanismo proposto por SUNDFELD (1992) para a redução observada no teor de colesterol do óleo de manteiga quando colocado em contato com soluções aquosas de quilaia, foi a solubilização do colesterol em micelas de saponinas presentes na fase aquosa. A formação de complexos insolúveis com saponinas de quilaia está descartada: resultados contidos na literatura (SUNDFELD, 1992) indicaram que não ocorre a formação de precipitados.

A estratégia seguida para reunir evidências do envolvimento de micelas na separação foi baseada na correlação dos fenômenos de formação de micela e de remoção de colesterol, utilizando as soluções de colesterol em decano como modelo para o óleo de manteiga. Esta tentativa de correlação foi desenvolvida em 2 frentes distintas, discriminadas a seguir.

III. Material e Método

Na primeira, buscou-se verificar se a CMC da quilaia e as concentrações de equilíbrio de colesterol na fase decano seguiam, com a variação de temperatura, pH e adição de NaCl, tendências compatíveis com o mecanismo proposto. Nesta comparação foi considerada a seguinte regra geral: a concentrações fixas de surfatante, situações que desfavorecem a formação de micelas (contribuindo para um aumento da CMC) também desfavorecem a solubilização de solutos em micelas (contribuindo, no caso presente, para um aumento da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano).

Na segunda, considerou-se que a solubilização em micelas pressupõe sua existência física em solução, o que só ocorre acima da CMC. Assim, a observação de qualquer redução do teor de colesterol em contato com soluções de quilaia abaixo da CMC, constituiria uma evidência para rejeição do mecanismo proposto.

• Delineamento experimental

Para verificar se a concentração de micela crítica (CMC) da quilaia e as concentrações de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) do sistema bifásico seguem, com a variação de temperatura, pH e adição de NaCl, tendências compatíveis com o mecanismo proposto, não foram realizados novos experimentos. Nesta análise comparativa foram utilizados os resultados obtidos nos experimentos realizados anteriormente com o objetivo específico de aferir os efeitos destas variáveis na CMC e na CECFD do sistema bifásico.

Para verificação da ocorrência ou não de separação do colesterol abaixo e acima da CMC, foi medida a CECFD resultante do contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA a várias concentrações. Foi então construída uma curva descrevendo a evolução da CECFD com a concentração da solução de quilaia. Foram empregadas soluções de quilaia em 7 concentrações (na faixa de 2×10^{-2} a 2×10^{-5} g quilaia/ml solução). Nestes ensaios, foram mantidos fixos a temperatura a 25 °C, o pH a 6,0 e não houve adição de NaCl. Empregou-se agitação a 125 rpm e um tempo de contato de 60 horas. Cada ponto da curva, correspondendo a uma concentração de quilaia, foi realizado em triplicata. Estas condições de temperatura/pH/NaCl adicionado foram escolhidas por resultarem em uma CMC bem definida e elevada ($8,1 \times 10^{-4}$ g/ml). Como os níveis de separação de colesterol tem correlação direta com a concentração de quilaia em solução, uma CMC elevada oferece melhores condições para detecção de níveis potencialmente bastante baixos de variação na concentração de colesterol. Por outro lado, o elevado tempo de contato empregado (60 horas) decorreu da intenção de garantir o alcance de equilíbrio mesmo nas concentrações mais baixas de quilaia em solução.

• Preparo das soluções de quilaia

Uma solução de quilaia SIGMA na concentração de $2,0 \times 10^{-2}$ g quilaia/ml solução foi preparada com água desionizada, sem a adição de NaCl e à temperatura ambiente, utilizando placa agitadora magnética. O pH da solução foi ajustado a 6,0 pela adição de uma solução 0,1M de NaOH. A partir desta solução inicial foram preparadas soluções a várias concentrações até o valor mínimo de $2,0 \times 10^{-5}$ g/ml, por diluição sucessiva empregando-se água desionizada com pH ajustado a 6,0.

• Contato das soluções de colesterol em decano com as soluções de quilaia

Foram empregados frascos do tipo Erlenmeyer com 50 ml de capacidade providos de tampa. A eles foram adicionados com pipeta volumétrica 10 ml de solução de colesterol em decano (na concentração de 3,0 mg colesterol/ml de solução) e 10 ml da solução de quilaia definida. Os frascos foram tampados e colocados em banho com temperatura controlada a $25 \pm 0,5$ °C e agitação a 125 rpm por 60 horas. Para cada tratamento, neste caso definido como uma condição de concentração de quilaia em solução, foram empregados 3 frascos (triplicata).

Decorrido o tempo de contato previsto, os frascos correspondentes ao tratamento foram retirados do banho e amostras de 2 ml da fase decano retiradas de cada frasco com pipetas automáticas. Também foi retirada amostra da solução inicial de colesterol em decano. Todas as amostras foram colocadas em frascos de vidro com tampa e, nos casos em que a análise cromatográfica não foi feita de imediato, conservadas em geladeira.

• Determinação do teor de colesterol

A determinação do teor de colesterol foi feita tanto na solução inicial de colesterol em decano quanto nas amostras da fase decano resultantes dos vários tratamentos, empregando-se o procedimento detalhado na seção de métodos de análise.

• Análise estatística

A comparação das tendências da CMC da quilaia e da CECFD, com a variação de temperatura, pH e adição de NaCl, foi feita graficamente. Foram levadas em

consideração as tendências definidas como estatisticamente significativas nos experimentos anteriores.

Para verificação da ocorrência ou não de separação do colesterol abaixo e acima da CMC, foram calculadas as médias e os intervalos com 95% de confiança das CECFD correspondentes a cada concentração de quilaia em solução.

2. Materiais

2.1. Óleo de manteiga

Para a primeira fase da pesquisa, 02 (dois) tipos de óleo de manteiga anidro (*butteroil*) foram obtidos no mercado. Um era o produto tradicional, com teor usual de colesterol, doado pela California Cooperative Creamery (EUA). O outro era um óleo submetido a destilação por arraste a vapor e, portanto, praticamente isento de colesterol, obtido da Omega Source Corporation (EUA). Para controlar a intrínseca variabilidade destas matérias primas, um único lote de cada produto foi adquirido, conservado sob refrigeração, e utilizado em todos os experimentos. Através da mistura de diferentes proporções destes dois produtos foram obtidos óleos de manteiga com teores variados de colesterol adequados a alguns experimentos.

2.2. Soluções de colesterol em decano

Na segunda fase da pesquisa foram utilizadas soluções de colesterol em decano como substitutivos do óleo de manteiga. Este substitutivo foi formulado a partir dos componentes individuais e, portanto, tinha composição pré-definida na faixa de interesse. As soluções foram preparadas com colesterol isento de cinzas, precipitado de álcool, com pureza de 96% por CG (ref. C-3292, lote # 111H8485, Sigma Chemical Company, EUA) e com decano com teor mínimo de 99% por CG (ref. 28001, BDH Laboratory Supplies, Inglaterra).

2.3. Extratos de quilaia

Os produtos comercialmente disponíveis de saponinas de *Quillaja saponaria* são extratos de cascas com variado grau de purificação, denominados genericamente "quilaia". Portanto, ao invés de serem constituídos por uma única e pura espécie química, são misturas complexas de saponinas e outros componentes das cascas.

Na primeira fase da pesquisa foram utilizados produtos comerciais, tendo sido adquiridos dois extratos de quilaia em pó: 1) *Quillaja extract powder* ref. 122.10858 da Bell Flavors & Fragrances (EUA) e 2) *Powdered extract (P.E.) quillaia low dust* ref. 20230252 da Penco of Lyndhurst Inc. (EUA). Estes produtos são denominados simplesmente quilaia BELL e PENCO, respectivamente.

Na segunda fase da pesquisa pretendeu-se, em princípio, trabalhar com as saponinas isoladas de extratos de quilaia ou, pelo menos, com produtos de quilaia (extrato ou isolado) que fossem mais purificados, com teores elevados de saponinas e, conseqüentemente, com teores baixos de outros componentes presentes nos extratos fornecidos como aditivos para alimentos.

A primeira alternativa explorada, i.e. o isolamento da fração de saponinas a partir de extratos de quilaia comerciais, através da extração com solventes, mostrou-se impraticável. Os rendimentos obtidos foram muito baixos, o que inviabilizaria seu emprego para obter as quantidades necessárias aos experimentos previstos. A consulta a fornecedores de reagentes e produtos químicos, com presença nos mercados nacional e internacional, foi infrutífera.

Assim sendo, optou-se pela alternativa de produto mais purificado disponível, utilizando-se o extrato de saponinas de quilaia ref. S-7900 fornecido pela Sigma Chemical Company (EUA), denominado simplesmente quilaia SIGMA. As especificações de um lote típico deste produto, fornecidas pelo fabricante, indicam um teor de 13,7% de sapogeninas e 14,6% de cinzas; a análise de minerais resultou em 3,19% K, 1,54% Ca, 1,08% Mg, 0,46% S, 0,22% P e 0,16% Na.

Para controlar sua potencial variabilidade, um único lote de cada um dos extratos de quilaia em pó foi adquirido e utilizado em todos os experimentos.

2.4. Terra diatomácea

A terra diatomácea utilizada foi o Celite® 545, fornecida pela Manville Filtration & Minerals (EUA), uma terra diatomácea calcinada com as medianas do tamanho de partículas de 36,2 µm (faixa de <1 a 196 µm) e de poros de 17 µm. Outras características informadas pelo fabricante são 0,1% de umidade e 0,15% de solúveis; a análise química típica indica 89,6% SiO₂, 4,0% Al₂O₃, 1,3% Fe₂O₃, 0,2% P₂O₅, 0,2% TiO₂, 0,5% CaO, 0,6% MgO e 3,3% Na₂O+K₂O.

2.5. Outros insumos

As soluções aquosas de quilaia foram preparadas com água desionizada obtida do desionizador Milli-Q Plus (Millipore Ind. e Com. Ltda., São Paulo) e o pH ajustado com soluções 0,1M de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio (ref. 9060 e 9141, respectivamente, Merck S.A. Industrias Químicas). Quando prevista a adição de cloreto de sódio, empregou-se o produto cristalino, P.A., ACS (ref. 6404, Merck S.A. Industrias Químicas).

Para preparo de soluções padrão para análise cromatográfica foram utilizados colesterol padrão para cromatografia com pureza 99+% por CG (ref. C-8667, lote # 54H8479, Sigma Chemical Company, EUA) e 5α-colestano com pureza 98% por CG (ref. C-8003, lote # 23H4067, Sigma Chemical Company, EUA). Como solvente, foi utilizado na primeira fase da pesquisa o hexano qualidade GC capilar/GC-MS (ref. GC60393-4, Baxter Healthcare Corporation - Burdick & Jackson Division, EUA) e na segunda fase o decano com teor mínimo de 99% por CG (ref. 28001, BDH Laboratory Supplies, Inglaterra).

Outros produtos empregados foram eter etílico (anidro, ACS, ref. E138-1, Fisher Scientific, EUA), metanol (absoluto, isento de acetona, ACS, ref. A414-4, Fisher Scientific, EUA), hidróxido de potássio (lentilhas, ACS, ref. P250-500, Fisher Scientific, EUA), papel indicador de pH (faixa 1 - 10, ref. 9525, E. Merck, Alemanha) e papel de filtro Whatman #1 e #42 (círculos com 125 mm diâmetro, ref. 1001.125 e 1442.125, respectivamente, Whatman International Ltd., Inglaterra).

2.6. Equipamentos

Para a pesagem de reagentes e insumos foram utilizadas duas balanças: uma semi analítica com capacidade para 2100 g x 0,01 g, e outra analítica com capacidade para 210 g x 0,1 mg (modelos GT2100 e AP210S, respectivamente, Ohaus Corporation, EUA).

O preparo das soluções aquosas de quilaia foi feito sobre uma placa agitadora magnética modelo 753 (Fisaton Equipamentos Científicos Ltda., São Paulo). Na medição de pH empregou-se um pHmetro modelo 300 (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo).

Na secagem de precipitados para determinação do teor de saponinas em amostras de quilaia foi empregada uma estufa de secagem e esterilização modelo 315 SE (Fanem, São Paulo).

O contato das soluções aquosas de quilaia com o óleo de manteiga na primeira fase da pesquisa foi feito em banho com temperatura e agitação controlados modelo G-76 *Giratory water bath shaker* (New Brunswick Scientific Co. Inc., EUA). Na segunda fase, o contato das soluções aquosas de quilaia com as soluções de colesterol em decano foi feito em banho modelo G-01290-20 *Lab-line orbital shaker bath* (Cole Parmer, EUA), também provido de controle de temperatura e agitação.

Na centrifugação das amostras obtidas dos processos LL e SLL nos ensaios da primeira fase foi empregada uma centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC-5B *Refrigerated superspeed centrifuge* com rotor GSA (Du Pont Instruments, EUA) ou uma centrífuga para tubos Eppendorf Brinkmann modelo 5415 (Brinkmann Instruments Co. Inc., EUA).

Na análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo Varian modelo 3400 CX (Varian Instruments, EUA) com injetor do tipo SPI (*septum equipped programmable injector*) contendo insensor empacotado com lã de vidro, detetor de ionização de chama, e coluna capilar de DB-5 de 30 m x 0,25 mm e 0,1 μ m de espessura de filme (ref. 122-5032, J&W Scientific, EUA). O cromatógrafo foi acoplado a um amostrador automático Varian modelo 8100 (Varian Instruments, EUA).

As determinações de tensão superficial foram feitas em tensiômetro modelo K12 *Processor tensiometer* (Kruss GmbH, Alemanha) acoplado a um banho termostático modelo RMT (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co., Alemanha). O tensiômetro era equipado com uma placa de Wilhelmy de platina iridiada com perímetro molhado de

III. Material e Método

40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm. Para equilibrção prévia da temperatura das amostras foi empregado um banho termostático modelo DC3 (Haake Mess-Technik GmbH u. Co., Alemanha).

As medidas de mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes das partículas e de condutividade e turbidez em soluções aquosas de quilaia foram realizadas no *System Pen Kem 3000 Automated Electrokinetics Analyzer* (Pen Kem Inc., EUA).

Na análise estatística dos dados, elaboração de gráficos e figuras, e redação deste trabalho foram utilizados os programas *JMP-IN* versão 1.0 (SAS Institute Inc., EUA), *Super Anova* versão 1.1 (Abacus Concepts Inc., EUA), *Cricket Graph* versão 1.3.2 (Cricket Software, EUA), *Super Paint* versão 2.0 (Silicon Beach Software Inc., EUA), *Microsoft Excel* versão 2.2 (Microsoft Corporation, EUA) e *Microsoft Word* versão 4.0 (Microsoft Corporation, EUA) em um computador pessoal *Macintosh SE/30* (Apple Computer Inc., EUA).

3. Métodos de análise

3.1. Determinação quantitativa do teor de colesterol

Na primeira fase do projeto foi necessária a determinação do teor de colesterol no óleo de manteiga inicial, nas fases de gordura e sólida ("tortas" de terra diatomácea) resultantes dos processos, assim como no óleo extraído das tortas. Para tanto foi utilizado o procedimento de SUNDFELD (1992), cujas etapas básicas são a saponificação a quente das amostras em MeOH/KOH 2M, a extração da fração insaponificável pelo método AOAC 933.08 (1990), e quantificação do teor de colesterol por cromatografia gasosa (PENTON, 1990).

Na segunda fase do projeto foi necessária a determinação do teor de colesterol tanto nas soluções iniciais de colesterol em decano quanto nas amostras da fase decano após contato com soluções de quilaia. Nestes casos, as amostras foram injetadas diretamente no cromatógrafo, dispensadas as etapas de isolamento e purificação dos esteróis (isto é, a saponificação e a extração do insaponificável).

Os procedimentos experimentais são detalhados a seguir.

- Saponificação de amostras e separação da fração insaponificável

A saponificação foi feita nas amostras de óleo de manteiga inicial, fases de gordura e tortas de terra diatomácea resultantes dos processos, e de óleo extraído das tortas.

Estas amostras são retiradas do armazenamento frigorificado, deixadas atingir a temperatura ambiente, e então homogenizadas utilizando-se um bastão de vidro. Amostras de ca. 0,2 g são pesadas com precisão de 4 casas diretamente dentro de tubos de ensaio providos de tampa com rosca e adicionam-se 10,0 ml de uma solução 2M de KOH em metanol. Os tubos são fechados e deixados em banho maria a 100 °C por 1 hora.

Utilizando 25 ml de H₂O, transfere-se o conteúdo do tubo de saponificação para um funil de separação. Lava-se o tubo de saponificação com 25 ml de eter, juntando também esta solução ao conteúdo do funil de separação. Agita-se vigorosamente o funil de separação e deixa-se em repouso para separação das fases. Drena-se a camada inferior e transfere-se a camada de eter para um segundo funil de separação contendo 10 ml de H₂O. Lava-se a boca do primeiro funil de separação com uma quantidade mínima de eter, juntando-o ao conteúdo do segundo funil. Extrai-se a solução de sabão 2 vezes com 25 ml de eter, combinando-o com o conteúdo do segundo funil. Lavam-se as camadas de eter combinadas no segundo funil com 10 ml de H₂O, utilizando movimentos de rotação. Drena-se a fase aquosa e lavam-se as camadas de eter combinadas mais 2 vezes com 10 ml de H₂O, agitando vigorosamente. Lava-se então a solução etérea 3 vezes, alternando 10 ml de uma solução 0,5 M de KOH e 10 ml de H₂O. Lava-se a solução etérea com porções de 10 ml de H₂O até que a mesma não seja mais alcalina, como indicado pela fenolftaleína. Transfere-se a solução etérea para um bequer e deixa-se evaporar até ca. 5 ml. Transfere-se a solução etérea remanescente, quantitativamente, utilizando um pouco de éter, do bequer para um tubo de ensaio. Deixa-se evaporar e então adiciona-se 2 - 3 ml de acetona. Deixa-se evaporar novamente num banho com água quente e, então, ressuspende-se o resíduo em exatamente 2,0 ml de hexano.

- Preparo das amostras para injeção no cromatógrafo a gás

No caso das amostras submetidas à saponificação, aos 2,0 ml da solução do material insaponificável em hexano adicionou-se exatamente 0,5 ml de uma solução padrão contendo 0,66 mg/ml de 5 α -colestano em hexano, seguindo-se a injeção no cromatógrafo.

III. Material e Método

No caso das amostras de fase decano, numa ampola foram misturados 100 μ l da amostra com 900 μ l de uma solução padrão contendo 0,24 mg/ml de 5 α -colestano em decano, seguindo-se sua injeção no cromatógrafo.

Em todos os casos, foram preparadas pelo menos 2 ampolas (duplicata) para cada amostra.

• Curvas de calibração

Curvas de calibração do colesterol foram construídas utilizando 5 α -colestano como padrão externo.

Na primeira etapa do trabalho, analisando amostras saponificadas, foram empregadas soluções padrão de colesterol em hexano cobrindo a faixa de 0,012 a 0,36 mg/ml e de 5 α -colestano em hexano a 0,66 mg/ml. As amostras para injeção no cromatógrafo foram preparadas em ampolas pela mistura de 1000 μ l e 250 μ l das soluções padrão de colesterol e 5 α -colestano, respectivamente, medidos com micropipeta.

Na segunda etapa do trabalho, foram empregadas soluções padrão de colesterol em decano cobrindo a faixa de 0,6 a 3,2 mg/ml e de 5 α -colestano em decano a 0,24 mg/ml. As amostras para injeção foram preparadas em ampolas pela mistura de 100 μ l e 900 μ l das soluções padrão de colesterol e 5 α -colestano, respectivamente, medidos com micropipeta.

Na construção da curva de calibração, para cada concentração de colesterol foi calculada o quociente entre as áreas dos picos de colesterol e 5 α -colestano. Construiu-se um gráfico com a concentração de colesterol na abcissa e o quociente entre áreas na ordenada, obtendo-se o fator de resposta como o coeficiente angular da reta ajustada aos pontos experimentais. Neste procedimento foram feitas pelo menos 3 injeções (triplicata) para cada concentração. A regressão linear foi feita pelo método dos mínimos quadrados e o ajuste dos pontos experimentais ao modelo verificada através do coeficiente de determinação (R^2).

• Obtenção dos cromatogramas

O instrumento utilizado foi um cromatógrafo a gás Varian 3400 CX acoplado a um amostrador automático Varian 8100 (Varian Instruments, EUA) com os seguintes parâmetros operacionais: coluna capilar de DB-5, 30 m x 0,25 mm, 0,1 μ m de

espessura de filme (referência # 122-5032, J&W Scientific, EUA), com temperatura inicial de 150 °C e tempo de retenção inicial zero, elevada para 325 °C a 20 °C/min e então mantida por 15 minutos; injetor do tipo SPI (*septum equipped programmable injector*) com insersor empacotado, temperatura inicial de 150 °C e tempo de retenção inicial zero, elevada para 340 °C a 115 °C/min e então mantida por 10 minutos; detetor de ionização de chama operando a temperatura de 340 °C, atenuação 64 e faixa 11; gás de arraste hidrogênio com velocidade linear média na coluna de 106 cm/s; volume de amostra injetada de 0,5 µl no modo sanduíche (na seringa injetora, a amostra foi posicionada entre dois volumes de solvente puro).

A partir do cromatograma obteve-se o quociente das áreas dos picos de colesterol e 5α-colestanol que, quando divididos pelo fator de resposta, forneceu a concentração de colesterol na amostra. É oportuno mencionar que, para cada série de experimentos, foi construída uma nova curva de calibração e obtido um novo valor para o fator de resposta.

3.2. Determinação do teor de óleo na fase sólida

A determinação do teor de óleo presente nas amostras das tortas de terra diatomácea foi feita por gravimetria; os lipídios foram extraídos com CHCl₃ : MeOH : H₂O de acordo com o método de BLIGH & DYER (1959). O procedimento experimental é detalhado a seguir.

Amostras de ca. 0,5 g de torta pesadas com precisão de 4 casas (P_{am}) são colocadas em um tubo de ensaio e adicionam-se 0,4 ml de H₂O, 10 ml de MeOH e 5,0 ml de CHCl₃. Agita-se o tubo por 2 minutos, adiciona-se mais 5,0 ml de H₂O, e agita-se novamente por mais 30 segundos. Filtra-se o líquido através de papel de filtro Whatman # 1, transferindo o filtrado para um cilindro graduado. Deixa-se em repouso até a separação de fases e anota-se o volume da camada de CHCl₃ (V_t). Aspira-se toda a camada de MeOH : H₂O juntamente com um pouco da camada de CHCl₃ para garantir a remoção total da camada aquosa. Transfere-se quantitativamente uma alíquota da camada de clorofórmio (V_a) para um tubo de ensaio previamente tarado (P_{te}). Deixa-se evaporar o clorofórmio até peso constante, pesando-se o tubo de ensaio contendo o resíduo (P_f). A porcentagem em massa de óleo na amostra (% óleo) é dada por:

$$\% \text{ óleo (m/m)} = 100 \times \frac{P_{te} - P_f}{P_{am}} \times \frac{V_t}{V_a}$$

A escolha do método de BLIGH & DYER (1959) foi feita após sua comparação com o de FOLCH *et al.* (1951). Para tanto, uma mesma amostra de torta foi analisada pelos dois procedimentos, utilizando-se 4 réplicas em cada caso. Os valores de teor de óleo obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) que não detectou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os dois métodos. Uma vez que a quantidade de óleo determinada pelos dois métodos foi similar (médias de 10,50 e 10,91%, respectivamente), com coeficientes de variação aceitáveis em ambos os casos (6,7 e 2,8%, respectivamente), o método de BLIGH & DYER (1959) foi selecionado pela sua maior simplicidade operacional.

3.3. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade das amostras de fase oleosa e torta de terra diatomácea foi determinado pelo método AOAC 43.287 (1984). O procedimento experimental é detalhado a seguir.

Os recipientes de alumínio são lavados e secos em estufa de ventilação forçada a 100 °C por 1 (uma) hora, esfriados em dessecador, e pesados com precisão de 4 casas (P_1). Amostras de ca. 3,0 g são colocadas nos recipientes de alumínio previamente tarados e pesadas com precisão de 4 casas (P_1). Os recipientes contendo as amostras são colocadas em estufa de ventilação forçada a 100 °C e secas até peso constante (P_2). A porcentagem em massa de umidade na amostra (% umidade) é dada por:

$$\% \text{ umidade (m/m)} = 100 \times \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_t}$$

3.4. Determinação do teor de sapogeninas em extratos de quilaia

A base do método é a liberação, por hidrólise ácida em meio aquoso a quente, das sapogeninas que constituem as saponinas dos extratos de quilaia em pó. As sapogeninas liberadas, insolúveis em meio aquoso a temperaturas elevadas, são então quantificadas gravimetricamente. O procedimento experimental, baseado em BRAUN *et al.* (1981) e IRELAND & DZIEDZIC (1985), recomendado e empregado

como método padrão pela Sigma Chemical Company (EUA) para análise de quilaia, é detalhado a seguir.

Amostras de ca. 500 mg de quilaia em pó são pesadas com precisão de 4 casas (P_1) e transferidas para erlenmeyers de 200 ml. Adicionam-se as amostras 35 ml de H_2SO_4 4 N e 20 ml de água destilada. Tampam-se os erlenmeyers com lentes de vidro e deixa-se digerir em banho com água fervente por 5 (cinco) horas. Terminado o prazo de digestão, filtram-se as amostras a quente, sob vácuo de 150 - 200 mmHg, através de filtro Whatman # 42. Os filtros devem ser previamente secos em estufa a 100 °C por 30 (trinta) minutos, esfriados em dessecador, e pesados com precisão de 4 casas (P_{tpt}). O erlenmeyer de digestão e o sedimento retido no filtro devem ser lavados com água quente até neutralidade, medida com papel medidor de pH universal. Os filtros contendo os precipitados lavados são secos em estufa a 100 °C por 30 (trinta) minutos, esfriados em dessecador e pesados com precisão de 4 casas (P_2). A porcentagem em massa de precipitado (% sapogenina) é dada por:

$$\% \text{ Sapogenina (m/m)} = 100 \times \frac{P_2 - P_{tpt}}{P_1}$$

O método se mostrou satisfatório para os propósitos deste estudo, com coeficiente de variação de 3,8 e 14,5 % para determinações feitas em amostras das quilaia PENCO e BELL, respectivamente.

Se desejado, o teor de sapogeninas determinado pode ser convertido ao de saponinas, usando-se fator de conversão baseado na relação de pesos moleculares (PM) da saponina e da sapogenina. Considerando-se como sapogenina o ácido quilaico (PM 487) e a saponina QS-18 (PM 2151) como representativas dos extratos de quilaia (DEV *et al.*, 1989; PILLION *et al.*, 1996), o fator de conversão utilizado neste trabalho é de 4,4 g saponinas/g sapogenina.

3.5. Determinação da tensão superficial em soluções aquosas de quilaia

As leituras foram feitas utilizando-se o método da placa de Wilhelmy (KRÜSS GMBH, 1992) em tensiômetro modelo K12 *Processor tensiometer* (Krüss GmbH, Alemanha) equipado com uma placa de platina iridiada com perímetro molhado de 40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm. O tensiômetro foi acoplado a um banho termostático modelo RMT (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co., Alemanha).

As amostras das soluções foram feitas pelo menos em duplicata que, previamente à realização das medidas, tiveram sua temperatura equilibrada nos níveis exigidos em banho termostático modelo DC3 (Haake Mess-Technik GmbH u. Co., Alemanha). As medições foram feitas das soluções mais diluídas para as mais concentradas, de modo a minimizar o efeito de uma eventual contaminação entre amostras. A checagem do instrumento foi feita, previamente ao início de cada série de medidas, através da medida da tensão superficial da água desionizada.

Foram realizados pelo menos 2 ciclos de medidas em cada amostra, cada ciclo composto pela imersão da placa e a tomada contínua de medidas a intervalos de 15 segundos. O critério de parada empregado em cada ciclo foi o alcance de um desvio padrão menor ou igual a 0,20 mN/m nas últimas 5 medidas, considerando-se a média destas como a tensão superficial da amostra. Nos casos em que, atingido um desvio padrão menor ou igual a 0,20 mN/m, a inspeção dos resultados indicou que a tensão superficial da amostra ainda demonstrava tendência de queda, novos ciclos de medidas foram feitos até a obtenção de valores constantes.

3.6. Determinação da condutividade elétrica e turbidez em soluções aquosas de quilaia

Foi utilizado o *System Pen Kem 3000 Automated Electrokinetics Analyzer*, cujo diagrama e princípio de funcionamento são apresentados na seção 3.8, para medida da condutividade elétrica e turbidez das soluções de quilaia. A condutividade elétrica da solução é determinada pela aplicação de corrente elétrica e medição do potencial resultante entre os eletrodos, com as correções referentes à polarização de eletrodos e aquecimento Joule feitas automaticamente. A turbidez das soluções é medida através da determinação da intensidade de luz espalhada (*scattered light*) a 90° (PEN KEM INC., 1992 a; PEN KEM INC., 1992 b).

A calibração do aparelho para medida da condutividade foi feita com soluções 0,01 M de KCl; para a turbidez utilizaram-se como padrões as próprias soluções de quilaia, atribuindo-se o valor de 5 e 100 UA (unidades arbitrárias) para as concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ g quilaia/ml solução, respectivamente.

Todas as medidas foram feitas a temperatura de 25 °C, realizando-se pelo menos 3 medidas em cada amostra.

3.7. Determinação da concentração de micela crítica (CMC) das quilaia através da tensão superficial, condutividade elétrica e turbidez das soluções aquosas

A determinação da CMC a partir dos resultados da tensão superficial, condutividade e turbidez das soluções, independentemente, foi feita utilizando-se gráficos contendo a concentração da solução na abcissa e a propriedade medida na ordenada (HALL & TIDDY, 1981; HIEMENZ, 1986), como ilustrado na Figura III.3.

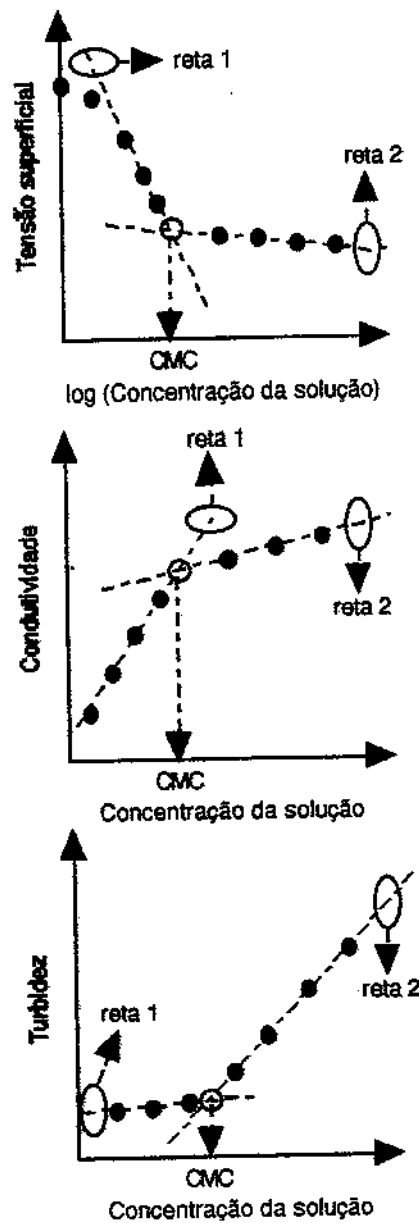


FIGURA III.3. Determinação gráfica da concentração da micela crítica (CMC) através da tensão superficial, condutividade e turbidez das soluções.

Note-se que a escala empregada na abcissa destes gráficos, referente à concentração da solução de quilaia, é logarítmica quando a propriedade é a tensão superficial e linear no caso da condutividade e turbidez.

A CMC foi localizada graficamente, correspondendo à concentração da solução onde ocorreu a descontinuidade associada à formação de micelas. No método empregado, 2 retas foram ajustadas aos pontos experimentais alinhados antes e depois da região de descontinuidade (retas 1 e 2, respectivamente, na Figura III.3), utilizando-se o método dos mínimos quadrados. Considerou-se como valor da CMC a concentração da solução correspondente à intersecção destas retas.

3.8. Determinação da mobilidade eletroforética e do diâmetro de Stokes das partículas presentes em soluções aquosas de quilaia

Foi utilizado o *System Pen Kem 3000 Automated Electrokinetics Analyzer*, cujo diagrama é apresentado na Figura III.4, que utiliza as técnicas de eletroforese capilar associada a espalhamento de luz (*light scattering*) para determinação da mobilidade eletroforética e coeficientes de difusão de estruturas coloidais em solução; outras medidas incluem a condutividade elétrica e turbidez (PEN KEM INC., 1992a; PEN KEM INC., 1992b).

O sistema emprega uma câmara de eletroforese composta por um tubo capilar de sílica montado horizontalmente, contendo dois eletrodos de paládio, em um banho termostatizado. Um laser de hélio-neon de 2 mW montado verticalmente e o sistema ótico associado fornecem uma cortina de luz que ilumina somente as partículas no plano focal de um sistema de microscópio controlado por computador; o sistema automaticamente focaliza o microscópio no ponto de fluxo eletrosmótico zero. A imagem das partículas iluminadas é projetada em um disco de vidro rotativo contendo um *grid* radial de precisão. O movimento da imagem da partícula em relação ao *grid* causa uma flutuação na intensidade da luz transmitida, que é então convertida num sinal elétrico por um detector adequado (PEN KEM INC., 1992a; PEN KEM INC., 1992b).

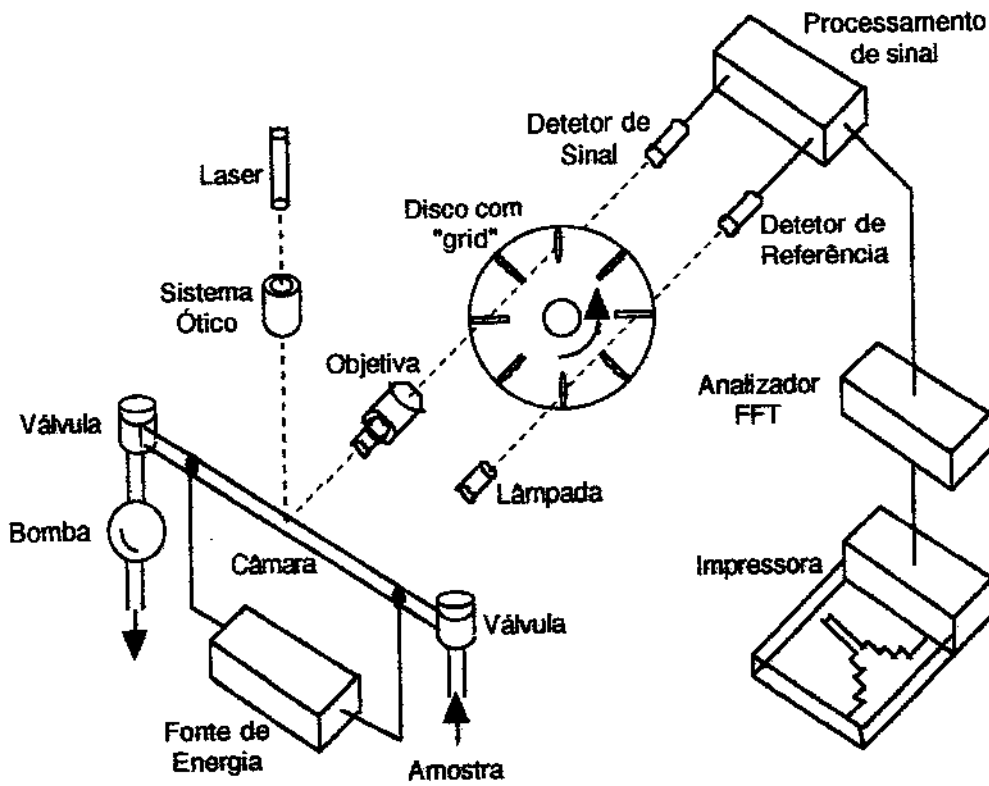


FIGURA III.4. Diagrama do Sistema Pen Kem 3000.

Em medida de mobilidade eletroforética, uma corrente elétrica é aplicada entre os eletrodos, e as partículas se movem eletroforicamente: as partículas carregadas negativamente em direção ao anodo e aquelas carregadas positivamente em direção ao catodo. Se a imagem de uma determinada partícula se movimenta na mesma direção do *grid* contido no disco rotativo, atravessa um número menor de elementos do *grid* por unidade de tempo, e o seu sinal estará a uma frequência menor que o oriundo do detetor de referência (que mede somente o movimento do *grid*). Analogamente, se a partícula (e sua imagem) se move na direção oposta, o sinal estará a uma frequência mais alta relativamente à referência. Tipicamente, muitas partículas são medidas simultaneamente, cada partícula contribuindo com um sinal com um desvio de frequência (sinal Doppler) associado à sua velocidade eletroforética. A relação entre a velocidade eletroforética da partícula e o desvio de frequência observado depende somente de amplificação do sistema de microscópio e da periodicidade do *grid* rotativo, que são medidas com precisão. Um analisador FFT (*Fast Fourier Transform*) determina o espectro de frequências a partir destes sinais Doppler e calcula a média de sucessivos espectros para obter a distribuição de velocidades eletroforéticas (PEN KEM INC., 1992a, 1992b). A partir da distribuição de velocidades eletroforéticas obtida e do campo elétrico aplicado, obtêm-se a

distribuição de mobilidades eletroforéticas (HIEMENZ, 1986; WARE, 1986; HUNTER, 1988; EVERETT, 1989; ADAMSON, 1990).

Na medida do coeficiente de difusão não é aplicada corrente elétrica entre os eletrodos e as partículas exibem somente o movimento browniano. O espectro de frequências será simétrico em relação a zero, uma vez que não há um movimento "líquido" das partículas para esquerda ou para a direita, mas a largura do espectro é proporcional ao coeficiente de difusão (PEN KEM INC., 1992a; PEN KEM INC., 1992b). Obtido o coeficiente de difusão das partículas e considerando-as como esferas, o seu tamanho (diâmetro) pode ser calculado pela equação de Stokes-Einstein (HIEMENZ, 1986; WARE, 1986; HUNTER, 1988; EVERETT, 1989; ADAMSON, 1990).

A calibração do aparelho para medida da condutividade foi feita com soluções 0,01 M de KCl; para a turbidez utilizaram-se como padrões as próprias soluções de quilaia, atribuindo-se o valor de 5 e 100 UA (unidades arbitrárias) para as concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ g quilaia/ml solução, respectivamente. As demais calibrações do equipamento foram feitas com uma solução padrão de latex fornecida pela próprio fabricante do aparelho, que também foi utilizada para a checagem do equipamento previamente ao início de cada série de medidas.

Todas as medidas foram feitas à temperatura de 25 °C, realizando-se pelo menos 3 medidas em cada amostra.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados resultados experimentais relativos à redução do teor de colesterol da gordura láctea, através do uso de soluções aquosas contendo saponinas de grau alimentício de *Quillaja saponaria* Molina.

São considerados dois processos de separação alternativos propostos por SUNDFELD (1992) e denominados: 1) Líquido-líquido (LL), envolvendo o contato do óleo de manteiga com uma solução aquosa de quilaia, e 2) Sólido-líquido-líquido (SLL), em que ao meio líquido bifásico resultante do processo LL é adicionada a terra diatomácea; a etapa final em ambos os processos é a separação e recuperação, por centrifugação, do óleo com teor reduzido de colesterol.

1. Primeira Fase: Avaliação dos processos de separação líquido-líquido (LL) e sólido-líquido-líquido (SLL) para remoção de colesterol do óleo de manteiga

Nesta primeira fase, de caráter eminentemente tecnológico, 05 (cinco) estudos serviram para avaliar as opções de processo assim como o efeito de variáveis nos níveis de remoção de colesterol. Nesta fase foram utilizados extratos de quilaia em pó e óleo de manteiga (*butteroil*) comercialmente disponíveis. Os resultados destes estudos são apresentados e discutidos a seguir.

Inicialmente é oportuno mencionar que, nas situações estudadas, uma camada fina de textura cremosa, análoga a uma emulsão, foi observada na região intermediária entre as fases líquidas (oleosa/aquosa) resultantes dos processos LL e SLL. A quantidade desta camada, numa avaliação visual, foi muito pequena comparativamente às demais fases presentes no sistema. Esta camada foi evitada (ou excluída) nos procedimentos de coleta de amostras da fase oleosa para determinação de colesterol uma vez que, sob ponto de vista do desenvolvimento do processo tecnológico, o óleo é o produto de interesse principal. Assim, esta emulsão foi encarada como perda potencial de óleo, cuja recuperação deveria ser tratada oportunamente.

1.1. Efeito de parâmetros do processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL) nos níveis de remoção de colesterol

Estes experimentos visaram definir, para o processo de separação SLL, a significância dos efeitos da concentração (CSQ) e pH da solução aquosa de quilaia, temperatura e quantidade de terra diatomácea (QTD), nos níveis de remoção de colesterol. Os efeitos dos parâmetros de processo nos teores de colesterol da fase oleosa e da torta resultantes dos tratamentos foi avaliado por análise de variância (ANOVA). Procurou-se estabelecer as tendências dos níveis de remoção de colesterol com estas variáveis, definindo os parâmetros de maior relevância.

• Efeito da temperatura

Os resultados da ANOVA, apresentados em detalhe nas Tabelas C.1 e C.2 do Apêndice C, indicaram um efeito não-significativo da temperatura no teor de colesterol das amostras de fase oleosa ($P > 0,05$) e de torta ($P > 0,05$) resultantes do processo SLL. Da evolução dos teores de colesterol na fase oleosa e na torta resultantes do processo, apresentada nas Tabelas IV.1 e IV.2 e ilustrada nas Figuras IV.1 e IV.2, respectivamente, se pode observar que não houve variação significativa com a alteração da temperatura.

• Efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura

Os resultados da ANOVA, apresentados em detalhe na Tabela D.1 do Apêndice D, indicaram efeitos não-significativos ($P > 0,05$) da temperatura e da interação entre pH e temperatura no teor de colesterol das amostras de fase oleosa resultantes do processo SLL, enquanto que o efeito do pH foi altamente significativo ($P = 0,0001$). Portanto, os níveis de colesterol na fase oleosa resultantes do processo não foram afetados pelas mudanças de temperatura, mas diminuíram significativamente com o decréscimo do pH. A evolução do teor de colesterol nesta fase é apresentada na Tabela IV.3 e ilustrada na Figura IV.3, indicando o aumento do nível de remoção de colesterol com a diminuição do pH.

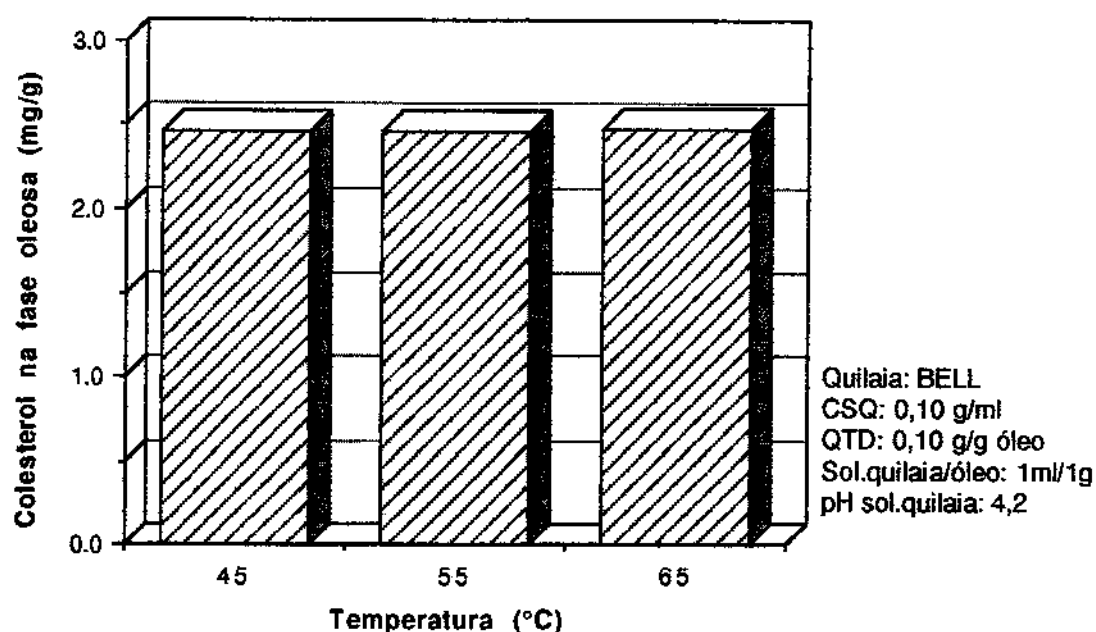


FIGURA IV.1. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com a variação de temperatura no processo SLL.

TABELA IV.1. Efeito da temperatura no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos.

| Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|-------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 45°C | 3 | 2,46 ± 0,07 | A |
| 55°C | 4 | 2,46 ± 0,07 | A |
| 65°C | 4 | 2,48 ± 0,08 | A |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH da solução de quilaia: 4,2.

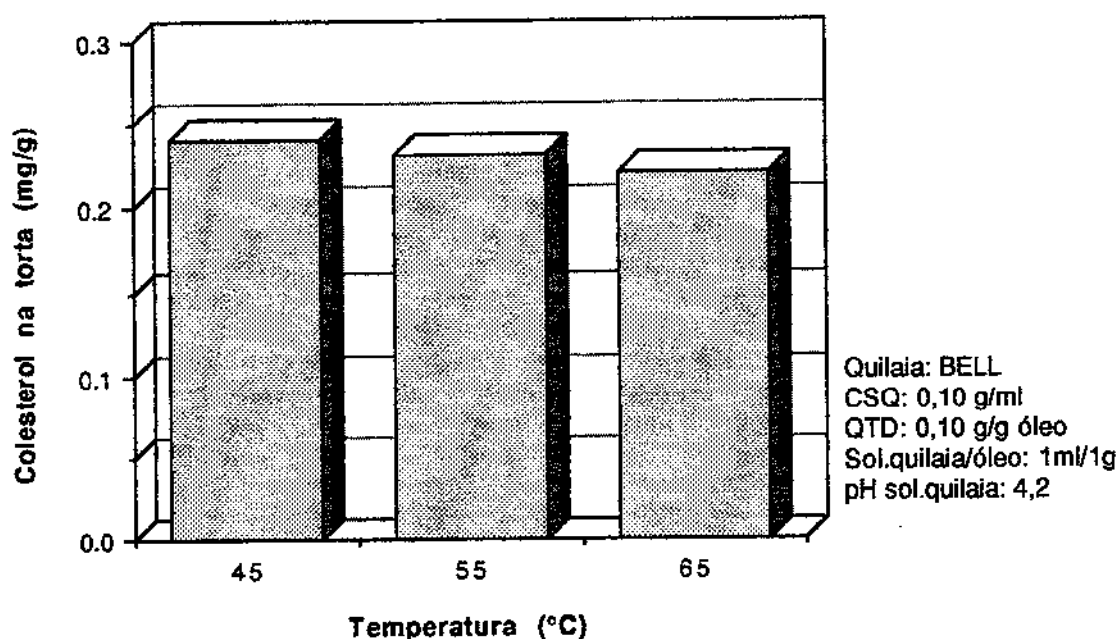


FIGURA IV.2. Evolução do teor de colesterol na torta de terra diatomácea com a variação de temperatura no processo SLL.

TABELA IV.2. Efeito da temperatura no teor de colesterol da torta de terra diatomácea resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos.

| Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|-------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 45°C | 4 | 0,24 ± 0,06 | A |
| 55°C | 4 | 0,23 ± 0,02 | A |
| 65°C | 4 | 0,22 ± 0,01 | A |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH da solução de quilaia: 4,2.

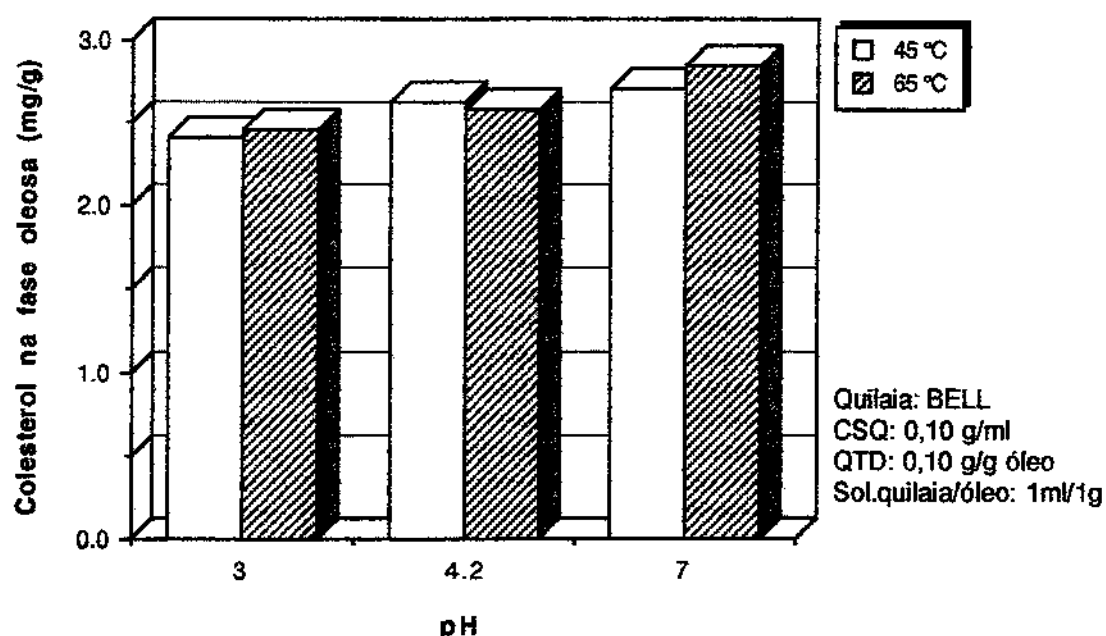


FIGURA IV.3. Evolução dos teores de colesterol na fase oleosa com a variação do pH da solução de quilaia e da temperatura no processo SLL.

TABELA IV.3. Efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento pH / Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 3,0 / 45°C | 4 | 2,40 ± 0,13 | A |
| 3,0 / 65°C | 4 | 2,45 ± 0,12 | A B |
| 4,2 / 45°C | 4 | 2,63 ± 0,04 | B C D |
| 4,2 / 65°C | 3 | 2,58 ± 0,03 | A B C |
| 7,0 / 45°C | 4 | 2,70 ± 0,12 | C D |
| 7,0 / 65°C | 4 | 2,84 ± 0,07 | D |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga.

O resultado global que emerge da análise dos efeitos no teor de colesterol na torta resultante do processo SLL, apresentado em detalhe na Tabela D.2 do Apêndice D, é análogo: o efeito da temperatura resultou não-significativo ($P > 0,05$) e o do pH altamente significativo ($P = 0,0003$); a significância da interação entre estas variáveis ($P = 0,0053$) não interfere na análise das tendências observadas. Os níveis de colesterol na torta aumentaram significativamente com a diminuição do pH da solução de quilaia, mas não se alteraram com a variação de temperatura, como apresentado na Tabela IV.4 e ilustrado na Figura IV.4.

Muito embora as médias dos tratamentos indiquem majoritariamente um ligeiro aumento do teor de colesterol na fase oleosa resultante do processo SLL com o aumento da temperatura, as diferenças observadas resultaram não significativas. Assim, o efeito da temperatura resultou não-significativo, em desacordo com os resultados preliminares de SUNDFELD (1992) que relatou um ligeiro, porém significativo, aumento no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL com o aumento da temperatura.

Por outro lado, o efeito significativo do pH encontrado neste trabalho corrobora os resultados preliminares de SUNDFELD (1992), que também observou uma diminuição do teor de colesterol na fase oleosa resultante do processo SLL com a redução do pH. Assim sendo, a redução do pH promove aumento na remoção de colesterol. É importante ressaltar o fato de que, embora estatisticamente significativas, as diferenças nos teores de colesterol induzidas pelo ajuste do pH da solução de quilaia são pequenas.

• Efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD)

Os resultados da ANOVA, apresentados em detalhe na Tabela E.1 do Apêndice E, indicaram efeitos altamente significativos tanto da concentração da solução de quilaia ($P = 0,0001$) quanto da quantidade de terra diatomácea empregada ($P = 0,0001$) no teor de colesterol das amostras de fase oleosa resultantes do processo SLL; a significância da interação entre estas variáveis ($P = 0,0379$) não interfere na análise das tendências observadas. Os níveis de colesterol na fase oleosa diminuíram significativamente com o aumento da CSQ e da QTD, como apresentado na Tabela IV.5 e ilustrado na Figura IV.5.

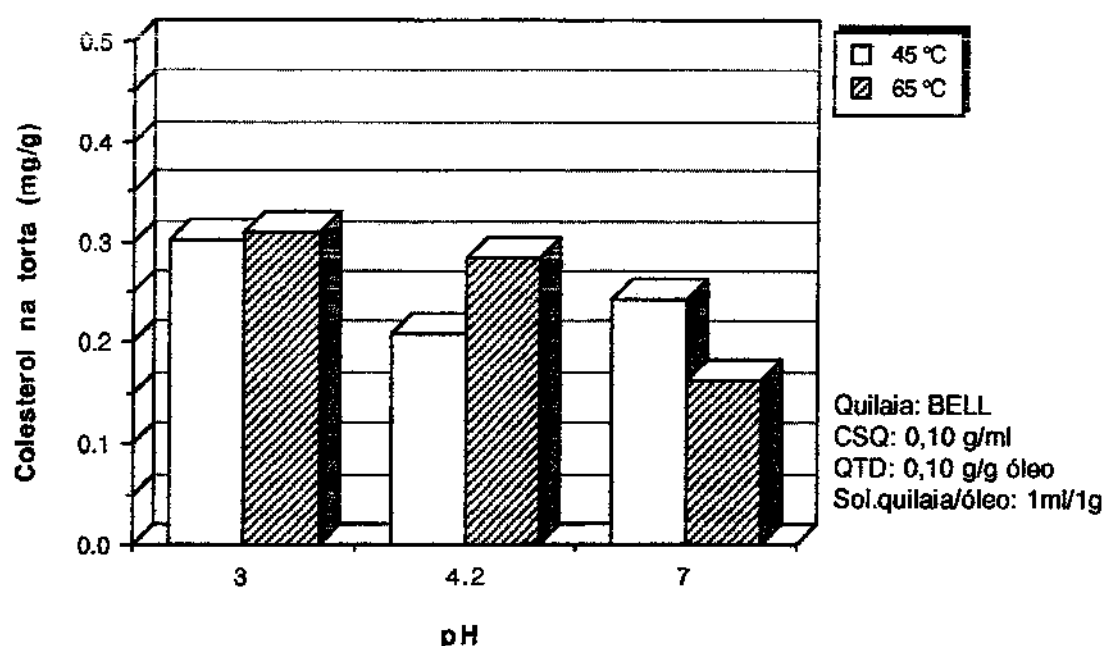


FIGURA IV.4. Evolução dos teores de colesterol na torta de terra diatomácea com a variação do pH da solução de quilaia e da temperatura no processo SLL.

TABELA IV.4. Efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura no teor de colesterol da torta de terra diatomácea resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento pH / Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 3,0 / 45°C | 4 | 0,30 ± 0,02 | A |
| 3,0 / 65°C | 4 | 0,31 ± 0,04 | A |
| 4,2 / 45°C | 4 | 0,21 ± 0,03 | B C |
| 4,2 / 65°C | 3 | 0,28 ± 0,03 | A B |
| 7,0 / 45°C | 3 | 0,24 ± 0,05 | A B C |
| 7,0 / 65°C | 4 | 0,16 ± 0,05 | C |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga.

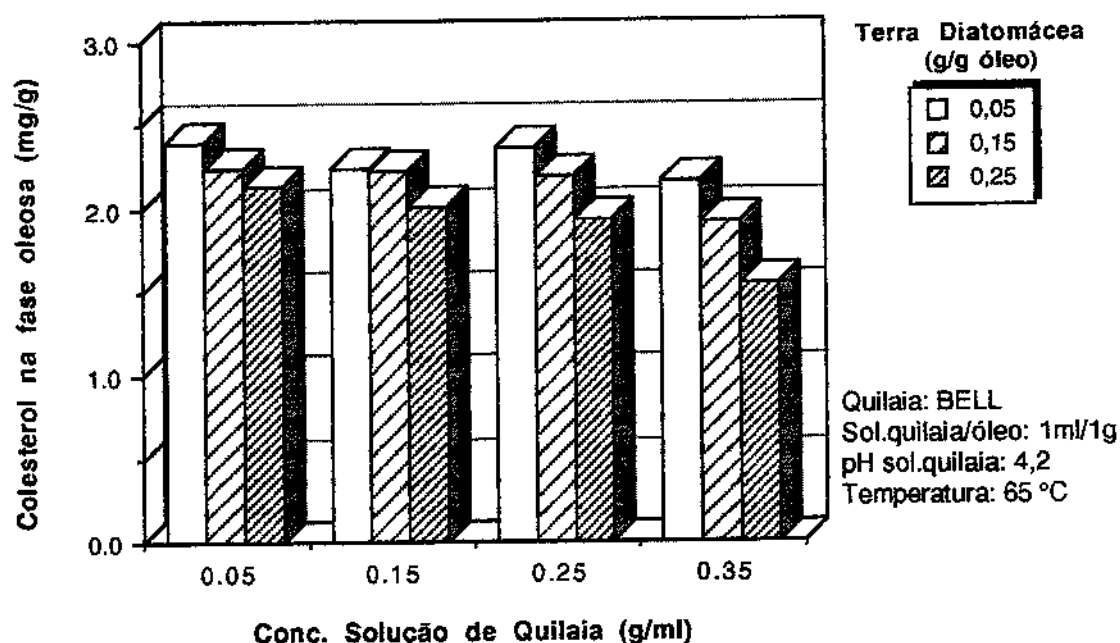


FIGURA IV.5. Evolução dos teores de colesterol na fase oleosa com a variação da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no processo SLL.

TABELA IV.5. Efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento CSQ / QTD | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|---|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,39 ± 0,13 | A |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,24 ± 0,10 | A B |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,14 ± 0,19 | A B C |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,24 ± 0,08 | A B |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,22 ± 0,06 | A B |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,01 ± 0,05 | B C |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,37 ± 0,06 | A |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,20 ± 0,14 | A B |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 1,94 ± 0,05 | B C |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,17 ± 0,11 | A B C |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 1,91 ± 0,09 | C |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 1,55 ± 0,17 | D |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são significativamente distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g/50 ml; temperatura: 65 °C; pH da solução de quilaia: 4,2.

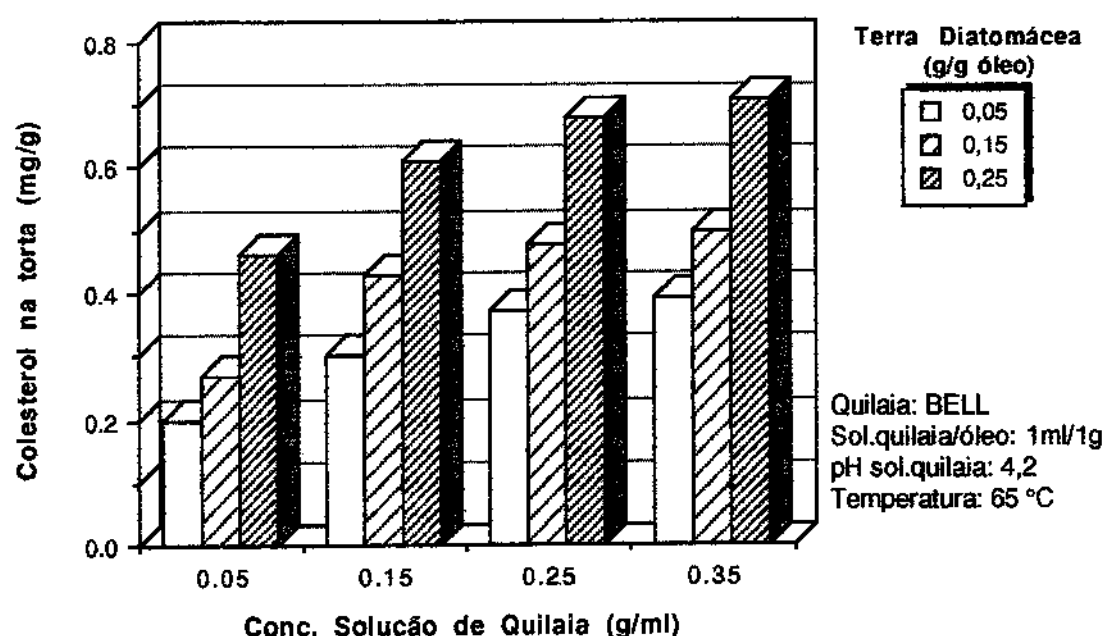


FIGURA IV.6. Evolução dos teores de colesterol na torta de terra diatomácea com a variação da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no processo SLL.

TABELA IV.6. Efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no teor de colesterol da torta resultante do processo SLL: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento CSQ / QTD | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|---|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,20 ± 0,01 | A |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,27 ± 0,02 | A B |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,46 ± 0,03 | D E |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 3 | 0,30 ± 0,01 | A B C |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,43 ± 0,04 | D E |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,61 ± 0,07 | F |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,37 ± 0,02 | B C D |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,48 ± 0,09 | E |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,68 ± 0,02 | F |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,39 ± 0,05 | C D E |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,50 ± 0,04 | E |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,71 ± 0,01 | F |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são significativamente distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g/50 ml; temperatura: 65 °C; pH da solução de quilaia: 4,2.

O resultado da análise dos efeitos no teor de colesterol na torta resultante do processo SLL, apresentado em detalhe na Tabela E.2 do Apêndice E, é análogo. Observam-se efeitos altamente significativos da CSQ ($P = 0,0001$) e da QTD ($P = 0,0001$), enquanto que a interação entre estas variáveis resultou não significativo ($P > 0,05$). Os níveis de colesterol na torta aumentaram continuamente com o aumento da CSQ e da QTD, como mostram a Tabela IV.6 e a Figura IV.6.

Os efeitos significativos da CSQ e QTD encontrados neste trabalho corroboram os resultados preliminares de SUNDFELD (1992), que também observou uma diminuição do teor de colesterol na fase oleosa resultante do processo SLL com o aumento da CSQ e da QTD.

Assim sendo, o aumento da CSQ e da QTD promove a remoção de colesterol. É importante ressaltar o fato de que estes resultados indicam que uma variação bastante ampla dos teores de colesterol na fase oleosa resultante do processo SLL pode ser atingida através do controle da CSQ e da QTD. Observe-se que a elevação dos níveis de remoção de colesterol via aumento da QTD implica também no aumento da perda potencial do produto final (óleo com teor de colesterol reduzido) devido à sua inclusão na torta, como veremos a seguir.

• Níveis de remoção de colesterol do processo SLL

Os níveis de remoção de colesterol obtidos neste trabalho são menores que as expectativas geradas por SUNDFELD (1992), que relatou a remoção de até 82,8% do colesterol presente no óleo de manteiga pela aplicação de um único estágio do processo SLL, empregando elevados níveis de CSQ e QTD.

No presente trabalho, uma redução de até 42,8% no teor de colesterol foi alcançada, obtendo-se uma fase oleosa com 1,55 mg/g a partir do óleo de manteiga com um teor inicial de 2,71 mg/g.

Para compatibilizar os resultados do presente trabalho com os obtidos anteriormente por SUNDFELD (1992), é relevante considerar que neste último trabalho foi utilizada uma quilaia de procedência distinta e condições ligeiramente diferentes no processo SLL. SUNDFELD (1992) utilizou quilaia PENCO a CSQ de 0,40 g/ml, pH de 4,5 e 45 °C, quando foram obtidos os expressivos 82,8% de remoção de colesterol. No presente trabalho, utilizando quilaia BELL, obteve-se 42,8% a uma CSQ de 0,35 g/ml, pH de 4,2 e 65 °C. Assim, o melhor resultado de SUNDFELD (1992) pode ser tentativamente atribuído ao emprego de diferentes

condições de processo, particularmente a utilização de uma CSQ mais elevada. É também oportuno verificar a hipótese de que as diferentes quilaia utilizadas, PENCO e BELL, não sejam igualmente efetivas na remoção de colesterol, nas mesmas condições de processo.

- Presença de óleo na torta e seletividade da separação

As análises realizadas nas tortas resultantes dos vários ensaios indicaram a presença de teores relevantes de óleo. Os resultados obtidos nos ensaios do efeito da temperatura, apresentados na Tabela C.3 do Apêndice C, indicaram um teor médio de óleo de 5,3% (faixa de variação de 4,9 a 5,8% m/m). Nos ensaios do efeito combinado do pH e da temperatura, cujos resultados são apresentados na Tabela D.3 do Apêndice D, obteve-se um teor médio de óleo de 6,4% (faixa de variação de 5,7 a 7,3% m/m). As análises realizadas nas tortas resultantes dos ensaios do efeito combinado da CSQ e da QTD, cujos resultados são apresentados na Tabela E.3 do Apêndice E, indicaram um teor médio de óleo de 8,2% (faixa de variação de 3,8 a 13,5% m/m); mais ainda, observa-se claramente uma tendência de aumento no teor de óleo na torta com o aumento da quantidade de terra diatomácea adicionada.

Por outro lado, os resultados analíticos também indicaram teores relativamente baixos de colesterol nas tortas resultantes do processo SLL, com médias globais ao redor de 0,23 mg/g nos ensaios do efeito da temperatura, 0,25 mg/g nos ensaios do efeito combinado do pH e da temperatura, e 0,45 mg/g nos ensaios do efeito combinado da CSQ e da QTD.

Considerados os relevantes teores de óleo em conjunto com os teores relativamente baixos de colesterol nas tortas, aventou-se a possibilidade de que o colesterol presente nas tortas não fosse resultado de uma associação seletiva, mas simplesmente uma consequência da presença de óleo (contendo colesterol) mecanicamente ocluído nela.

Dividindo-se os teores de colesterol e de óleo determinados nas tortas obtidas nos mesmos tratamentos, calcula-se um teor hipotético de colesterol no óleo associado à torta, que representa a hipótese de que todo o colesterol presente na torta está contido no óleo mecanicamente ocluído (vide balanço de massa, cujos procedimentos estão detalhados no Apêndice A). Na ocorrência de uma associação não seletiva, a expectativa é a de que este teor hipotético de colesterol calculado fosse igual ao observado na fase oleosa resultante do processo SLL correspondente.

Nos ensaios do efeito da temperatura, este cálculo indicou uma média do teor hipotético de colesterol no óleo associado à torta de 4,4 mg/g, quase o dobro do encontrado na fase oleosa resultante dos tratamentos. Nos ensaios do efeito combinado do pH e da temperatura, os cálculos indicaram uma média global do teor hipotético de colesterol no óleo associado à torta de 4,0 mg/g, muito acima do encontrado na fase oleosa resultante dos tratamentos. Finalmente, nos ensaios do efeito combinado da CSQ e da QTD, a média global do teor hipotético de colesterol no óleo associado à torta foi de 5,9 mg/g, também muito acima do encontrado na fase oleosa resultante dos tratamentos (média global de 2,1 mg/g).

Estes resultados permitem rejeitar a hipótese de que todo o colesterol presente nas tortas seja resultado da presença de óleo (contendo colesterol) mecanicamente ocluído nelas. Assim, do colesterol presente na torta, apenas uma parcela pode ser atribuída ao óleo (contendo colesterol) mecanicamente ocluído.

- Colesterol na fase aquosa e seletivamente associado à torta

Balanços de massa, cujos procedimentos estão detalhados no Apêndice A, foram utilizados para estimar a concentração de colesterol seletivamente associado à torta, ou seja, descontado aquele presente no óleo mecanicamente ocluído. Também, foi estimada a concentração de colesterol presente na fase aquosa.

Os resultados obtidos nos ensaios do efeito da temperatura, apresentados na Tabela C.4 do Apêndice C, indicaram valores médios de 0,25 mg/ml fase aquosa e 0,27 mg/g Celite®. Os resultados dos ensaios do efeito combinado do pH e da temperatura, apresentados na Tabela D.4 do Apêndice D, indicaram valores médios de 0,20 mg/ml fase aquosa e 0,28 mg/g Celite® e uma tendência coerente com o efeito do pH na remoção de colesterol: aumento do teor de colesterol seletivamente associado à torta e presente na fase aquosa, com a diminuição do pH. Os resultados dos ensaios do efeito combinado da CSQ e da QTD, apresentados nas Tabelas E.4 e E.5 do Apêndice E, indicaram valores médios globais de 0,61 mg/ml fase aquosa e 0,71 mg/g Celite® e uma tendência coerente com o efeito da CSQ e da QTD na remoção de colesterol: aumento do teor de colesterol seletivamente associado à torta e presente na fase aquosa, com o aumento da CSQ e QTD.

- Comentários finais

Os níveis de separação atingidos no presente trabalho foram menores que os obtidos por SUNDFELD (1992). De maneira geral, menores níveis de separação são mais difíceis de serem detectados e, assim, uma eventual significância do efeito da temperatura no processo pode não ter sido detectada no presente trabalho.

Em todos os casos estudados, observa-se uma distribuição de colesterol entre todas as três fases (aquosa, oleosa e sólida) em contato decorrentes do processo SLL, resultando uma fase oleosa com teor de colesterol menor que o observado no óleo de manteiga inicial. Mais ainda, a diminuição dos teores de colesterol nas fases oleosas decorrentes de efeitos significativos de parâmetros de processo (pH, CSQ e QTD) foi acompanhada pela elevação tanto dos teores de colesterol seletivamente associados à torta quanto daqueles presentes nas fases aquosas correspondentes.

1.2. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo nas etapas dos processos de separação LL e SLL

Estes experimentos visaram definir, para as etapas de contato líquido-líquido (LL) e sólido-líquido-líquido (SLL) independentemente, a evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo, variando-se a concentração de quilaia na solução aquosa. Os parâmetros temperatura, pH e quantidade de terra diatomácea foram mantidos fixos a 55 °C, 4,35 e 0,15 g/g óleo, respectivamente, que são os valores médios das faixas de interesse definidas no estudo anterior. Procurou-se estabelecer o tempo necessário para alcance de uma condição "prática" de equilíbrio, isto é, o tempo de contato após o qual espera-se que as mudanças na concentração de colesterol na fase oleosa, se ocorrerem, o farão a uma taxa muito baixa, proibitiva para aplicações práticas. Além de constituir uma informação de evidente interesse e implicações tecnológicas, o tempo de equilíbrio é também uma informação necessária para execução dos estudos previstos de distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL.

- Tempo de equilíbrio na etapa de contato líquido-líquido (LL)

Os resultados da variação do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa LL, a várias concentrações da solução de quilaia (CSQ), apresentados em detalhe na Tabela F.1 do Apêndice F, são ilustrados na Figura IV.7. A concentração no tempo de contato LL "zero" corresponde à amostra de óleo de manteiga utilizada no ensaio.

Na CSQ de 0,05 g/ml, observa-se uma aparente diminuição do teor de colesterol na fase oleosa ao longo da faixa de tempos de contato LL estudada. Entretanto, não se observa nenhuma diferença estatisticamente significativa dos tempos de contato entre si e em relação ao óleo de manteiga inicial (tempo "zero").

Nas CSQ's de 0,20 e de 0,35 g/ml, a tendência é de uma gradual diminuição do teor de colesterol na fase oleosa até um tempo de contato LL de 20 minutos, seguindo-se uma flutuação de valores. Assim sendo, tempos de contato na etapa LL maiores ou iguais a 20 minutos resultaram em teores de colesterol na fase oleosa estatisticamente equivalentes.

- Tempo de equilíbrio na etapa de contato sólido-líquido-líquido (SLL)

O tempo de contato SLL é o tempo de contato do Celite® 545 com a suspensão (óleo de manteiga/solução de quilaia) resultante da etapa de contato LL. Os resultados da variação do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa SLL, a várias concentrações da solução de quilaia, apresentados em detalhe na Tabela F.2 do Apêndice F, são ilustrados na Figura IV.8. A concentração no tempo de contato SLL "zero" corresponde à amostra de fase oleosa retirada logo após a adição e mistura do Celite® 545 na suspensão óleo de manteiga/solução de quilaia resultante da etapa de contato LL.

Os resultados indicam uma flutuação no teor de colesterol da fase oleosa ao longo da faixa de tempos de contato SLL estudada, inclusive o tempo de contato "zero", independentemente da concentração da solução de quilaia. Ressalte-se que o tempo de contato SLL definido como "zero" representa, na realidade experimental, um período de tempo finito decorrido entre a adição do adsorvente, sua mistura na suspensão e a coleta de amostras da fase oleosa. Assim sendo, é mais apropriado indicar que não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre

tempos de contato SLL maiores ou iguais a 10 minutos ou, em outras palavras, que tempos de contato na etapa SLL maiores ou iguais a 10 minutos resultaram em nível de redução de colesterol equivalente.

• Comentários finais

É importante lembrar que os tempos de equilíbrio obtidos (20 min para a etapa de contato LL e 10 min para a SLL) se aplicam, estritamente, às condições empregadas. Para o estudo da distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL, abordado na próxima seção, optou-se por dar uma margem de segurança substancial, utilizando-se tempos de contato de 60 minutos nas etapas LL e SLL. Isto foi feito, mesmo tendo sido empregadas condições de processo análogas nos experimentos de tempo de equilíbrio e de curvas de distribuição, simplesmente como segurança visando garantir o alcance do equilíbrio.

É relevante observar ainda que existe uma redução estatisticamente significativa no teor de colesterol da fase oleosa, comparativamente ao óleo de manteiga inicial, na etapa de contato LL a CSQ's de 0,20 e 0,35 g/ml. Assim, o simples contato do óleo de manteiga com a solução de quilaia nas concentrações mais elevadas promove a remoção de colesterol. Por outro lado, na CSQ de 0,05 g/ml, mesmo a adição de terra diatomácea não resulta em redução de colesterol. As observações de que os níveis de remoção de colesterol dependem da CSQ empregada, assim como da possibilidade da extração de colesterol pelo simples contato com soluções de quilaia (sem a adição de terra diatomácea), são concordantes com os estudos preliminares de SUNDFELD *et al.* (1993a, 1993b).

A análise comparativa dos resultados destes ensaios com os obtidos nos ensaios anteriores indica consistência: quando condições de processo similares foram empregadas, os teores de colesterol das fases oleosas obtidas são estatisticamente os mesmos.

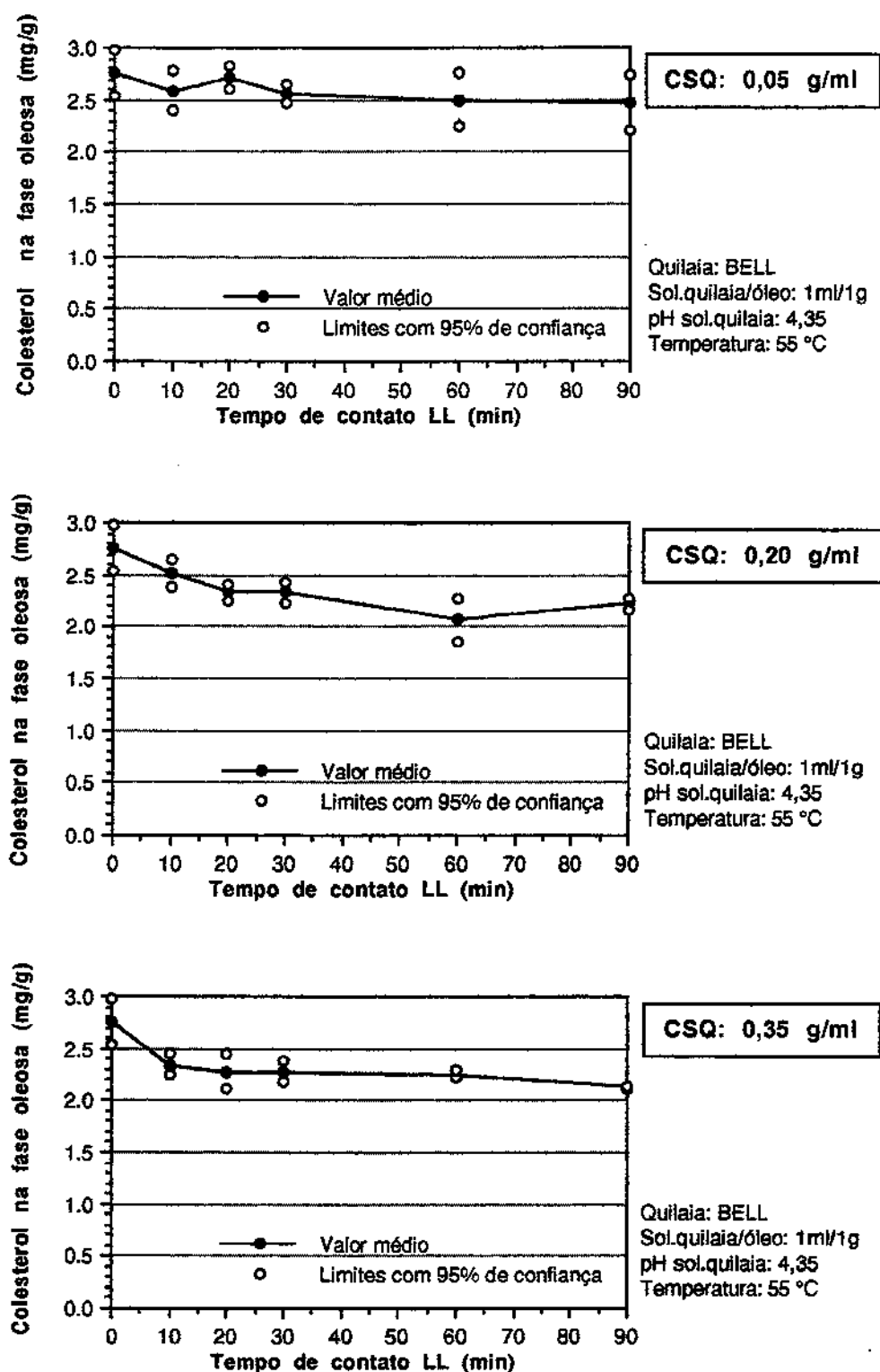


FIGURA IV.7. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa LL, a várias concentrações da solução de quilaia.

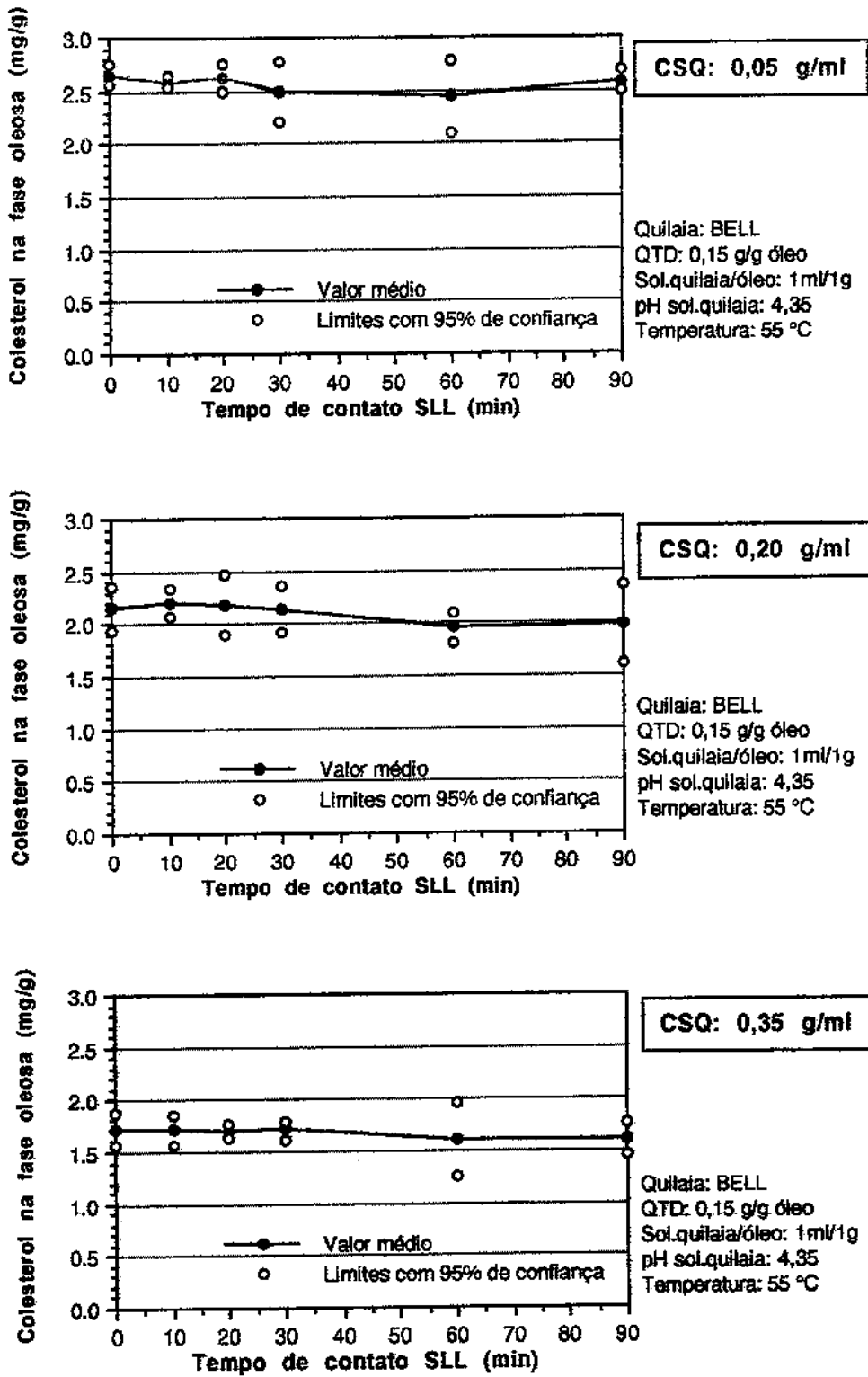


FIGURA IV.8. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

1.3. Distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL

Estes experimentos visaram estabelecer as curvas de distribuição de colesterol entre as fases (oleosa, aquosa e torta de terra diatomácea) em contato, tanto para o processo LL como para o SLL, variando-se a concentração de quilaia na solução aquosa. Os parâmetros temperatura, pH e quantidade de terra diatomácea foram mantidos fixos no valor médio das faixas de interesse (55 °C, 4,15 e 0,15 g/g óleo, respectivamente), definidas no estudo anterior, e utilizado o tempo de contato (com margem de segurança) de 60 minutos para o atingimento da condição "prática" de equilíbrio nas etapas de contato LL e SLL.

A partir das curvas de distribuição foram efetuadas simulações dos processos LL e SLL em múltiplo estágio, estabelecendo-se a evolução dos níveis de colesterol na fase oleosa com o número de estágios de contato, e avaliadas comparativamente estas opções de processo.

• Processo de separação líquido-líquido (LL)

Nestes ensaios foram obtidos dados da partição de colesterol entre as fases oleosa e aquosa resultantes do processo LL, a três concentrações da solução de quilaia, a partir de óleos de manteiga com cinco teores iniciais de colesterol.

Os resultados do teor de equilíbrio de colesterol na fase oleosa estão contidos na Tabela G.1 do Apêndice G e, de maneira geral, indicaram níveis baixos, quando presentes, de remoção de colesterol. Níveis mensuráveis foram sendo obtidos à medida em que se elevaram as concentrações da solução de quilaia (CSQ) e se utilizaram óleos de manteiga que continham inicialmente teores mais elevados de colesterol, como ilustrado na Figura IV.9. Assim, uma redução de até 19,4 % no teor de colesterol foi alcançada na CSQ de 0,35 g/ml, obtendo-se uma fase oleosa com 2,45 mg/g a partir de um óleo de manteiga com teor inicial de 3,04 mg/g.

As concentrações de colesterol na fase aquosa foram estimadas via balanço de massa, considerando a imiscibilidade das fases oleosa e aquosa, como descrito no Apêndice B. Os resultados são apresentados na Tabela G.2 do Apêndice G e indicam que, nas condições empregadas, a distribuição de colesterol no processo LL é pouco favorável à fase aquosa, como pode ser visualizado na Figura IV.10. Verifica-se que a relação entre as concentrações de equilíbrio de colesterol nas fases aquosa e oleosa não é linear. Particularmente, a pequena partição de colesterol na fase

aquosa para teores na fase oleosa abaixo de 0,70 mg/g, sugere dificuldades para redução do teor de colesterol nesta faixa de concentração, nas condições experimentais empregadas, utilizando o processo LL. Por outro lado, foram obtidas concentrações de colesterol na fase aquosa de até 0,60 mg/ml o que, considerada a virtual insolubilidade do colesterol em água, é um valor bastante elevado.

Corroborando constatações anteriores deste trabalho e de SUNDFELD (1992), verifica-se também para o processo LL a tendência de que o aumento da concentração da solução de quilaia promove a remoção de colesterol, ou seja, uma diminuição dos teores de colesterol na fase oleosa e o concomitante aumento daqueles presentes na fase aquosa resultantes do processo.

• Processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL)

Os resultados do teor de equilíbrio de colesterol na fase oleosa estão contidos na Tabela G.3 do Apêndice G e, de maneira geral, indicaram níveis relativamente baixos, quando presentes, de remoção de colesterol. Níveis crescentes foram sendo obtidos à medida em que se elevaram as concentrações da solução de quilaia (CSQ) e se utilizaram óleos de manteiga que continham inicialmente teores mais elevados de colesterol, como ilustrado na Figura IV.11. Assim, uma redução de até 30,5 % no teor de colesterol foi alcançada na CSQ de 0,35 g/ml, obtendo-se uma fase oleosa com 2,11 mg/g a partir de um óleo de manteiga com teor inicial de 3,04 mg/g.

Os resultados do teor de equilíbrio de colesterol na torta, contidos na Tabela G.3 do Apêndice G e ilustrados na Figura IV.12, seguem uma tendência análoga, aumentando com o aumento da concentração da solução de quilaia e com a utilização de óleos de manteiga que continham inicialmente teores mais altos de colesterol.

Os resultados das análises realizadas nas tortas anidras, apresentadas na Tabela G.4 do Apêndice G, indicaram o elevado teor médio global de óleo de 16,2 % (faixa de variação de 11,2 a 20,0 % p/p), recomendando o cálculo dos teores hipotéticos de colesterol no óleo associado às tortas e sua comparação com os das fases oleosas correspondentes. Esta abordagem foi seguida anteriormente e, lembrando, este teor hipotético de colesterol no óleo associado à torta representa a hipótese de que não há associação seletiva na torta e que, portanto, todo o colesterol presente na torta decorre do óleo (contendo colesterol) mecanicamente ocluído nela. Os resultados indicaram uma média global do teor de colesterol no óleo associado à torta de 3,42 mg/g, mais do dobro do encontrado na fase oleosa correspondente cuja média global foi de 1,56 mg/g, corroborando as evidências

anteriores de uma associação seletiva de colesterol na torta. Em termos de faixa de variação, os resultados são ainda mais ilustrativos: os teores de colesterol na fase oleosa e aqueles hipotéticos no óleo associado à torta foram, respectivamente, de 0,74 e 0,89 mg/g no tratamento menos efetivo quanto à remoção de colesterol, e de 2,11 e 6,59 mg/g no mais efetivo. Assim, nas condições em que não se observa remoção significativa de colesterol, os teores hipotéticos de colesterol no óleo associado à torta tendem a ser próximos dos observados nas fases oleosas correspondentes; nestes casos, o teores de colesterol observados nas tortas são devidos ao óleo mecanicamente ocluído. Por outro lado, movendo-se na direção de condições que favorecem a remoção de colesterol, os teores hipotéticos de colesterol no óleo associado à torta tendem a ser cada vez maiores que os determinados nas fases oleosas correspondentes.

As concentrações de colesterol na fase aquosa foram estimadas via balanço de massa, de maneira análoga à utilizada anteriormente e descrita no Apêndice A. Os resultados são apresentados na Tabela G.5 do Apêndice G e indicam que a distribuição de colesterol no processo SLL é análoga à obtida no processo LL. O nível de partição de colesterol em direção à fase aquosa aumenta com o aumento da concentração de quilaia em solução e com o aumento do teor de colesterol na fase oleosa, como pode ser visualizado na Figura IV.14. Novamente, a pequena partição de colesterol na fase aquosa para teores na fase oleosa abaixo de 0,70 mg/g, sugere dificuldades para redução do teor de colesterol nesta faixa de concentração, nas condições experimentais empregadas, utilizando o processo SLL.

Este fato, que fica claro quando se confrontam os teores de colesterol no óleo de manteiga inicial e nas fases oleosas correspondentes obtidas do processo SLL (vide Figura IV.11), também fica evidente no exame da curva relativa à torta, como apresentado na Figura IV.12. Note-se que, como indicado anteriormente, mesmo nos casos em que não se observa remoção significativa de colesterol do óleo de manteiga, a torta apresenta um certo teor de colesterol, devido à oclusão mecânica do óleo. As estimativas do teor de colesterol seletivamente associado à torta apresentadas na Tabela G.5 do Apêndice G, que desconta a contribuição do óleo ao total de colesterol presente nas tortas, também indicam uma pequena partição de colesterol na torta para teores na fase oleosa abaixo de 0,70 mg/g, como ilustrado na Figura IV.13. Entretanto, descontada esta contribuição do óleo incluído na torta, a curva se mostra ainda menos íngreme. Assim sendo, nesta região de baixas concentrações de equilíbrio de colesterol na fase oleosa, ocorre uma partição seletiva pequena de colesterol em direção à torta, sugerindo dificuldades para remoção adicional de colesterol.

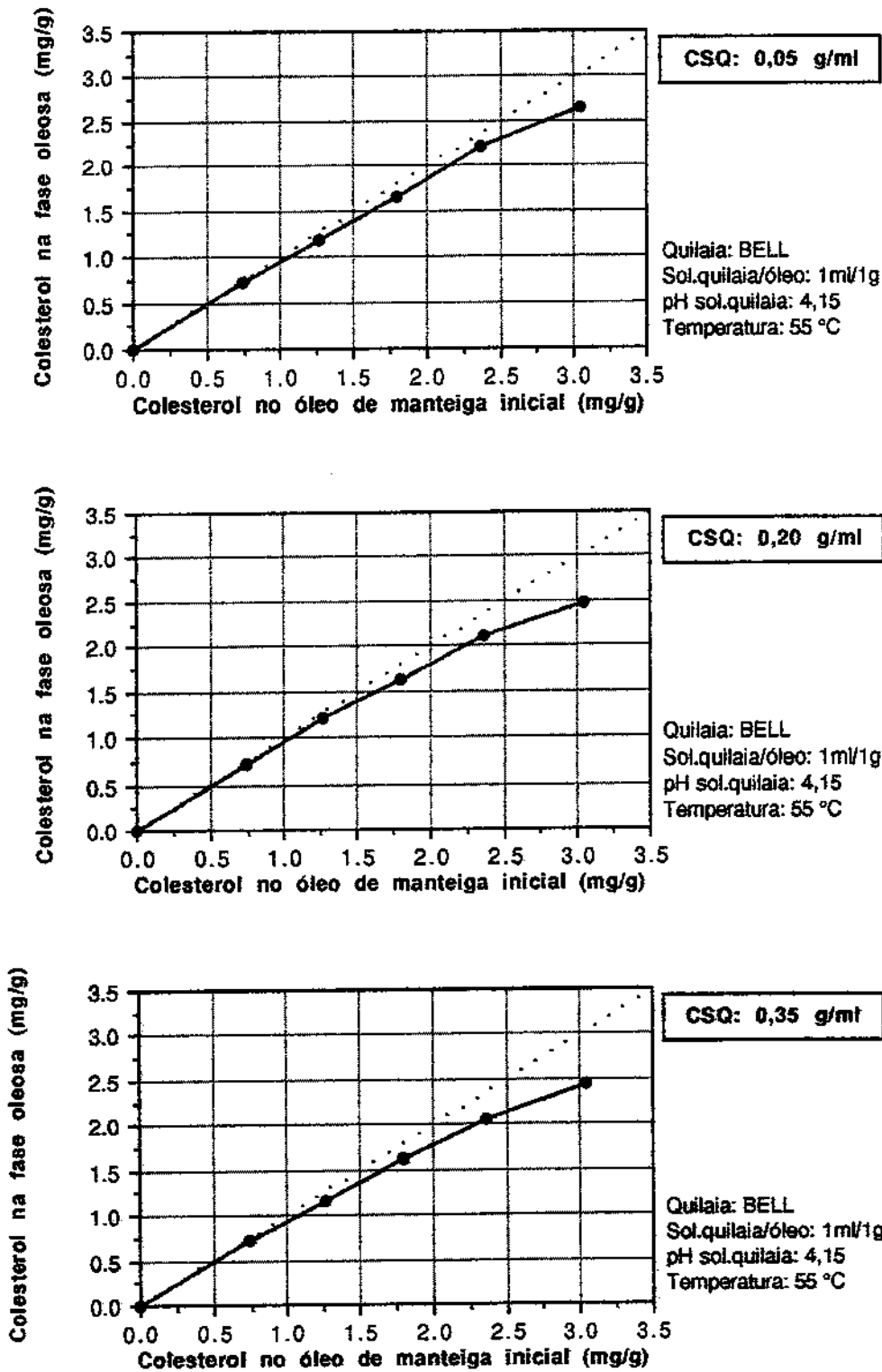


FIGURA IV.9. Teor de colesterol nos óleos de manteiga e nas fases oleosas resultantes do processo de separação LL, a várias concentrações da solução de quilaia.

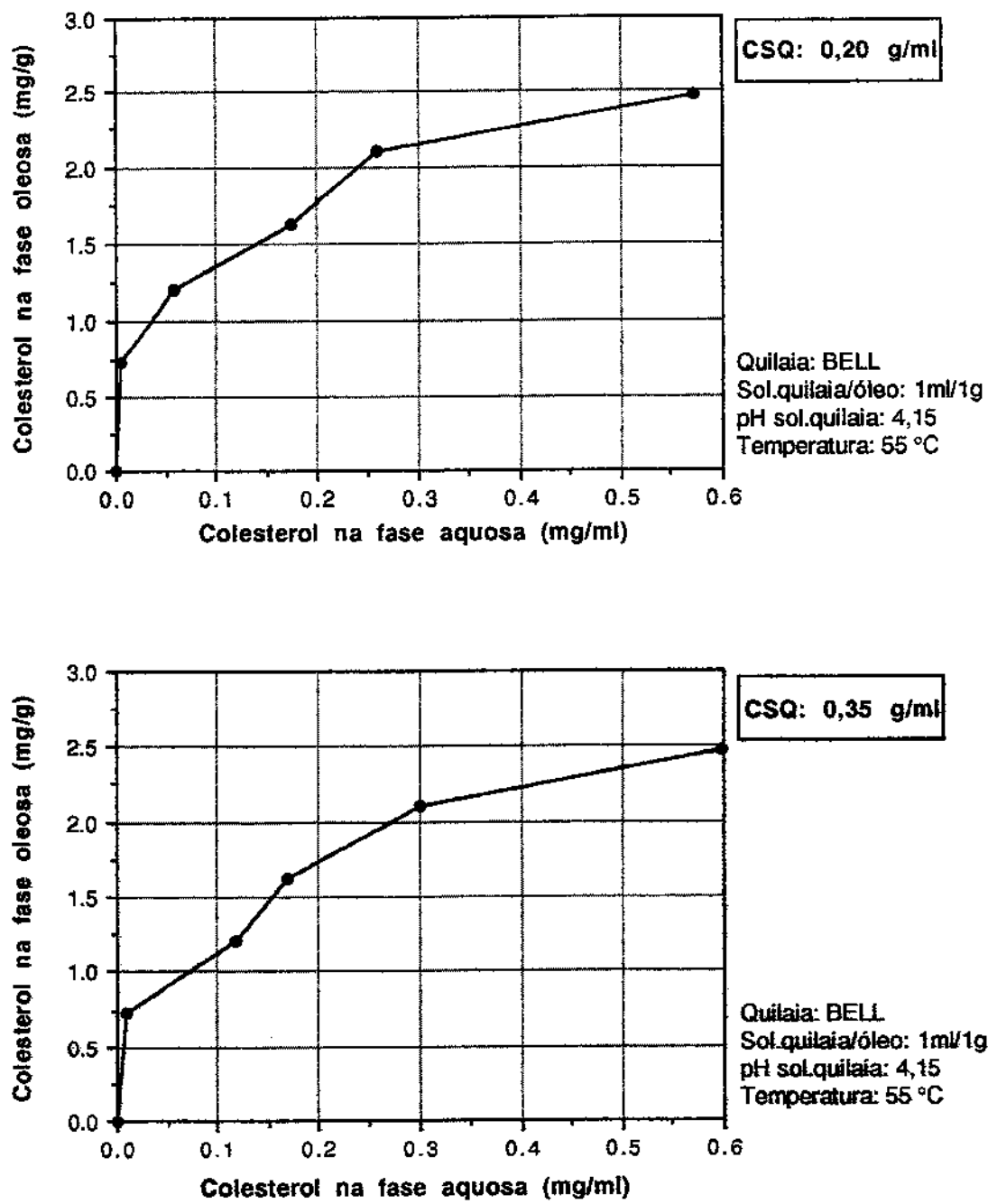


FIGURA IV.10. Distribuição de colesterol nas fases oleosas e aquosas resultantes do processo de separação LL, a várias concentrações da solução de quilaia.

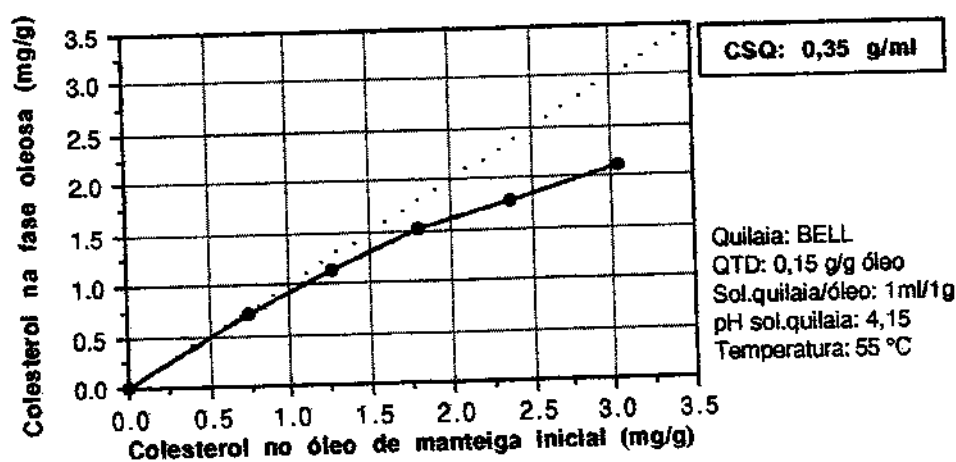
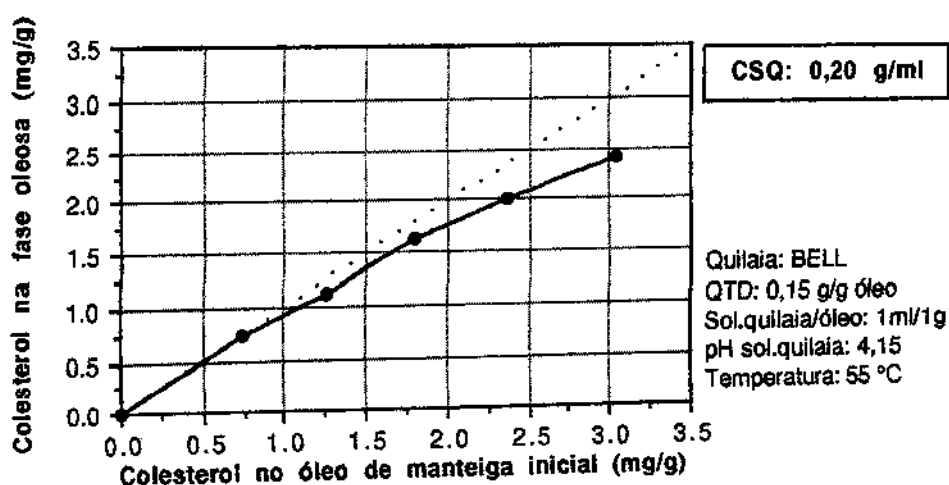
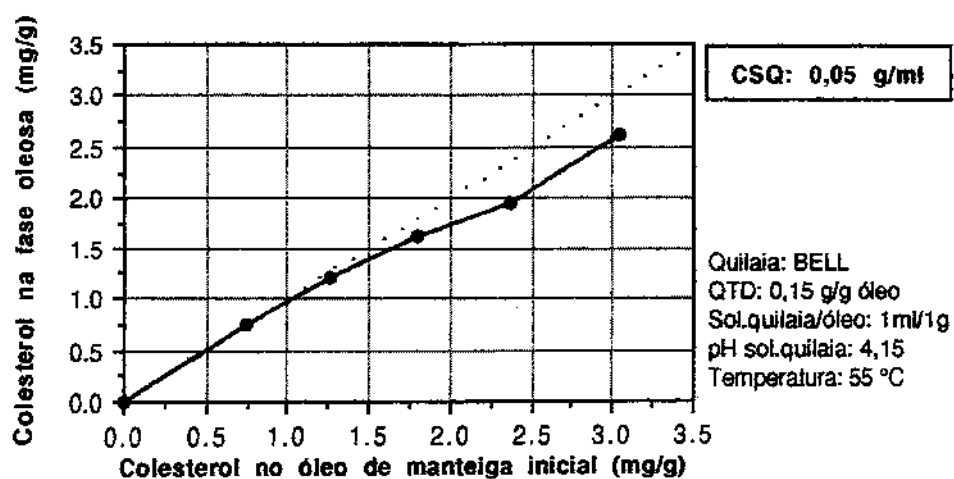


FIGURA IV.11. Teor de colesterol nos óleos de manteiga e nas fases oleosas resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

IV. Resultados e Discussão

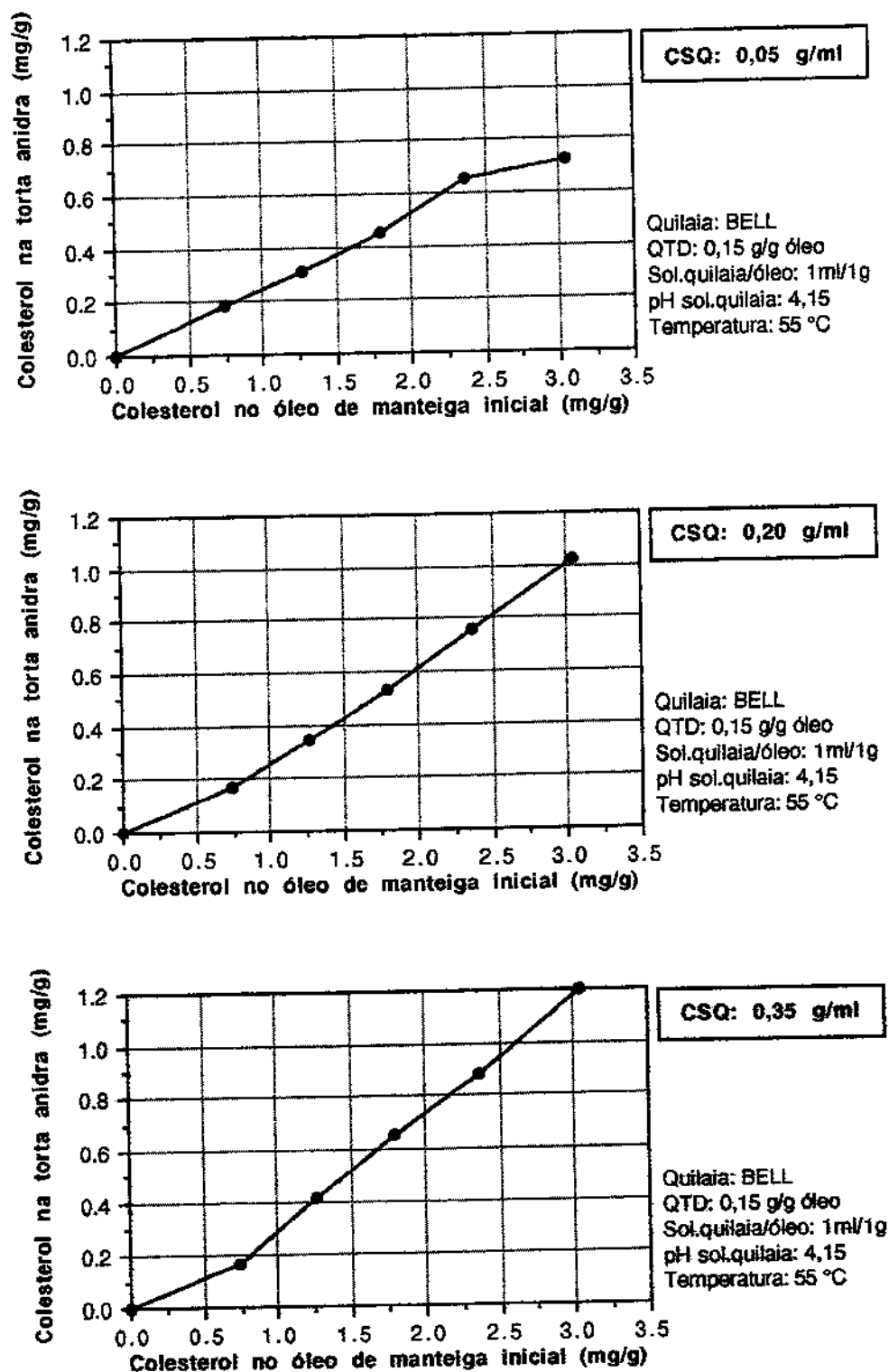


FIGURA IV.12. Teor de colesterol nos óleos de manteiga e nas tortas resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

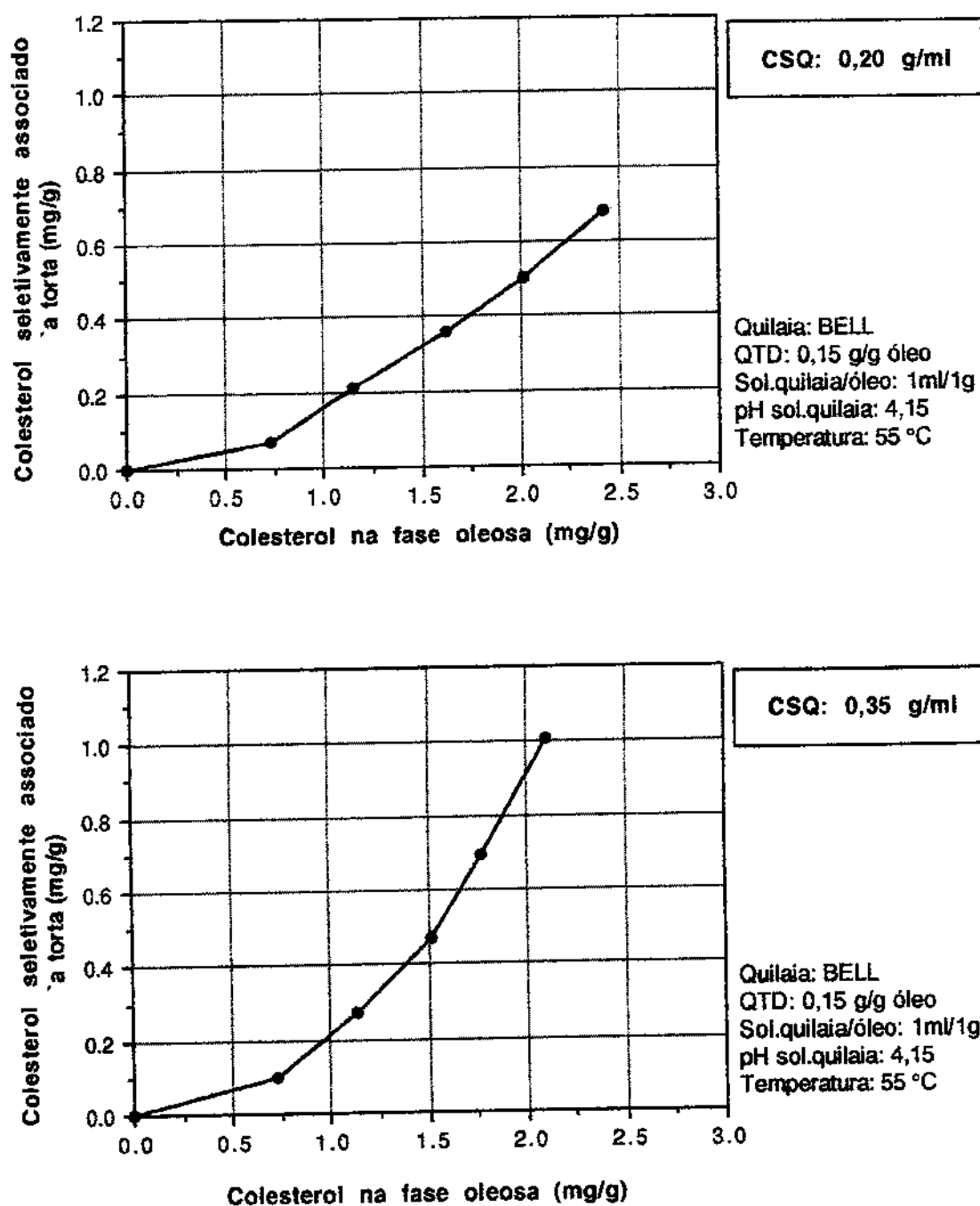


FIGURA IV.13. Distribuição de colesterol na fase oleosa e seletivamente associado a torta resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

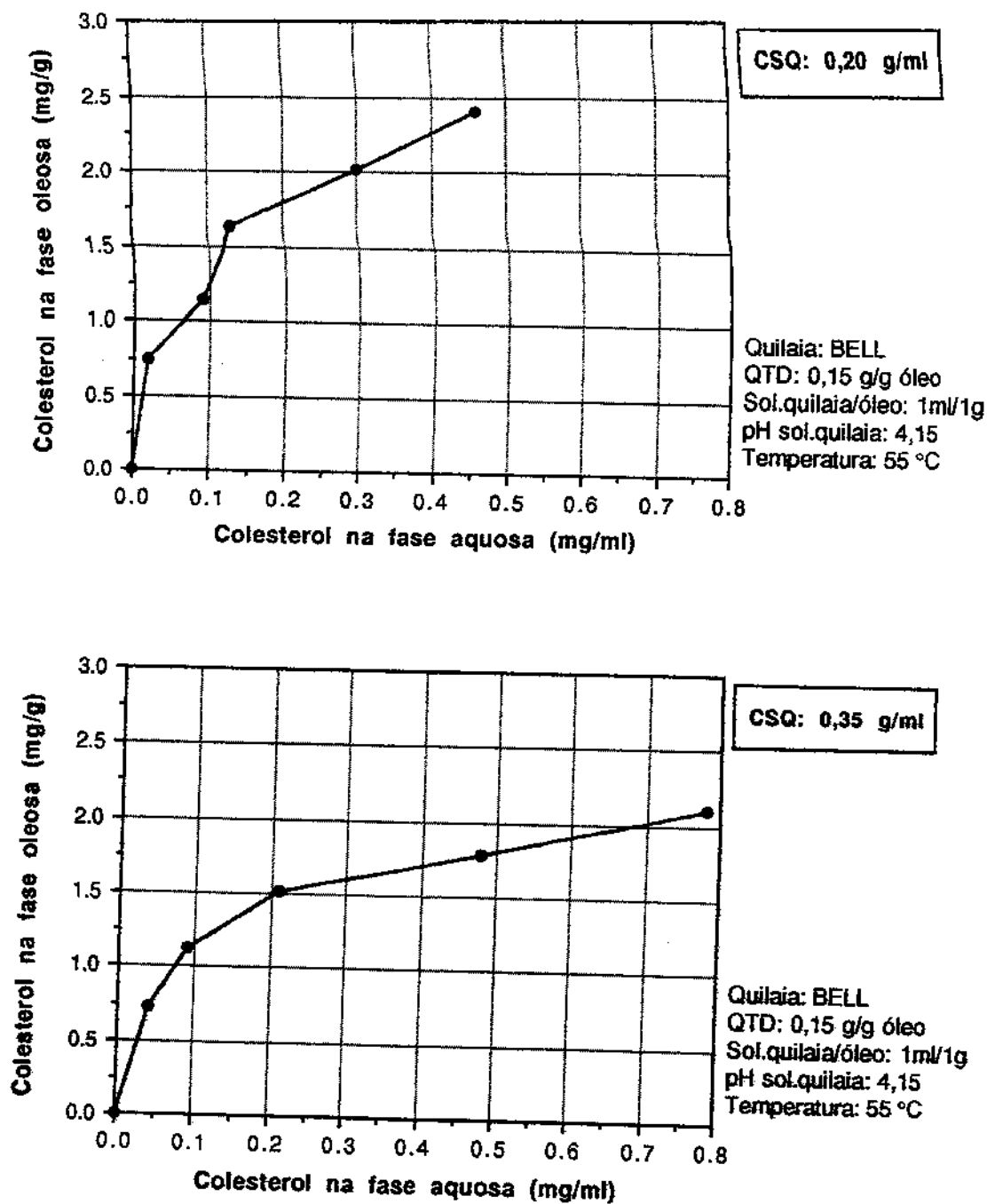


FIGURA IV.14. Distribuição de colesterol nas fases oleosas e aquosas resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

• Simulação dos processos de separação

O sistema resultante do processo SLL é bastante complexo, contendo 3 fases (oleosa, aquosa, e torta) e pelo menos 2 solutos (saponinas de quilaia e colesterol) distribuindo-se entre as fases em contato. Dada a natureza multi-fase e multi-componente do sistema, um processo de múltiplos estágios que pode ser simulado de maneira simples e com confiabilidade nos resultados, a partir das curvas de distribuição no equilíbrio, é o de fluxo cruzado. Nesta configuração, apresentada esquematicamente na Figura IV.15, os estágios são arranjados em série, e cada estágio corresponde a uma batelada do processo SLL em que óleo é contactado com a solução de quilaia e terra diatomácea "puras" (isto é, que não tenham sido contactadas anteriormente com o óleo de manteiga), separando-se ao final a fase oleosa (com teor reduzido de colesterol) a ser alimentada ao próximo estágio. Cada estágio de separação é descrito pela curva de distribuição de equilíbrio obtida experimentalmente, nas condições de processo vigentes.

O sistema resultante do processo LL, mais simples por conter apenas 2 fases (oleosa e aquosa) entre as quais se distribuem os 2 solutos considerados (saponinas de quilaia e colesterol), também pode ser simulado com confiabilidade da maneira indicada anteriormente.

É importante observar que a configuração em fluxo cruzado maximiza os níveis de remoção de colesterol para um determinado número de estágios de separação, às expensas da utilização de maiores quantidades de quilaia e adsorvente.

Considerando a intenção de simular os processos em múltiplo estágio e fluxo cruzado, a Figura IV.16 é uma forma conveniente de representação dos níveis de separação obtidos nos processos LL e SLL, respectivamente, pois relaciona os teores de colesterol nos óleos que entram e saem de estágios de equilíbrio aplicados nestes processos. Nesta Figura, foram ajustados polinômios aos resultados experimentais, obtendo-se as seguintes equações:

$$\begin{aligned} \text{• Processo LL:} \quad Y &= -0,0050313 + 1,0366 X - 0,074272 X^2 & (R^2 = 0,999) \\ \text{• Processo SLL:} \quad Y &= 0,010008 + 1,0362 X - 0,11569 X^2 & (R^2 = 0,999) \end{aligned}$$

onde:

X = teor de colesterol no óleo que entra no estágio de separação, em mg/g, e

Y = teor de colesterol no óleo que sai do estágio de separação, em mg/g.

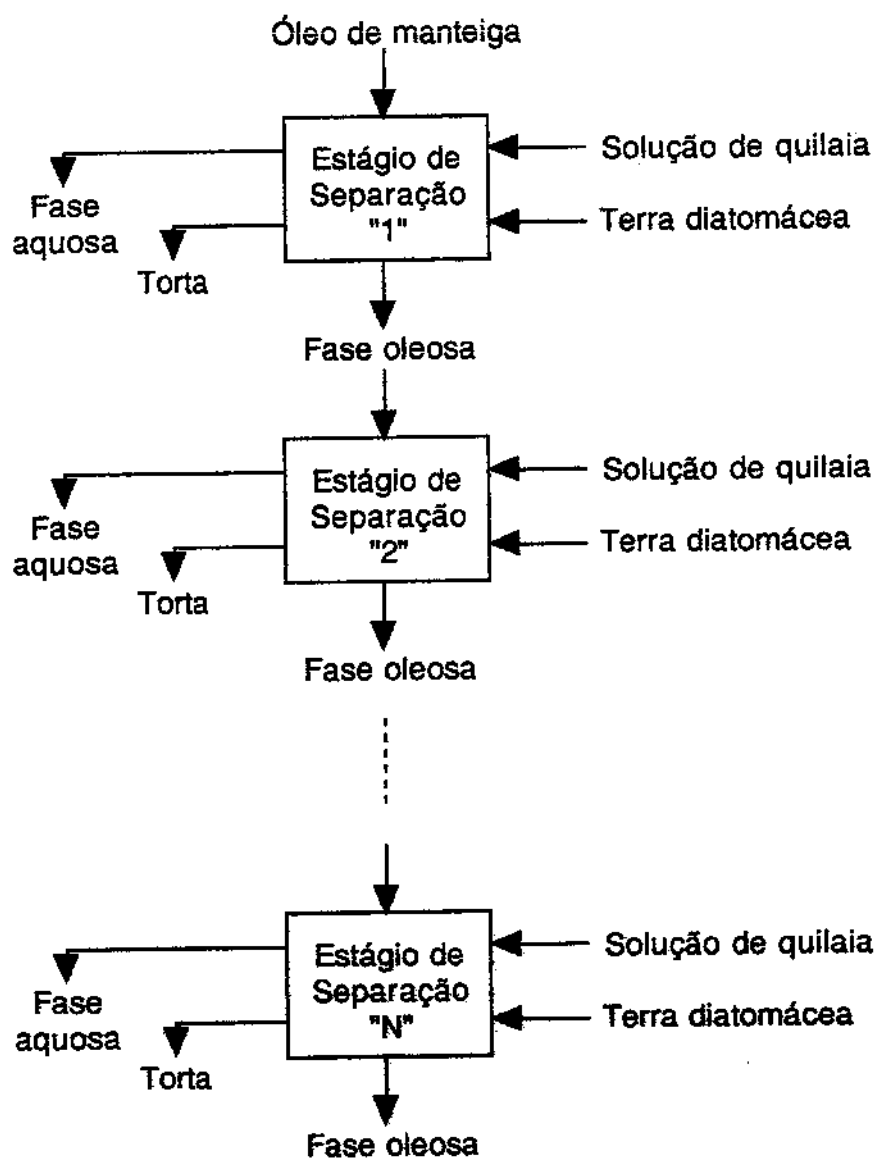


FIGURA IV.15. Diagrama ilustrativo do processo de separação SLL em múltiplos estágios, na configuração de fluxo cruzado.

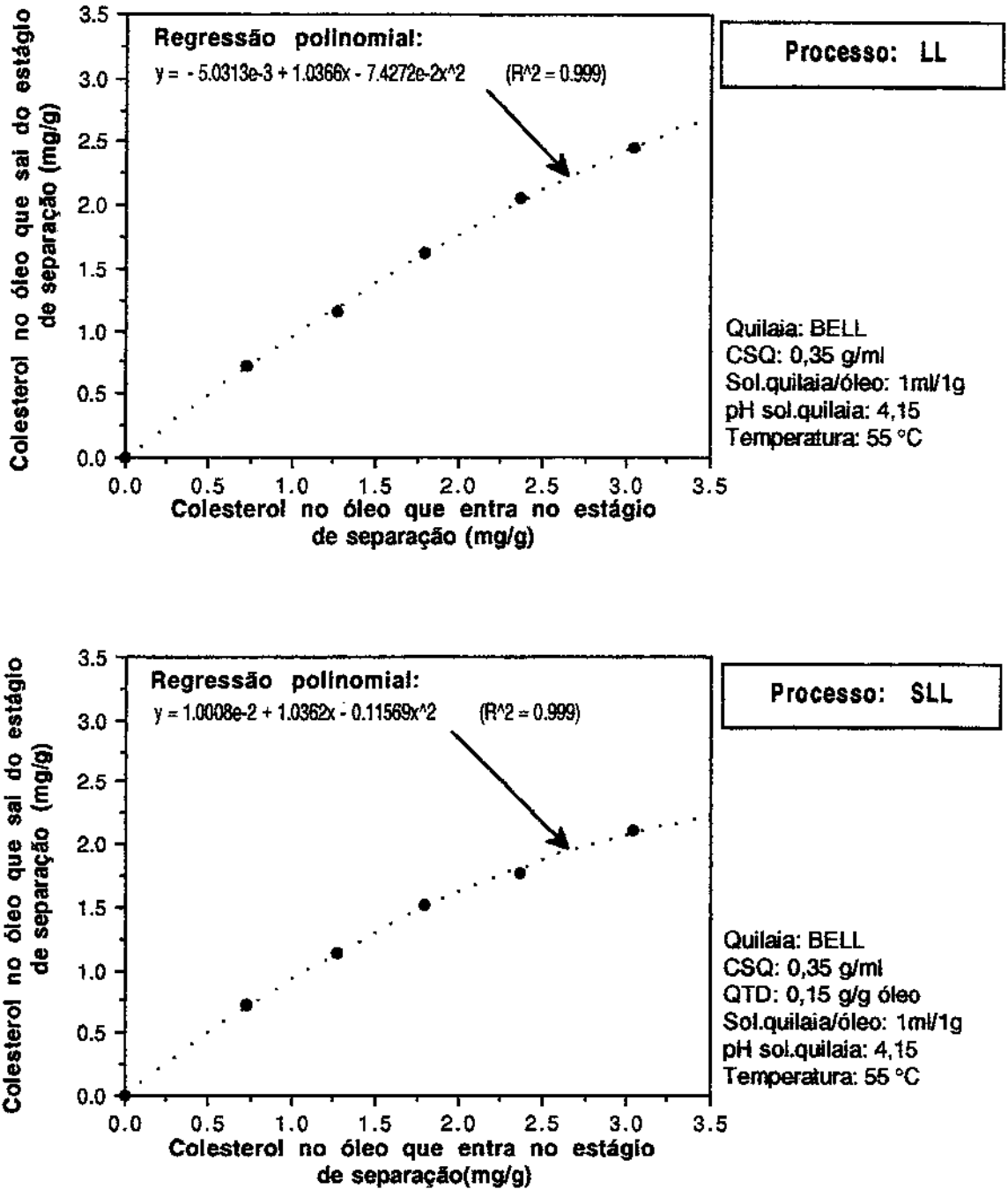


FIGURA IV.16. Teores de colesterol nos óleos que entram e saem de estágios de equilíbrio aplicados nos processos de separação LL e SLL.

IV. Resultados e Discussão

Desta forma, na simulação dos processos SLL e LL em múltiplo estágio, na configuração de fluxo cruzado considerada, cada estágio do processo é descrito pela equação ajustada pertinente, ficando implícito que em cada estágio foram empregadas as condições de processo vigentes na construção da curva de equilíbrio. Assim sendo, o teor de colesterol na fase oleosa resultante de "n" estágios de separação foi calculada, estágio por estágio, numa planilha eletrônica, partindo-se de um óleo de manteiga com teor inicial de colesterol de 2,4 mg/g. Os cálculos e resultados são apresentados nas Tabelas G.6 e G.7 do Apêndice G, respectivamente para os processos LL e SLL.

Os resultados desta simulação são mostrados na Figura IV.17 e permitem pelo menos duas conclusões. Primeiro, o fato de que o processo SLL é claramente mais efetivo que o LL na remoção de colesterol: após 3 estágios de equilíbrio, os níveis de remoção de colesterol previstos foram de 45 e 32%, respectivamente. Segundo, que pela forma da curva de distribuição, ambos os processos removem teores apreciáveis de colesterol quando este está presente em elevadas concentrações no óleo a ser extraído; à medida em que se caminha para a região de baixas concentrações, os níveis de remoção obtidos em cada estágio se reduzem substancial e progressivamente.

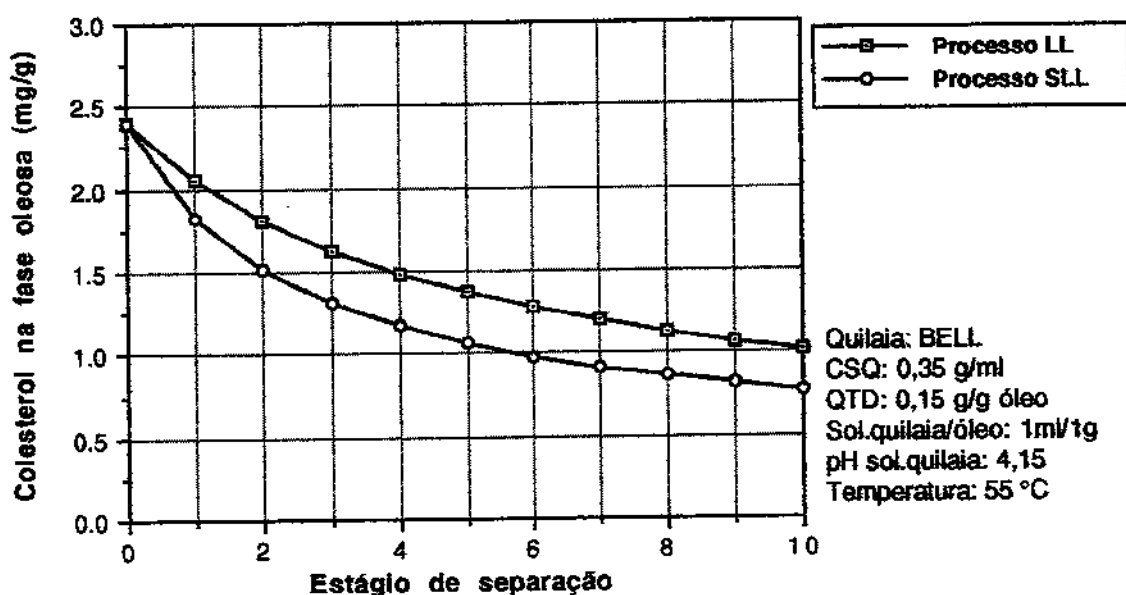


FIGURA IV.17. Simulação do teor de colesterol na fase oleosa em função do número de estágios de equilíbrio aplicados nos processos de separação LL e SLL em fluxo cruzado.

Embora o processo LL seja menos efetivo que o SLL no que se refere ao número de estágios necessários para atingir um mesmo nível de remoção de colesterol, há que se considerar que muitos outros aspectos são relevantes numa análise comparativa. Neste sentido, o processo LL pode apresentar vantagens e uma bastante evidente é a inexistência da etapa de contato SLL, o que simplificaria enormemente o projeto e controle do processo. Assim, não se utiliza terra diatomácea e dispensam-se equipamentos e instalações necessários ao manuseio deste sólido, a etapa de contato SLL, a separação e manuseio da torta, a eventual separação e recuperação da quilaia e adsorvente a partir da torta para reutilização no processo e colesterol para comercialização (ou, alternativamente, a disposição da torta), entre outros aspectos. Também, o rendimento de produto final (óleo com teor reduzido de colesterol) do processo LL tende a ser maior, uma vez que no processo SLL ocorre perda de óleo mecanicamente ocluído na torta.

• Comentários finais

Os resultados obtidos demonstram que ambos os processos SLL e LL propiciam a remoção de colesterol do óleo de manteiga, como indicado por SUNDFELD (1992).

As curvas de distribuição de colesterol entre as fases (oleosa-aquosa e oleosa-sólida) resultantes de ambos os processos apresentam similaridades: não são lineares e sugerem dificuldades para redução do teor de colesterol na fase oleosa abaixo de 0,70 mg/g. Corroborando constatações anteriores, o colesterol se distribui entre todas as fases em contato: oleosa, aquosa e sólida. Aumentando a CSQ, remove-se mais colesterol: diminui o teor de equilíbrio de colesterol na fase oleosa resultante dos dois processos e aumentam os teores tanto na fase aquosa quanto na terra diatomácea. Ocorre acumulação seletiva do colesterol na torta, ou seja, os teores de colesterol determinados na torta são muito maiores que os decorrentes da presença de óleo (contendo colesterol) mecanicamente ocluído nela.

1.4. Efeito da procedência das quilaia nos níveis de remoção de colesterol dos processos de separação LL e SLL

Há uma grande variedade, e potencial variabilidade, da quilaia fornecida pelos vários fornecedores. Portanto, empregando as quilaia em pó BELL e PENCO obtidas comercialmente, estes experimentos visaram verificar se a procedência da quilaia afeta significativamente os níveis de remoção de colesterol obtidos pelos processos LL e SLL.

A hipótese de que diferentes quilaia comerciais poderiam apresentar diferentes eficiências na remoção de colesterol foi sugerida a partir da disparidade dos níveis de remoção de colesterol obtidos no presente trabalho, em que se utiliza a quilaia BELL, comparativamente aos reportados por SUNDFELD *et al.* (1993a, 1993b) que utilizaram a quilaia PENCO em processos análogos.

Os resultados dos ensaios específicos, em que foram empregados os processos de separação LL e SLL para comparação da eficiência das duas quilaia, são apresentados em detalhe na Tabela H.1 do Apêndice H. Tais resultados, sumarizados na Tabela IV.7 e ilustrados na Figura IV.18, evidenciam que elas diferem significativamente na capacidade de promover a separação de colesterol. Observe-se que quando se utiliza o mesmo processo, seja o LL ou o SLL, a quilaia PENCO produz níveis substancialmente maiores de remoção de colesterol (equivalente a teores menores de colesterol nas fases oleosas resultantes dos processos) que a quilaia BELL.

Outra forma de visualizar esta disparidade de eficiências foi obtida a partir dos resultados da distribuição de equilíbrio de colesterol resultante do processo SLL utilizando a quilaia PENCO, contidos na Tabela H.2 do Apêndice H. A Figura IV.19 apresenta os teores de colesterol nos óleos que entram e saem de estágios de equilíbrio aplicados no processo SLL com as quilaia BELL e PENCO, em condições experimentais análogas. Observa-se claramente que, para um determinado óleo inicial, a utilização da quilaia PENCO resulta em fase oleosa com teor de colesterol consistentemente menor que o obtido com a quilaia BELL.

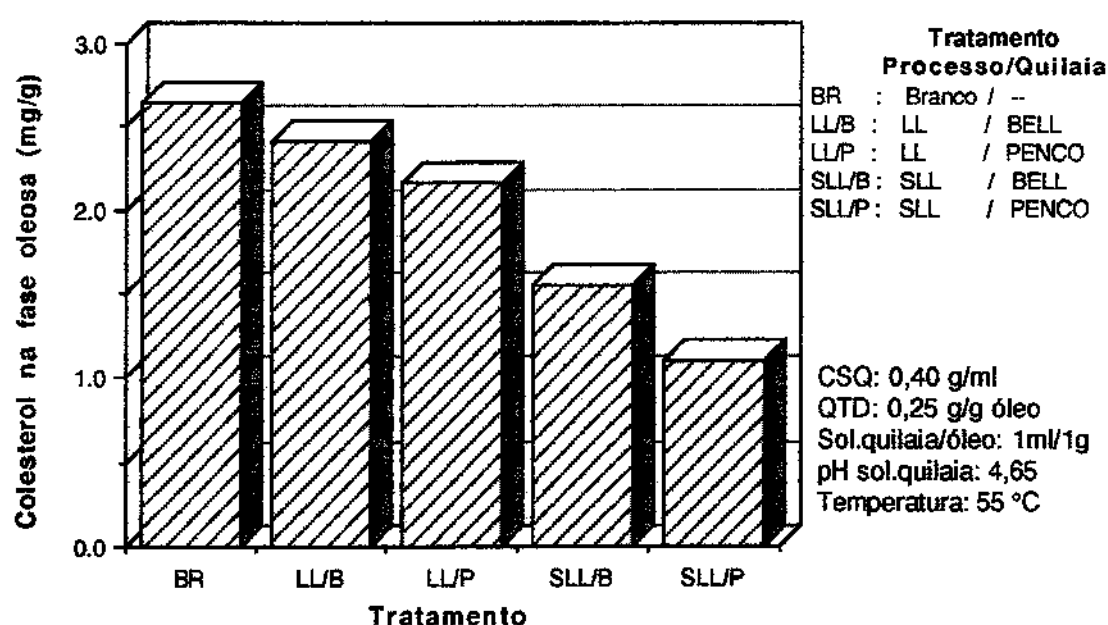


FIGURA IV.18. Efeito da procedência da quilaia no teor de colesterol das fases oleosas resultantes dos processos LL e SLL.

TABELA IV.17. Efeito da procedência da quilaia no teor de colesterol das fases oleosas resultantes dos processos LL e SLL: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| Branco (BR) | 4 | 2,65 ± 0,03 | A |
| Processo LL, quilaia BELL (LL/B) | 4 | 2,42 ± 0,03 | B |
| Processo LL, quilaia PENCO (LL/P) | 4 | 2,17 ± 0,02 | C |
| Processo SLL, quilaia BELL (SLL/B) | 4 | 1,54 ± 0,06 | D |
| Processo SLL, quilaia PENCO (SLL/P) | 4 | 1,10 ± 0,09 | E |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são significativamente distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração das soluções de quilaia: 0,40 g/ml; terra diatomácea: 0,25 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH das soluções de quilaia: 4,65; temperatura: 55 °C.

IV. Resultados e Discussão

Para simulação do processo de separação SLL em múltiplos estágios de fluxo cruzado, procedeu-se de maneira análoga ao relatado anteriormente. Assim, aos resultados da Figura IV.19 foram ajustados polinômios, obtendo-se as seguintes equações:

- quilaia BELL: $Y = -0,010008 + 1,0362 X - 0,11569 X^2$ ($R^2 = 0,999$)
- quilaia PENCO: $Y = 0,039687 + 0,72205 X - 0,11561 X^2$ ($R^2 = 0,982$)

onde:

X = teor de colesterol no óleo que entra no estágio de separação, em mg/g.

Y = teor de colesterol no óleo que sai do estágio de separação, em mg/g.

Os cálculos e resultados detalhados da simulação para a quilaia PENCO são apresentados na Tabela H.3 do Apêndice H. A Figura IV.20 contém os resultados desta simulação para as duas quilaias, que ilustram o efeito significativo da procedência da quilaia: após 3 estágios, os níveis de remoção de colesterol previstos foram de 45 e 80% para as quilaias BELL e PENCO, respectivamente.

Não está claro por que produtos similares, usados nas mesmas aplicações e competidores no mercado, comportam-se tão diferentemente. A razão deve estar em diferenças de composição química, provocadas por distintos processos de obtenção, mas as limitadas especificações fornecidas pelos fabricantes não são suficientes para verificar esta hipótese. Na próxima seção espera-se obter subsídios para elucidação da razão destas diferenças, através da caracterização destas quilaias.

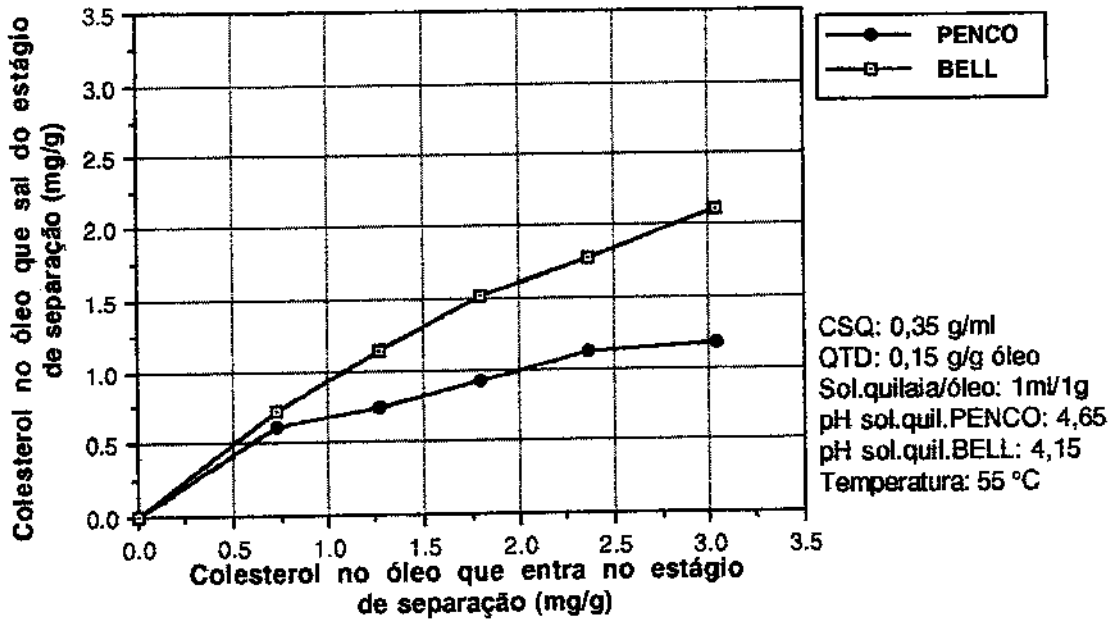


FIGURA IV.19. Teores de colesterol nos óleos que entram e saem de estágios de equilíbrio aplicados no processo de separação SLL, utilizando-se quilaia PENCO e BELL.

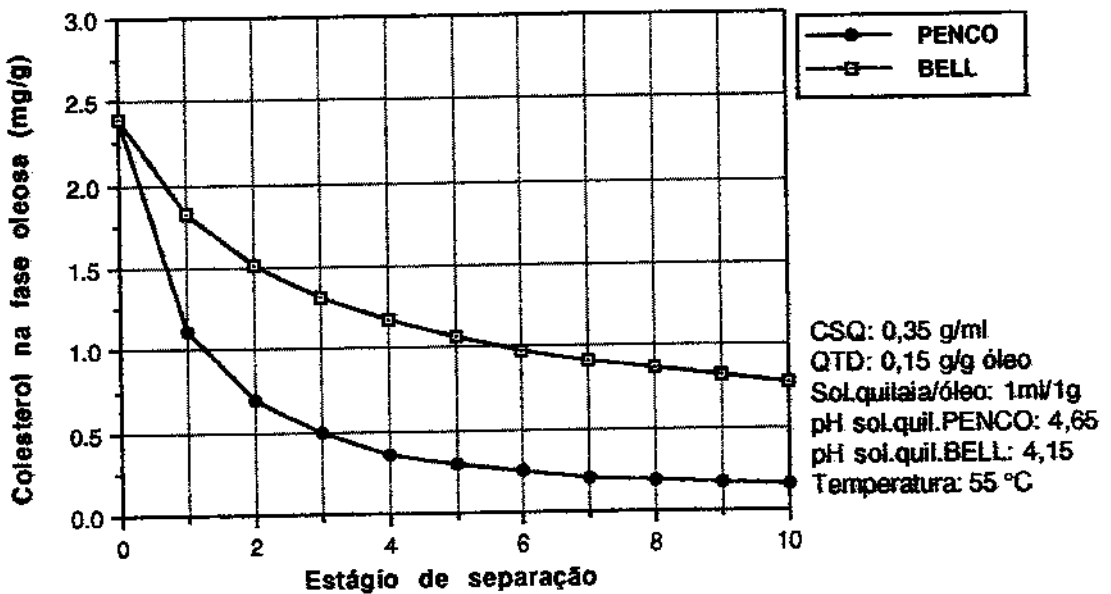


FIGURA IV.20. Simulação do teor de colesterol na fase oleosa em função do número de estágios de equilíbrio aplicados no processo de separação SLL em fluxo cruzado, utilizando-se as quilaia PENCO e BELL.

1.5. Caracterização das quilaia

Estes experimentos visaram caracterizar as quilaia em pó PENCO e BELL, obtidas comercialmente e utilizadas nos estudos anteriores, quanto à sua composição química, concentração de micela crítica, e propriedades eletrocinéticas e tamanho das partículas em solução aquosa. Realizados após verificar o efeito significativo da procedência da quilaia na eficiência dos processos, buscou-se através desta caracterização reunir elementos que, além de propiciar conhecimento de algumas propriedades básicas dos materiais em estudo, pudessem auxiliar na compreensão das diferenças de eficiência observadas na remoção de colesterol. Também foram incluídas algumas informações sobre a quilaia SIGMA, utilizada na fase seguinte deste trabalho, de interesse à presente análise.

• Composição química das quilaia

Os resultados das análises de composição centesimal das quilaia, realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL (Campinas, SP), são apresentados na Tabela IV.8, e os da determinação do teor de sapogeninas na Tabela IV.9.

TABELA IV.8. Composição centesimal ^a das quilaia em pó.

| Determinação | Quilaia | | |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| | BELL | PENCO | SIGMA |
| Umidade | 8,95 | 7,66 | 6,91 |
| Cinzas | 6,18 | 9,85 | 11,22 |
| Proteína(Nx6,25) ^b | 2,14 | 1,90 | 1,40 |
| Açúcar redutor ^c | 12,13 | 13,43 | 19,67 |
| Açúcar total ^c | 18,09 | 26,93 | 23,40 |
| Fibra ^d | 0,06 | 0,40 | 0,70 |
| Tanino ^e | 4,49 | 10,16 | 6,23 |

^a todos os valores são porcentagens m/m e as análises foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas-SP; ^b pelo método da AACC; ^c pelo método de Munson & Walker; ^d pelo método de Scharrer & Kurschner; ^e pelo método de Folin-Denis.

TABELA IV.9. Teor de saponinas^a das quilaia em pó.

| Quilaia | N ^b | Média | Desvio padrão | Limites do intervalo com 95% de confiança | |
|---------|----------------|-------|---------------|---|-------|
| PENCO | 6 | 13,97 | 0,53 | 13,41 | 14,53 |
| BELL | 6 | 5,04 | 0,73 | 4,28 | 5,81 |
| SIGMA | 6 | 12,87 | 1,17 | 11,65 | 14,10 |

^a valores são porcentagens m/m, determinados pelo método detalhado na seção de métodos de análise;

^b número de observações.

Estes dados demonstram a existência de importantes diferenças de composição entre as quilaia PENCO e BELL, e indicam que estes extratos comerciais são misturas das saponinas com uma série de outros componentes, oriundos das cascas ou eventualmente adicionados durante o processamento. Particularmente notórias são as diferenças observadas nos teores de açúcares totais, taninos e fibras. Outra diferença substantiva entre estas quilaia é o teor de saponinas (e, portanto, de saponinas): o da quilaia PENCO é aproximadamente 3 vezes o da BELL.

• Concentração de micela crítica das quilaia

Nesta segunda série de experimentos, foi determinada a concentração de micela crítica (CMC) das quilaia BELL e PENCO, a pH 4,6 e 25 °C. Essa determinação foi feita graficamente, através de medidas da tensão superficial, condutividade e turbidez das soluções aquosas, independentemente, como detalhado nas Figuras I.1 a I.6 do Apêndice I. Os valores para a CMC das quilaia assim obtidos são sumarizados na Tabela IV.10 e, na Figura IV.21, ilustra-se sua obtenção para a quilaia BELL. O valor da CMC da quilaia SIGMA constante na Tabela IV.10 foi extraído da seção seguinte, para fins de comparação.

TABELA IV.10. Concentração de micela crítica (em g/ml x 10³) das quilaia a 25 °C e pH 4,6, determinada graficamente através de várias propriedades das soluções.

| Quilaia | Propriedade da solução utilizada | | |
|---------|----------------------------------|---------------|----------|
| | Tensão superficial | Condutividade | Turbidez |
| PENCO | 1,4 | 1,7 | 1,5 |
| BELL | 1,2 | 1,8 | 1,2 |
| SIGMA | 0,7 | n.d. | n.d. |

n.d.: não determinada.

Primeiramente, podemos verificar que os valores da CMC obtidos para cada uma das quilaia (PENCO e BELL) utilizando as três diferentes propriedades das soluções estão em boa concordância. Ressalte-se que, no método gráfico empregado, a escolha do número de pontos experimentais alinhados antes e depois da região da descontinuidade para efeito do ajuste das retas pode implicar em alguma variação no valor da CMC. A concordância dos três métodos para determinação da CMC fornece uma evidência de que micelas de saponinas de quilaia se formam em solução acima de uma concentração crítica bem definida. De fato, a clara quebra nos valores da curva de tensão superficial suporta a idéia de que micelas se formam e, porque a CMC sinaliza a formação de micelas, concentrações de surfatante acima da CMC não têm impacto adicional na diminuição da tensão superficial.

Em segundo lugar, parece seguro afirmar que as quilaia PENCO e BELL tem ambas valores parecidos de CMC, na faixa de $1,0$ a $2,0 \times 10^{-3}$ g/ml, a pH 4,6 e 25°C . Considerando que a quilaia PENCO tem um teor de sapogeninas (e portanto de saponinas) de quase 3 vezes o da BELL, seria de se esperar baseado apenas neste aspecto que a CMC da primeira, medido em g quilaia/ml solução, fôsse a terça parte do da segunda. Também, baseado neste critério, as CMC's das quilaia PENCO e SIGMA deveriam ser iguais ou, pelo menos, mais próximas. Portanto, estes resultados indicam que a formação de micelas depende também de algum outro fator importante, além da concentração de sapogeninas.

MITRA & DUNGAN (1997) demonstraram a formação de micelas em soluções aquosas de extratos comerciais de quilaia e a existência de diferenças pequenas, porém significativas, nos valores da CMC de extratos de três fontes comerciais distintas. Os autores não analisaram a composição química destes produtos e atribuíram as variações observadas na habilidade de diferentes fontes de saponinas de quilaia de formar micelas às seguintes possibilidades: 1) diferenças nas estruturas moleculares contidas nas fontes (mudança dos grupos hidrofílicos, alterando a hidrofobicidade das moléculas e, portanto, sua tendência a formar micelas); 2) presença de impurezas, não necessariamente com atividade de superfície, tais como sais; e 3) presença de impurezas com atividade de superfície.

No caso presente, além do teor de sapogeninas, a composição química das quilaia apresentada na Tabela IV.8 indica diferenças substanciais nos teores de sais e taninos. A adição de sais sabidamente altera a CMC de surfatantes iônicos e a presença de taninos, que são compostos anfífilos, pode também influenciar a

formação de micelas. A ocorrência de diferentes proporções de espécies químicas de saponinas e a adição intencional de outros tensoativos, possibilidades não verificadas no presente trabalho, teria também impacto na CMC.

Assim sendo, a compreensão dos resultados resultados obtidos, em que se indica uma virtual igualdade de CMC's para produtos de quilaia com teores distintos de sapogeninas, terá que necessariamente considerar em maior profundidade, além do óbvio questionamento do nível de precisão da metodologia utilizada na determinação da CMC, a composição química dos extratos e sua influência nos valores da CMC. Existe concretamente a possibilidade de que esses produtos comerciais, utilizados como agentes espumantes, apresentem em sua complexa composição química, em quantidade relativa variada, tanto frações distintas de saponinas (como relatada por vários autores, por exemplo: DEV *et al.*, 1989; KENSIL *et al.*, 1991; ROUHI, 1995; PILLION *et al.*, 1996) quanto outros componentes que interferem no processo de formação de micelas. Essas diferenças de composição química poderiam ser provocadas intencionalmente (por exemplo pela adição de outros tensoativos, sais, co-surfatantes, etc) ou ser resultado de diferenças nos processos de extração das cascas de *Quillaja saponaria* e/ou de purificação dos extratos. O estudo destes aspectos, embora relevante, está fora do escopo deste trabalho.

Os resultados obtidos indicam que outros fatores além da concentração de sapogeninas estão influenciando de forma importante na formação de micelas, e sugerem que há diferenças substanciais entre os sistemas de tensoativos presentes nas quilaías PENCO e BELL.

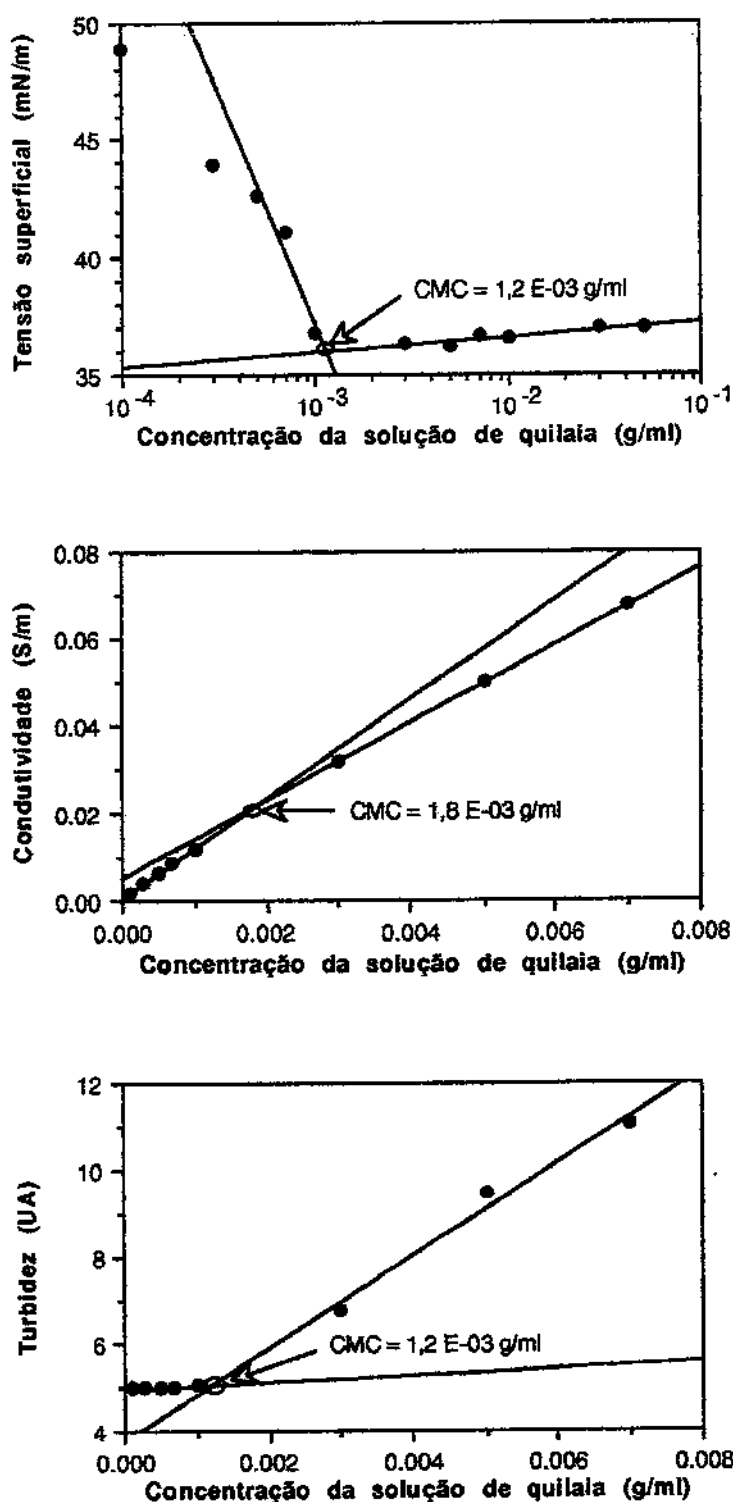


FIGURA IV.21. Determinação gráfica da CMC da quilaia BELL a 25 °C e pH 4,6, através de várias propriedades das soluções aquosas.

• Mobilidade eletroforética e tamanho das partículas em soluções aquosas de quilaia

Nesta terceira série de experimentos foi verificada a existência de diferenças de mobilidade eletroforética (MEF) e diâmetro de Stokes (D_{St}) das partículas presentes nas soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL, nas concentrações de 0,05 g/ml e 25 °C, e pesquisadas evidências de polidispersidade.

Como as soluções das duas quilaia apresentavam algum material insolúvel em suspensão, foram feitos inicialmente alguns testes visando o desenvolvimento e a padronização do preparo das soluções, verificando se a filtração poderia ser empregada com sucesso na eliminação destes insolúveis e, caso empregada, se provocaria alguma variação nas propriedades eletrocinéticas medidas das soluções, especificamente na MEF e D_{St} das partículas.

Os resultados destes experimentos, apresentados em detalhe nas Tabelas J.1 e J.2 do Apêndice J, respectivamente, indicaram que não há um efeito significativo ($P > 0,05$) da filtração nos resultados de MEF e D_{St} obtidos para cada uma das quilaia. Por outro lado, diferenças significativas parecem existir entre as duas quilaia ($P < 0,05$) quanto à MEF e D_{St} das partículas presentes. Uma vez que a etapa de filtração das soluções se mostrou laboriosa e não introduz diferenças significativas nos resultados, ela foi dispensada nos testes cujos resultados são apresentados a seguir.

É relevante indicar que as soluções das duas quilaia, medidas nas mesmas condições de concentração e temperatura para os ensaios preliminares, apresentaram diferenças de pH como demonstrado na Tabela IV.11. Como o pH influencia as propriedades eletrocinéticas das partículas, para uma comparação inteligível foi necessário ajustar o pH das soluções ao mesmo valor de 4,6.

TABELA IV.11. Valores de pH das soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL à concentração de 0,05 g/ml e temperatura de 25 °C.

| Quilaia | pH |
|---------|------|
| PENCO | 4,65 |
| BELL | 4,24 |

As medidas da MEF e D_{St} das partículas e da condutividades das soluções (não filtradas, concentração de 0,05 g/ml, pH de 4,6 e 25 °C) das duas quilaia, feitas no

equipamento PENKEM 3000, foram submetidas a análise de variância, cujos resultados são apresentados em detalhe nas Tabelas L.1 a L.3 do Apêndice L. Verifica-se que as soluções de quilaia PENCO e BELL apresentam partículas com MEF e D_{st} significativamente distintas, diferindo também significativamente na condutividade ($P < 0,05$). A Tabela IV.12 apresenta os valores destas propriedades medidos para as duas quilaia.

TABELA IV.12. Valores ^a da mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes das partículas e condutividade das soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL a pH 4,6 e temperatura de 25 °C.

| Propriedade | N ^b | Quilaia | |
|--|----------------|-------------------|-------------------|
| | | PENCO | BELL |
| Mobilidade eletroforética ($\times 10^9 \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$) | 5 | $- 6,09 \pm 0,42$ | $- 4,62 \pm 0,14$ |
| Diâmetro de Stokes (μm) | 5 | $0,57 \pm 0,32$ | $1,12 \pm 0,20$ |
| Condutividade (S/m) | 5 | $0,501 \pm 0,002$ | $0,467 \pm 0,003$ |

^a média \pm desvio padrão; ^b número de observações. Outros parâmetros experimentais: soluções de quilaia não filtradas e a concentração de 0,05 g/ml.

Histogramas típicos da MEF obtidos no PENKEM 3000 para as quilaia PENCO e BELL são apresentados nas Figuras IV.22 e IV.23, respectivamente. Na Figura IV.22 há indicações de polidispersidade para a população de partículas da quilaia PENCO, ou seja, múltiplos picos indicativos de várias sub-populações de partículas com mobilidades próximas mas distintas. Por outro lado, a quilaia BELL (Figura IV.23) se mostra monodispersa, ou seja, com uma população homogênea de partículas, resultando num único pico.

Entretanto, tais observações precisam ser encaradas com cautela pois a escala da abcissa dos gráficos de mobilidade (faixa de $-2,0$ a $+ 2,0 \times 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$) não é favorável à resolução de múltiplos picos. Portanto, para resolução das várias sub-populações de partículas eventualmente presentes, foram realizadas novas medidas da MEF com resolução aumentada. Uma breve explicação de como estes ensaios foram realizados é dada no Apêndice M, onde também se apresentam dados na Tabela M.1 que indicam que a mudança de faixa de resolução não altera o valor obtido para a MEF.

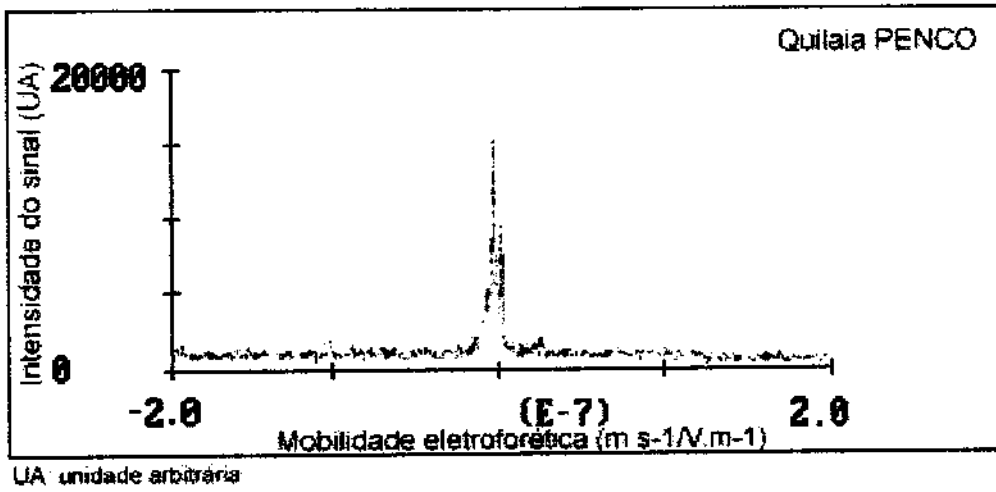


FIGURA IV.22. Histograma típico da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia PENCO.

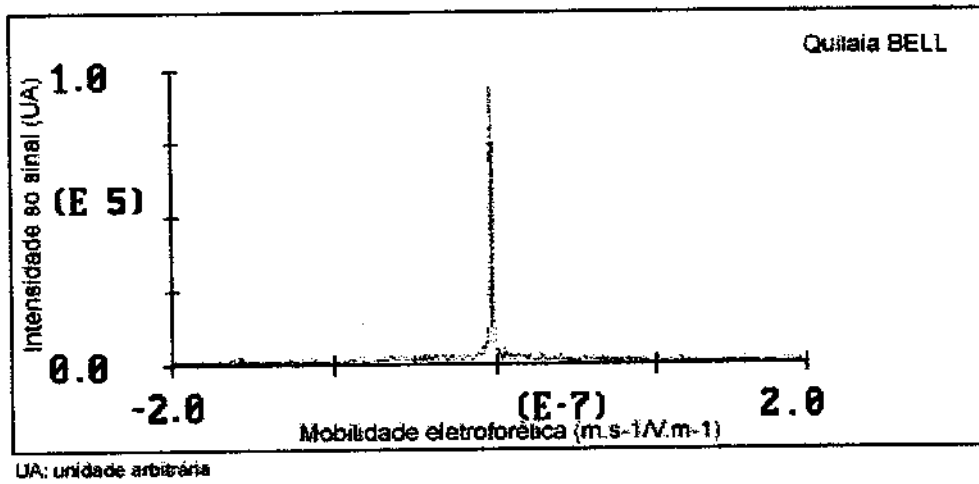


FIGURA IV.23. Histograma típico da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia BELL.

Com relação à polidispersidade das amostras, é evidente da Figura IV.24 que a quilaia PENCO apresenta várias sub-populações de partículas, com MEF na faixa de $-2,5$ a $-9,0 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$. Por outro lado, a Figura IV.25 indica que a quilaia BELL pode ser considerada monodispersa, na resolução empregada, com partículas de MEF na faixa de $-4,5$ a $-4,7 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$. Portanto, a quilaia BELL tem partículas com MEF na faixa de sub-populações da quilaia PENCO, esta última apresentando também outras sub-populações adicionais.

É importante ressaltar que nada se disse até o momento sobre a natureza das partículas cujos MEF e D_{st} foram medidos, e que as informações já obtidas são úteis para caracterizar diferenças entre as duas quilaias.

• Natureza das partículas medidas nas soluções aquosas de quilaia

Nesta quarta série de experimentos foi verificada a natureza das partículas cujas propriedades estavam sendo medidas. Os dados obtidos até o momento indicaram valores para D_{st} na faixa de $0,5$ a $1,2 \mu\text{m}$, muito maiores que os valores encontrados na literatura, ao redor de 6 a 7 nm (OAKENFULL, 1986; MITRA & DUNGAN, 1997), para micelas de saponinas de quilaia. Portanto, procurou-se confirmar que as partículas medidas nos experimentos anteriores não eram micelas, mas partículas outras oriundas destes extratos comerciais. Para tanto, duas abordagens foram seguidas.

Primeiramente, foram obtidos histogramas da MEF numa série de soluções com concentrações abaixo e acima da CMC, estratégia que se baseou no fato de que micelas se formam em solução ao redor da CMC e, portanto, não estão presentes abaixo da CMC. A idéia foi, portanto, verificar se partículas estavam presentes em solução abaixo da CMC, acompanhando a evolução de suas propriedades com a concentração da solução abaixo e acima da CMC. Para tanto, foram utilizados os valores das CMC's das quilaias PENCO e BELL determinados anteriormente.

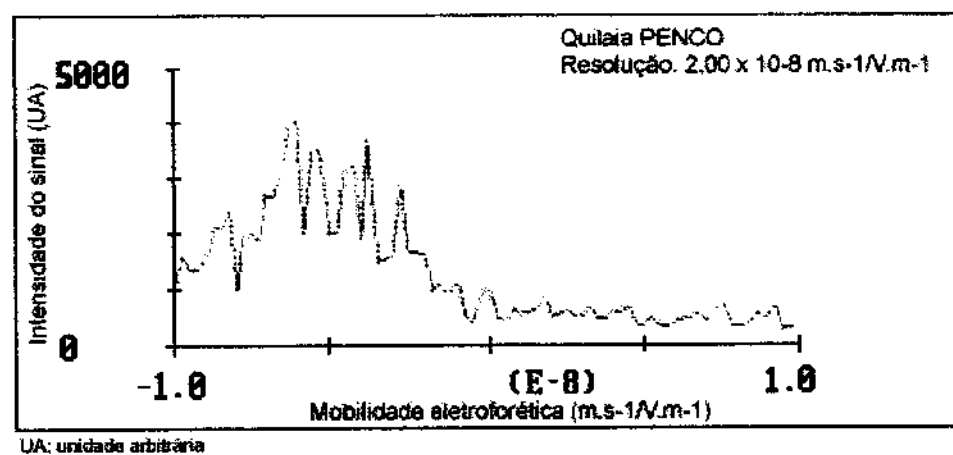
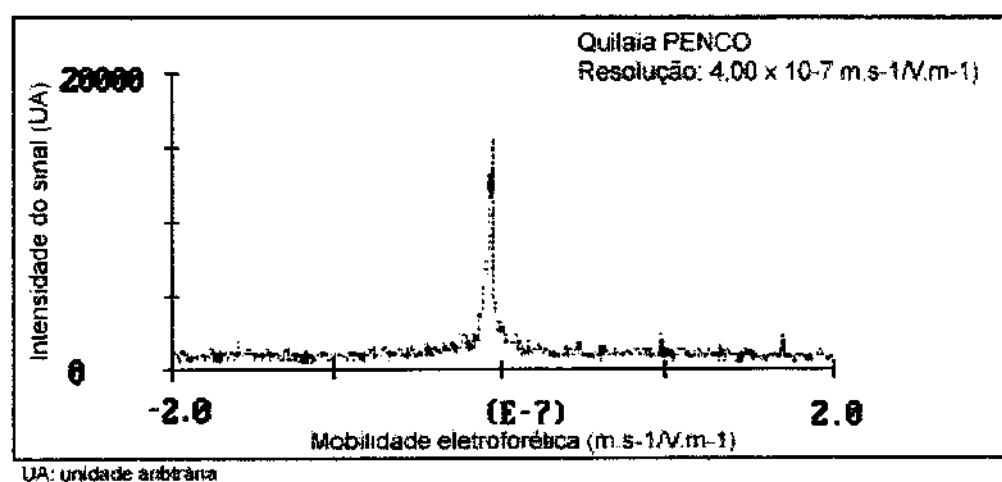


FIGURA IV.24. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia PENCO obtidos com dois níveis de resolução.

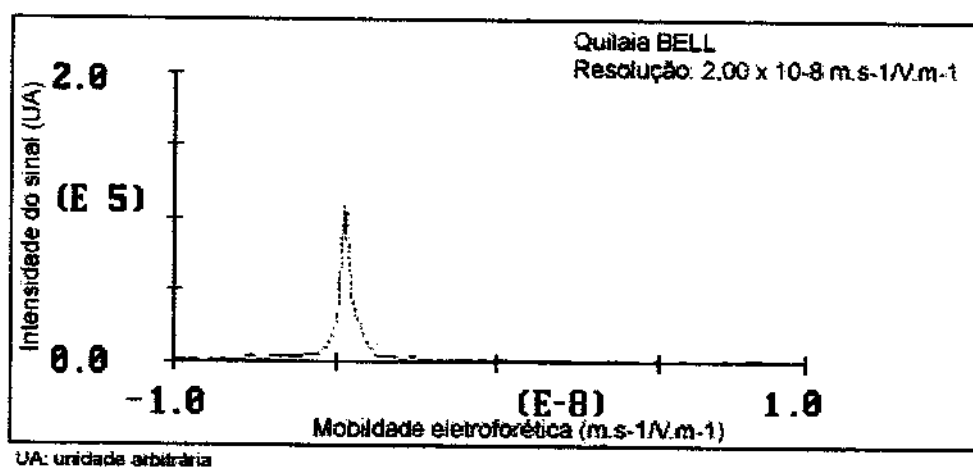
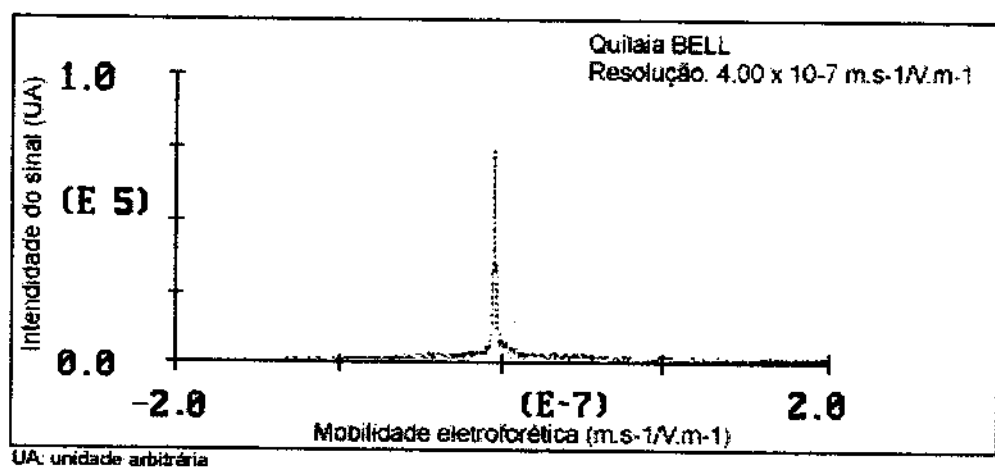


FIGURA IV.25. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética das partículas de soluções aquosas da quilaia BELL obtidos com dois níveis de resolução.

Histogramas da MEF típicos, obtidos a várias concentrações abaixo e acima da CMC, são apresentados nas Figuras IV.26 e IV.27 para as quilaia PENCO e BELL respectivamente, e demonstram que as partículas foram efetivamente detectadas em toda faixa de concentração empregada. Valores coerentes da mobilidade eletroforética (MEF) e do diâmetro de Stokes (D_{st}), com ordens de grandeza de 10^{-9} m.s⁻¹/V.m⁻¹ e 10^{-6} m respectivamente, foram obtidos em toda faixa de concentração. Também, partículas foram detectadas por observação direta no monitor do aparelho desde a menor concentração empregada ($1,0 \times 10^{-4}$ g/ml).

Uma nota acauteladora com relação aos histogramas: ocasionalmente observa-se um pico espúrio com MEF zero, um artefato causado por partículas aderidas à parede (interna ou externa) do capilar, não considerado pelo aparelho no cálculo da MEF. Este artefato ocorre normalmente após a leitura de um número muito grande de amostras, situação que ocorreu no caso da quilaia BELL cujas amostras foram medidas após todas as da PENCO.

Concluindo, o acompanhamento da MEF e D_{st} com a variação da concentração da solução demonstrou que as mesmas partículas estavam presentes e foram medidas a concentrações de 1/10 da CMC. Mais ainda, os valores de MEF e D_{st} são os mesmos abaixo e acima da CMC, e com valores concordantes com os relatados anteriormente. A observação direta das partículas no monitor do PENKEM 3000 corrobora estes resultados pois partículas puderam ser visualizadas em toda faixa de concentração, seu número no campo visual aumentando com o aumento da concentração.

Uma vez que estes resultados indicaram que foram medidas partículas que não são micelas, partículas estas que não puderam ser eliminadas por filtração, permanece a questão de como eliminar estas partículas maiores de modo a verificar se o aparelho PENKEM 3000 tem efetivamente a capacidade de "enxergar", e portanto medir, as micelas.

Assim, numa segunda etapa, testes confirmativos foram feitos com base na centrifugação das soluções, uma operação que em condições normais pode promover a separação (sedimentação) das partículas maiores sem exercer qualquer efeito sobre as micelas.

Para tanto, uma solução da quilaia PENCO com concentração de 0,01 g/ml (muito acima da CMC de aproximadamente $1,5 \times 10^{-3}$ g/ml) foi preparada e leituras da MEF e D_{st} feitas tanto na solução inicial como no sobrenadante resultante da centrifugação por 30 minutos a 16.000 "g". Os histogramas de MEF típicos obtidos

para as amostras dos tratamentos e do controle (água desionizada utilizada no preparo das soluções) são apresentados na Figura IV.28.

Quando os histogramas de MEF da água desionizada e das amostras são comparados, observa-se que no sobrenadante resultante da centrifugação não são detectadas partículas: não se verifica nenhum sinal claro (pico) correspondente a partículas e o histograma registra apenas o nível de ruído do sistema, análogo ao representado pela água desionizada. Por outro lado, a solução original (não centrifugada) apresenta picos claramente definidos, com relação de intensidade de sinal/ruído satisfatória.

A observação direta do monitor do PENKEM 3000 corroborou estes resultados. Enquanto que na solução não centrifugada observaram-se partículas bem visíveis e em bom número, na solução centrifugada não foi visualizada nenhuma partícula (a última observação se aplica também, evidentemente, para a água desionizada). A medida do D_{St} leva à mesma conclusão: enquanto que a solução não centrifugada pode ser medida sem problemas, o PENKEM 3000 não produziu nenhum resultado para a solução centrifugada e para a água desionizada.

Portanto, a centrifugação a 16.000 "g" foi eficiente para separação das partículas cuja MEF e D_{St} foi medida nos experimentos anteriores. O PENKEM 3000 não detectou a presença das micelas presentes na amostra após centrifugação, cujo tamanho está portanto abaixo do limite de detecção do aparelho. Assim sendo, pode-se concluir que as partículas medidas nos experimentos anteriores definitivamente não eram micelas e que o PENKEM 3000 não possui capacidade para "enxergar" as micelas presentes em soluções aquosas de quilaia acima da CMC.

• Considerações finais

Os resultados obtidos indicam que as quilaia PENCO e BELL são produtos com características bastante distintas, apresentando diferenças substanciais de composição química, inclusive quanto ao teor de sapogeninas. Apesar destas diferenças, suas CMC's são próximas. Suas soluções aquosas contêm ainda populações de partículas com características distintas quanto à dispersão (mono ou poliodispersas), mobilidade eletroforética e tamanho.

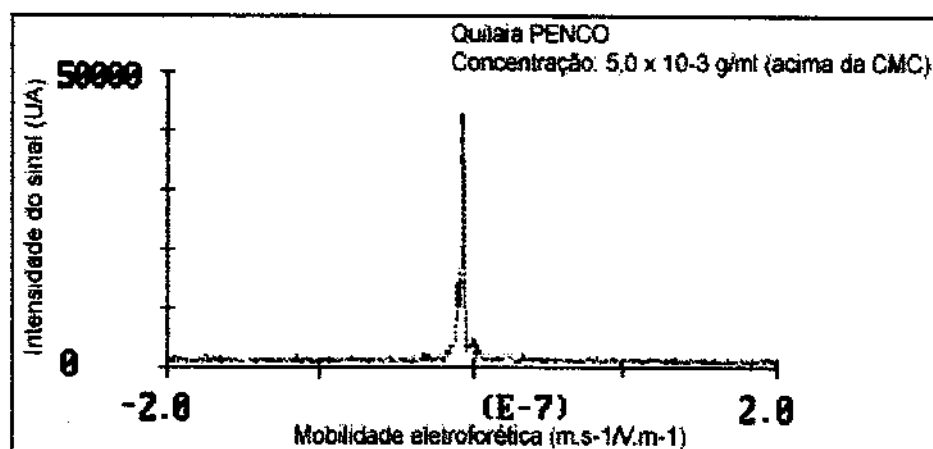
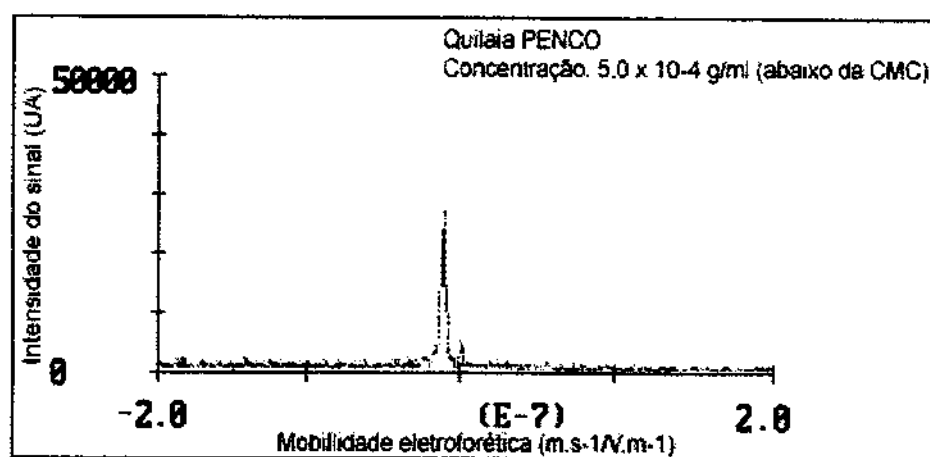
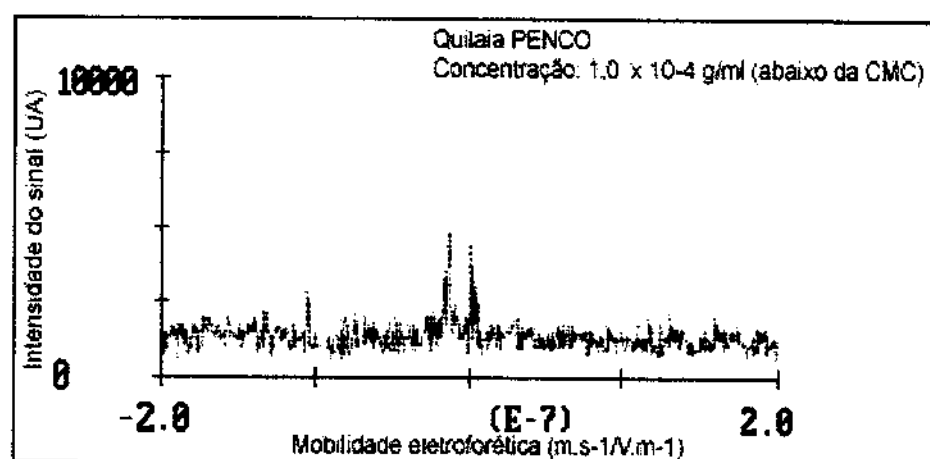


FIGURA IV.26. Histogramas típicos de mobilidade eletroforética obtidos a várias concentrações da quilaia PENCO ($\text{CMC} \sim 1,5 \times 10^{-3}$ g/ml) em solução aquosa a 25°C e pH 4,6.

IV. Resultados e Discussão

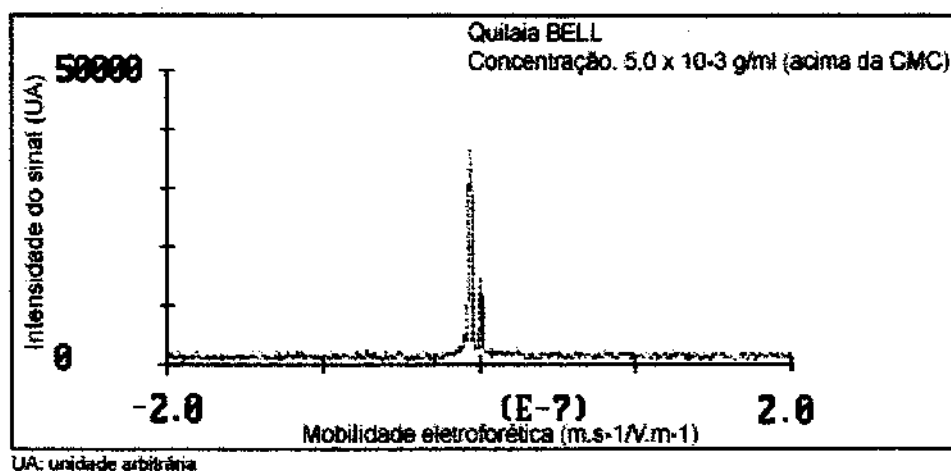
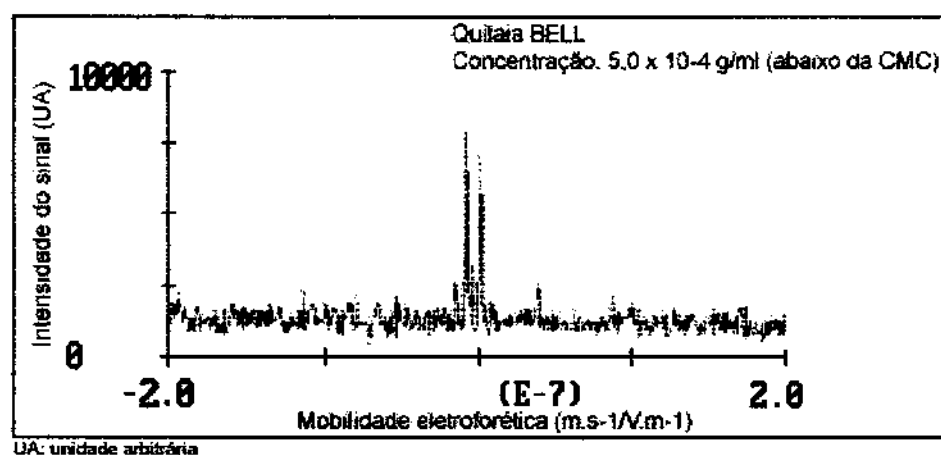
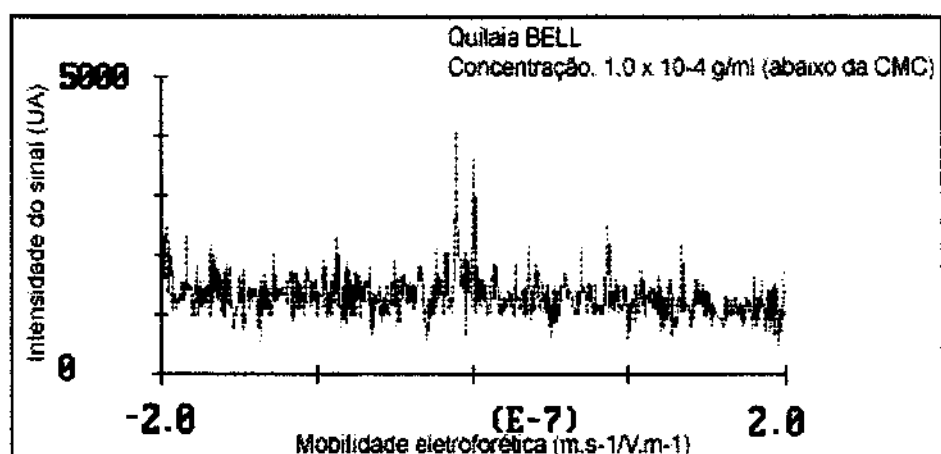
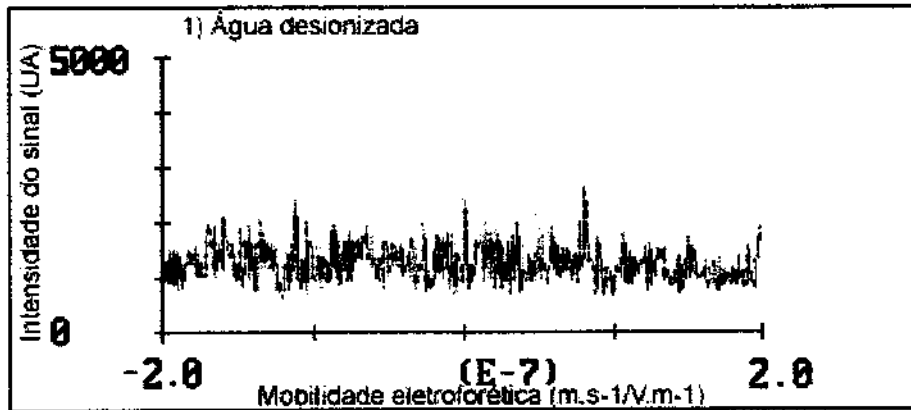
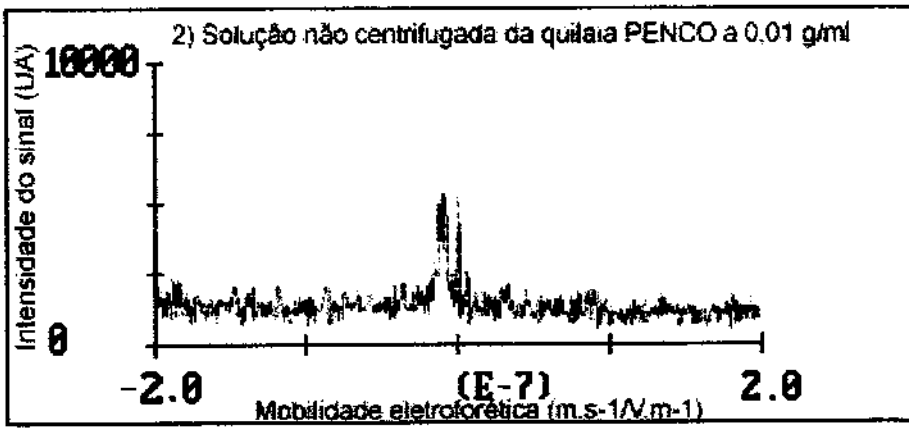


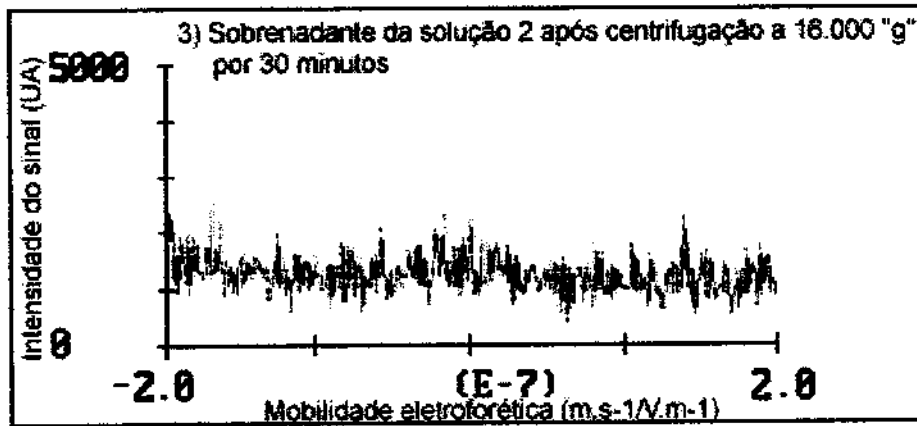
FIGURA IV.27. Histogramas típicos de mobilidade eletroforética obtidos a várias concentrações da quilaia BELL (CMC $\sim 1,5 \times 10^{-3}$ g/ml) em solução aquosa a 25°C e pH 4,6.



UA: unidade arbitrária



UA: unidade arbitrária



UA: unidade arbitrária

FIGURA IV.28. Histogramas típicos da mobilidade eletroforética a 25 °C em amostras de: 1) água desionizada, 2) solução não centrifugada de quilaia PENCO a 0,01 g/ml, e 3) sobrenadante da solução 2 após centrifugação a 16.000 "g" por 30 minutos.

1.6. Mecanismos operantes na separação de colesterol

O mecanismo proposto por SUNDFELD (1992) e SUNDFELD *et al.* (1993 a, 1993 b) para justificar a redução observada do teor de colesterol do óleo de manteiga quando colocado em contato com soluções aquosas de quilaia, foi a solubilização do colesterol em micelas de saponinas presentes na fase aquosa. Também, segundo estes autores, a adição de terra diatomácea a este sistema bifásico poderia ensejar a formação de admicelas e a adsolubilização de colesterol nelas. Tais propostas foram feitas a partir dos resultados de remoção de colesterol obtidos dos diferentes processos estudados por estes autores, associados a bibliografia referente à formação de micelas mistas de saponinas de quilaia e ácidos biliares em meio aquoso (OAKENFULL & SIDHU, 1983; OAKENFULL, 1986) e o efeito hipocolesterolêmico decorrente de sua ingestão (TOPPING *et al.*, 1980; OAKENFULL *et al.*, 1984; RAO & KENDALL, 1986), assim como os relatos de formação de admicelas e adsolubilização de solutos (HARWELL & O'HEAR, 1989). Não foram apresentadas, entretanto, evidências diretas de que tais mecanismos estivessem efetivamente operando.

No presente trabalho, em todas as situações estudadas, observou-se uma distribuição de colesterol entre todas as fases (aquosa, oleosa e sólida) em contato decorrentes dos processos LL e SLL, resultando em fases oleosas com teor de colesterol menor que o observado no óleo de manteiga inicial. A diminuição dos teores de colesterol nas fases oleosas decorrentes de efeitos eventualmente significativos dos parâmetros de processo estudados (pH, temperatura, concentração da solução de quilaia e quantidade de terra diatomácea) foi acompanhada pela elevação tanto dos teores de colesterol seletivamente associados à torta quanto daqueles presentes nas fases aquosas correspondentes. Estes resultados, em princípio, não conflitam com os mecanismos sugeridos por SUNDFELD (1992).

Entretanto, mecanismos mais gerais de separação podem ser propostos, considerando-se os diagramas de fase típicos de sistemas multifásicos similares contendo surfatantes. Os complexos diagramas de fase exibidos por sistemas quaternários óleo - água - surfatante - soluto, contendo a situação de equilíbrio de fases associada a cada composição global particular, em que a presença de várias regiões (contendo uma, duas ou três fases em equilíbrio) e os limites entre regiões podem ser alterados por vários fatores (tais como temperatura, força iônica, entre outros) (HIEMENZ, 1986; BOURREL & SCHECHTER, 1988), sugerem múltiplas possibilidades de separação envolvendo estruturas coloidais.

Assim, além da solubilização em micelas esféricas (isotrópicas), outras estruturas (ex.: cristais líquidos) contendo colesterol podem estar presentes na fase aquosa, dependendo da composição global do sistema e das condições de temperatura e força iônica, entre outros fatores. A coexistência de mais de um tipo de estrutura coloidal no seio da fase aquosa, com diferenças de composição (inclusive teor de colesterol) entre diferentes estruturas, também representa uma possibilidade. Portanto, a proposta de mecanismo operante na separação deve ser ampliada, de modo a incorporar as várias possibilidades potencialmente presentes no diagrama de fases do sistema. Neste caso, a proposta de SUNDFELD (1992) de solubilização de colesterol em micelas (isotrópicas) de saponinas presentes em solução aquosa, pode ser encarada como um caso particular de um sistema potencialmente bastante mais complicado, em que várias outras possibilidades de solubilização podem ocorrer.

A parcela de colesterol seletivamente associado à torta (parcela que exclui o colesterol associado ao óleo mecanicamente ocluído na torta) depende de alguma forma de associação do colesterol envolvendo a quilaia, uma vez que a terra diatomácea, na ausência de quilaia, não promove a remoção de colesterol no processo SLL, como relatado por SUNDFELD (1992). Possibilidades de associação envolvendo quilaia, presentes na torta, podem incluir não só o caso específico de formação de admicelas proposto por SUNDFELD (1992), mas também outras estruturas coloidais (ex.: cristais líquidos) eventualmente presentes no sistema.

Assim, os mecanismos propostos por SUNDFELD (1992) devem ser considerados como casos particulares dentro de uma ampla gama de possibilidades encontradas em sistemas similares, que apresentam elevada complexidade.

De fato, alguns resultados obtidos no presente trabalho não indicam a solubilização de colesterol em micelas esféricas isotrópicas presentes no meio aquoso como o mecanismo mais provável. Por exemplo, o fato de que as quilaia Penco e Bell têm CMC's próximas e eficácias bastante distintas na remoção de colesterol pelos processos LL e SLL, sugere que a micelização isotrópica é um fator de menor importância, neste caso.

Extratos de quilaia são misturas complexas de saponinas com outros componentes das cascas e, assim sendo, há que se considerar a possibilidade da solubilização de colesterol estar também associada a estes outros componentes. Os taninos em particular, com teores de 4,49 e 10,16% nas quilaia Bell e Penco, respectivamente, merecem ser considerados. Além de efeito hipocolesterolêmico ter sido observado na ingestão de taninos por ratos (MURAMATSU *et al.*, 1986;

YUGARANI *et al.*, 1992), SIMON *et al.* (1994) e HUH *et al.* (1996) demonstraram que taninos interagem com fosfolipídeos e são incorporados em mono e bicamadas destes surfatantes. Tais constatações são relevantes porque sugerem o potencial de atuação associada de taninos e saponinas no efeito hipocolesterolêmico observado na ingestão de extratos de quilaia e, sendo ambos compostos anfifílicos, a possibilidade de participação em estruturas coloidais propostas como atuantes na solubilização de colesterol em meio aquoso.

Outro aspecto a ser comentado é a aparente discrepância entre os níveis de remoção de colesterol obtidos por SUNDFELD (1992) e os relatados no presente trabalho, que empregaram quilaia PENCO e BELL, respectivamente. Tais quilaia tem composições químicas bastante distintas, ilustradas pelos teores de sapogeninas (13,97% para a PENCO e 5,04% para a BELL) e de taninos (10,16% para a PENCO e 4,49% para a BELL), entre outros componentes. Mesmo assim, ambas apresentam CMC's próximas. Embora seja tentador atribuir as diferenças observadas na remoção de colesterol simplesmente aos diferentes teores de sapogeninas (e, portanto, de saponinas) entre as duas quilaia, ou mesmo a uma possível ação dos taninos (que não deve ser negligenciada), o fato é que as duas quilaia são misturas complexas bastante distintas de tensoativos. Assim, as razões para as disparidades observadas na remoção de colesterol podem ser bem mais elaboradas, resultantes do impacto que diferenças de constituintes e sua proporção relativa nos extratos podem ter nos respectivos diagramas de fase, alterando a distribuição de colesterol e fases presentes no ponto representativo de uma mesma composição global.

Também é importante mencionar o fato de que os sistemas estudados continham concentrações de quilaia relativamente elevadas. Assim, para CMC's das quilaia PENCO e BELL pouco acima de 1 g/l (0,1%), as concentrações nas soluções aquosas empregadas nos processos LL e SLL variaram entre 50 e 350 g/l (5 e 35%, respectivamente). Usualmente, a existência de micelas esféricas que não interagem (soluções isotrópicas micelares) está restrita a baixas concentrações de surfatantes acima da CMC e o aumento da concentração pode dar origem a fases liotrópicas cristinas líquidas (HIEMENZ, 1986; BOURREL & SCHECHTER, 1988). Os trabalhos que relataram estruturas dos agregados formados por saponinas em solução aquosa indicaram a existência de micelas esféricas a baixas concentrações (LUCY & GLAUERT, 1964; OAKENFULL, 1986; MITRA & DUNGAN, 1997) e cristais líquidos a concentrações mais elevadas (LUCY & GLAUERT, 1964). Quanto às estruturas envolvendo saponinas e colesterol no meio aquoso, LUCY & GLAUERT (1964) relataram a formação de cristais líquidos. Assim, não se deve restringir as

possibilidades de solubilização unicamente as micelas esféricas, uma vez que outras possibilidades (ex.: cristais líquidos) são pertinentes.

Do anteriormente exposto, mecanismos mais gerais de separação de colesterol podem ser propostos. Assim, se o diagrama de fases do sistema água - óleo - quilaia - colesterol apresentar as características de sistemas similares encontrados na literatura, além da solubilização em micelas esféricas (isotrópicas), muitas outras estruturas (cristais líquidos) contendo colesterol podem estar presentes, dependendo da composição global do sistema. Neste caso, a presença (ou não) de determinadas regiões, sua abrangência e posição, assim como os limites entre regiões (de uma ou mais fases) deste diagrama típico seriam suscetíveis a mudanças nas características do surfatante, temperatura, força iônica e pH. Assim, tais fatores também influenciariam os níveis de distribuição de colesterol entre fases e os tipos de estrutura coloidal envolvidos na solubilização. Mantidas fixas todas as demais condições do sistema, efeitos importantes na distribuição de colesterol poderiam decorrer de pequenas variações na concentração de quilaia, que levassem a ultrapassagem dos limites entre determinadas regiões neste diagrama de fases. De maneira análoga, uma determinada composição global poderia ter seu equilíbrio de fases (e distribuição de colesterol) alterado em função de variações nas características da quilaia empregada, temperatura, força iônica e pH. Esta abordagem permite, de forma geral, estabelecer hipóteses para justificar a existência (ou não) de eventuais diferenças nos níveis de solubilização de colesterol na fase aquosa obtidos nos processos estudados.

Evidências diretas dos mecanismos operantes na solubilização no meio aquoso não foram obtidas no presente trabalho. A construção de diagramas de fases para o sistema água - óleo - quilaia - colesterol, com caracterização das fases e identificação das estruturas presentes, de maneira análoga à realizada nos estudos de bile artificial (SMALL *et al.*, 1966; BOURGÉS *et al.*, 1967ab), permitiria a identificação clara dos mecanismos operantes para cada situação particular, dentro das faixas de interesse relativas à composição global e condições de temperatura, pH e força iônica. Também permitiria o projeto de processos de separação, uma vez que se poderia prever qual a proporção dos componentes individuais numa mistura que resultaria em um determinado equilíbrio de fases e nível de separação de colesterol (mantidos fixos a pressão, temperatura, força iônica e pH do sistema).

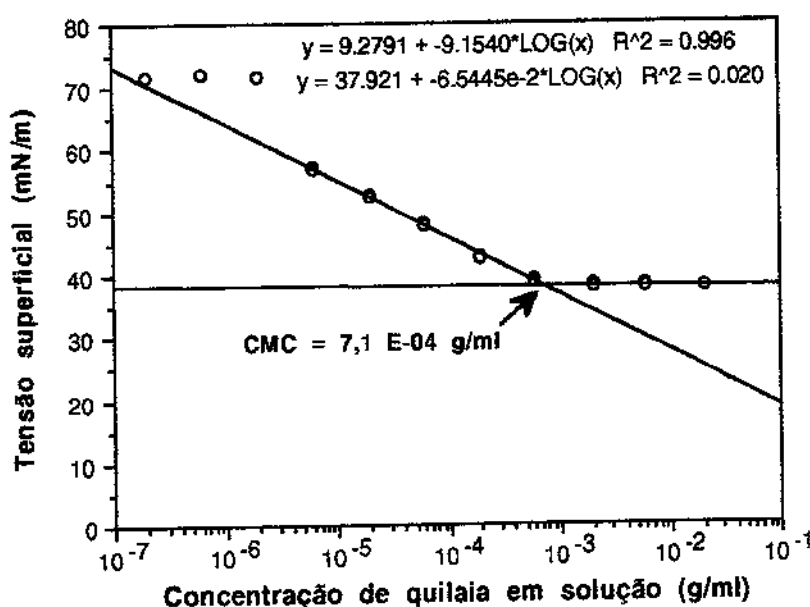
2. Segunda Fase: Formação de micela e solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia

Nesta segunda fase, 04 (quatro) estudos estiveram voltados para a definição da CMC em soluções aquosas de quilaia e da distribuição do colesterol entre fases num sistema bifásico líquido-líquido, verificando-se o efeito de variáveis de processo (concentração de quilaia em solução, temperatura, pH e nível de NaCl adicionado). Também, buscou-se obter evidências do envolvimento de micelas na separação de colesterol, ou seja, verificar a pertinência da proposta de SUNDFELD (1992) de que a solubilização de colesterol em micelas seja um dos mecanismos operantes na separação. Nesta etapa foram utilizados o decano com colesterol adicionado em níveis conhecidos como substitutivo da fase oleosa e um extrato de saponinas de quilaia mais purificado (SIGMA). Os resultados destes estudos são apresentados e discutidos a seguir.

2.1. Formação de micela em soluções aquosas de quilaia

Estes experimentos visaram determinar a concentração de micela crítica (CMC), isto é, a concentração a partir da qual observa-se a formação de micelas em soluções aquosas de quilaia. Foram verificados os efeitos da temperatura, pH e adição de cloreto de sódio na CMC. Num processo de solubilização em micelas, a CMC é uma informação fundamental, representando o limite inferior de concentração a partir do qual poderá ser observada a solubilização de colesterol.

O procedimento típico para obtenção da CMC a partir de um conjunto de dados de tensão superficial e concentração de quilaia em solução aquosa, representativo do utilizado para cada uma das réplicas de cada um dos tratamentos, é ilustrado na Figura IV.29. Cada tratamento representa uma combinação particular de temperatura (T), pH e concentração de cloreto de sódio adicionado (NaCl) e foram realizados 18 tratamentos em triplicata (réplicas denominadas A, B e C), resultando 54 curvas apresentadas nas Figuras P.1 a P.54 do Apêndice P.



$$\begin{aligned} \text{Cálculo da CMC: } 37,921 - 0,065445 \log \text{CMC} &= 9,2791 - 9,1540 \log \text{CMC} \\ \Rightarrow \text{CMC} &= 7,1 \times 10^{-4} \text{ g/ml} \end{aligned}$$

FIGURA IV.29. Procedimento típico para obtenção da CMC da quilaia SIGMA em cada condição de temperatura, pH e nível de adição de NaCl, a partir dos dados de tensão superficial e concentração de quilaia em solução aquosa.

O exame das curvas que descrevem a evolução da tensão superficial com a variação da concentração das soluções de quilaia indica três regiões distintas. Primeiramente, na região que corresponde às menores concentrações, tipicamente entre $2,0 \times 10^{-7}$ e $2,0 \times 10^{-6}$ g/ml, observa-se uma invariância da tensão superficial, cujos valores permanecem próximos aos da água desionizada (72,1 mN/m a 25 °C). Em seguida, na região de concentrações intermediárias, a tensão superficial diminui linearmente com o aumento da concentração da solução. Por último, na região de concentrações mais elevadas, observa-se que a tensão superficial é constante, independente da concentração da solução.

A invariância da tensão superficial com a concentração nas soluções mais diluídas contraria as expectativas (Gibbs) de uma variação linear e, uma vez que os valores de tensão superficial medidos nestas concentrações correspondem ao da água desionizada, sugerem a ausência de tensoativo na interface ar - solução. O exame dos tempos de contato empregados nas medidas, apresentado no Apêndice

P, sugere que os valores de tensão obtidos na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ g/ml não representam situações de equilíbrio e, portanto, não foram considerados para fins de determinação da CMC. Por outro lado, excluídos os pontos correspondentes a tais concentrações, cumpriram-se as expectativas (Gibbs) de uma variação linear da tensão com o logaritmo da concentração da solução, antes da descontinuidade associada à CMC. Acima da CMC, a tensão superficial permaneceu constante, indicando saturação da interface pelo tensoativo.

Os valores obtidos para as CMC's nos vários tratamentos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), cujos resultados estão contidos na Tabela N.1 do Apêndice N. Os resultados da ANOVA indicam como significativos os efeitos de todas as variáveis independentes assim como da interação entre elas ($P < 0,05$), exigindo uma análise mais pormenorizada. Para tanto, foram utilizados tanto os valores médios como os intervalos com 95% de confiança das CMC's obtidas nos vários tratamentos, apresentados em detalhe nas Figuras N.1 a N.8 do Apêndice N.

• Efeito da temperatura na CMC

O efeito da temperatura em todas as condições pH/NaCl é apresentado na Figura IV.30 onde podem ser observadas tendências distintas. Quando não se adiciona NaCl, a tendência representada pelas médias em todos os pH's parece ser a de um aumento da CMC com a temperatura. Entretanto, com a adição de NaCl, há tendências conflitantes e a conclusão poderia ser a invariabilidade ou mesmo o aumento da CMC com o aumento da temperatura.

Considerados os intervalos com 95% de confiança apresentados na Tabela IV.13 verifica-se que, quando não se adiciona NaCl, embora as médias indiquem um aumento da CMC com a temperatura, esta tendência só é estatisticamente significativa a pH 6,0. Neste pH, as CMC's a 35 e 45 °C não diferem entre si, mas ambas são maiores que aquela a 25 °C.

Os resultados obtidos com a adição de 0,5M de NaCl levam a conclusões semelhantes: não se observa variação estatisticamente significativa da CMC com a temperatura nos pH's 3,0 e 4,5; a pH 6,0, as CMC's a 35 e 45 °C não são distintas mas são ambas maiores que aquela a 25 °C.

Portanto, na faixa estudada, quando um efeito significativo é observado, a tendência é o aumento da CMC com a temperatura. Ressalte-se que esta tendência

só é estatisticamente significativa a pH 6,0 e, mesmo assim, embora maiores que a 25 °C, as CMC's a 35 e 45 °C não são distintas.

- Efeito do pH na CMC

O efeito do pH em todas as condições T/NaCl é ilustrado na Figura IV.31 onde se verifica que, de uma maneira geral, ao aumento de pH corresponde um aumento no valor da CMC. Também, observe-se que o aumento da CMC com o pH é mais pronunciado quando não se adiciona NaCl.

A evolução da CMC com o pH para cada condição T/NaCl é apresentada na Tabela IV.14 que, considerados os intervalos com 95% de confiança, corrobora esta tendência. Assim, quando há um efeito significativo, a tendência é o aumento da CMC com o pH.

- Efeito da adição de NaCl na CMC

O efeito da adição de NaCl em todas as condições T/pH é ilustrado na Figura IV.32 e, de maneira geral, observa-se uma redução do valor da CMC com a adição de NaCl.

A Tabela IV.15 apresenta os intervalos com 95% de confiança para cada condição T/pH que indicam que, a pH 3,0, a adição de NaCl não resulta praticamente em nenhum efeito; por outro lado, a pH's 4,5 e 6,0, observa-se uma diminuição considerável da CMC. Assim, quando um efeito significativo é observado, a tendência é a redução da CMC com a adição de NaCl.

- Discussão dos resultados obtidos

As razões fundamentais para a variação da CMC com o pH e com a adição de NaCl podem ser encontradas se considerarmos que a formação de micelas pressupõe a aproximação das moléculas de saponinas com a subsequente formação dos agregados micelares. Assim sendo, fatores que facilitam o processo de

aproximação e agrupamento das moléculas de saponinas em solução contribuem para a diminuição do valor da CMC, ou seja, micelas são formadas a concentrações mais baixas do tensoativo.

As saponinas de quilaia são surfatantes aniônicos, contendo o grupo carboxila do ácido glicurônico em suas moléculas. Com a diminuição do pH, diminui também a proporção destes grupos na forma ionizada, diminuindo a repulsão eletrostática entre moléculas. Assim, seria de se esperar que a diminuição do pH favorecesse a formação das micelas e resultasse na diminuição da CMC. Esta tendência é a indicada pelos resultados experimentais, sendo análoga à obtida por MORITA *et al.* (1986) para saponinas estruturalmente semelhantes às de quilaia. MITRA & DUNGAN (1997) obtiveram também resultados concordantes com os obtidos no presente trabalho, relatando aumento da CMC de soluções aquosas de extratos de quilaia com o pH na faixa de 3 a 8,9 (a 25 °C e concentração de NaCl não especificada).

Quanto ao efeito da adição de NaCl, há que se considerar também um efeito eletrostático. A adição de sal contribuiria para a diminuição do valor da CMC na medida em que os contra-íons Na^+ funcionam como uma "colchão" amortecedor, diminuindo a repulsão eletrostática entre os monômeros. Mais rigorosamente, o aumento da concentração de sal em solução promove a compressão desta atmosfera de contra-íons, e as forças eletrostáticas de repulsão têm seu alcance diminuído. O efeito macroscópico observado seria uma diminuição do valor da CMC com a adição de NaCl, tendência que também é indicada pelos resultados experimentais. MITRA & DUNGAN (1997) obtiveram resultados concordantes com os obtidos no presente trabalho, relatando a diminuição contínua da CMC de soluções aquosas de extratos de quilaia com a adição de NaCl, a concentrações de até 1 M (a 25 °C e pH não especificado).

Finalmente, se as observações de caráter teórico anteriormente expostas se aplicam, seria de se esperar um efeito mais relevante da adição do NaCl nos pH's mais elevados. Também, o efeito do pH deveria ser mais relevante na ausência de NaCl. Ambas expectativas são satisfeitas pelos resultados experimentais.

Quanto ao efeito da temperatura, a expectativa baseada em resultados empíricos obtidos para a maioria dos surfatantes iônicos é de um efeito pequeno, com o valor da CMC aumentando com o aumento da temperatura. Os resultados experimentais são coerentes com estas expectativas indicando, no caso das saponinas de quilaia, um efeito relativamente pequeno da temperatura e, generalizando, uma tendência que parece ser a de um ligeiro aumento na CMC com

o aumento da temperatura (que, entretanto, só é estatisticamente observável a pH 6,0). MITRA & DUNGAN (1997) obtiveram resultados concordantes com os obtidos no presente trabalho, relatando um ligeiro aumento da CMC de soluções aquosas de extratos de quilaia com o aumento da temperatura entre 25 e 52 °C (em condições de pH e concentração de NaCl não especificadas).

• Comentários finais

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que, de maneira geral, a formação de micelas é favorecida com a redução do pH e da temperatura, e com a adição de NaCl. Estas tendências são coerentes com as expectativas mencionadas na literatura para a CMC de surfatantes iônicos em soluções aquosas (ELWORTHY et al., 1968; ROSEN, 1976; HALL & TIDDY, 1981; HIEMENZ, 1986; BOURREL & SCHECHTER, 1988) e concordantes com os resultados obtidos com soluções de quilaia por MITRA & DUNGAN (1997).

Na análise da CMC foi enfatizado o papel das saponinas, e de suas características estruturais, uma vez que são os componentes majoritários (12,87% de sapogeninas, equivalente a 56,6% de saponinas). Entretanto, considerada a complexidade da composição química de extratos de quilaia, e o impacto potencial de seus componentes na CMC, esta abordagem é uma simplificação. A presença de outros compostos anfífilos na quilaia, por exemplo os taninos (6,23%), pode ter impacto significativo na CMC das soluções.

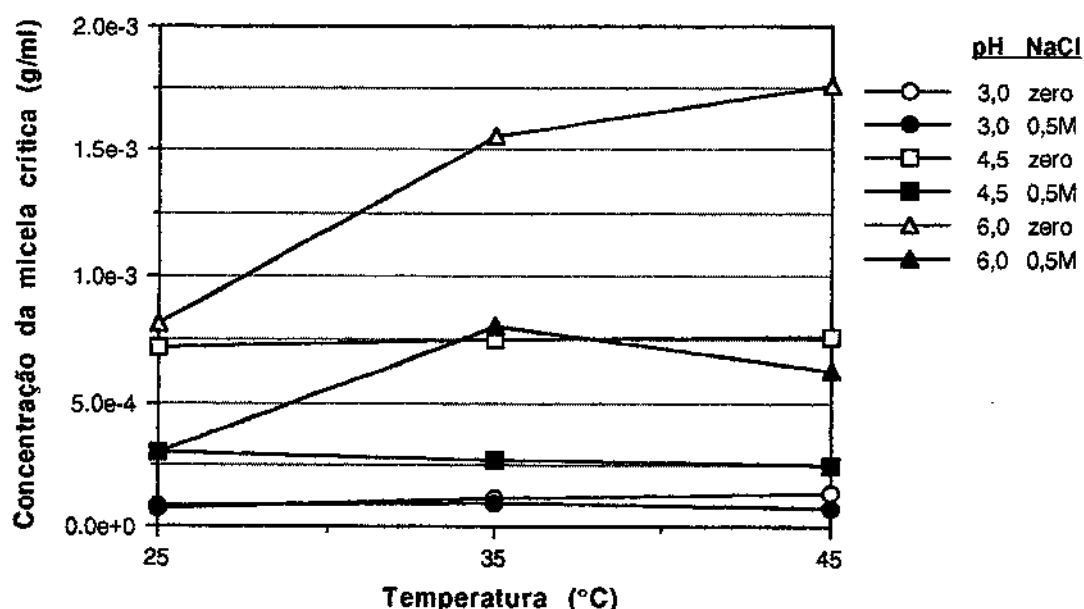


FIGURA IV.30. Efeito da temperatura na CMC da quilaia SIGMA.

TABELA IV.13. Efeito da temperatura na CMC da quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento | | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|-----|------------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | Temperatura (°C) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 3,0 | 25 | 3 | 7,6 E-05 | 5,9 E-05 | 9,4 E-05 |
| | | 35 | 3 | 1,1 E-04 | 8,2 E-05 | 1,4 E-04 |
| | | 45 | 3 | 1,3 E-04 | 6,7 E-05 | 2,0 E-04 |
| | 4,5 | 25 | 3 | 7,2 E-04 | 6,5 E-04 | 8,0 E-04 |
| | | 35 | 3 | 7,5 E-04 | 6,4 E-04 | 8,7 E-04 |
| | | 45 | 3 | 7,6 E-04 | 7,2 E-04 | 8,1 E-04 |
| | 6,0 | 25 | 3 | 8,1 E-04 | 7,0 E-04 | 9,2 E-04 |
| | | 35 | 3 | 1,6 E-03 | 1,3 E-03 | 1,9 E-03 |
| | | 45 | 3 | 1,8 E-03 | 1,2 E-03 | 2,3 E-03 |
| 0,5 | 3,0 | 25 | 3 | 8,0 E-05 | 2,9 E-05 | 1,3 E-04 |
| | | 35 | 3 | 8,9 E-05 | 5,8 E-05 | 1,2 E-04 |
| | | 45 | 3 | 7,6 E-05 | 7,0 E-05 | 8,1 E-05 |
| | 4,5 | 25 | 3 | 2,9 E-04 | 2,4 E-04 | 3,5 E-04 |
| | | 35 | 3 | 2,7 E-04 | 2,4 E-04 | 3,1 E-04 |
| | | 45 | 3 | 2,5 E-04 | 2,0 E-04 | 2,9 E-04 |
| | 6,0 | 25 | 3 | 3,0 E-04 | 2,7 E-04 | 3,4 E-04 |
| | | 35 | 3 | 8,1 E-04 | 5,8 E-04 | 1,0 E-03 |
| | | 45 | 3 | 6,3 E-04 | 5,4 E-04 | 7,2 E-04 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

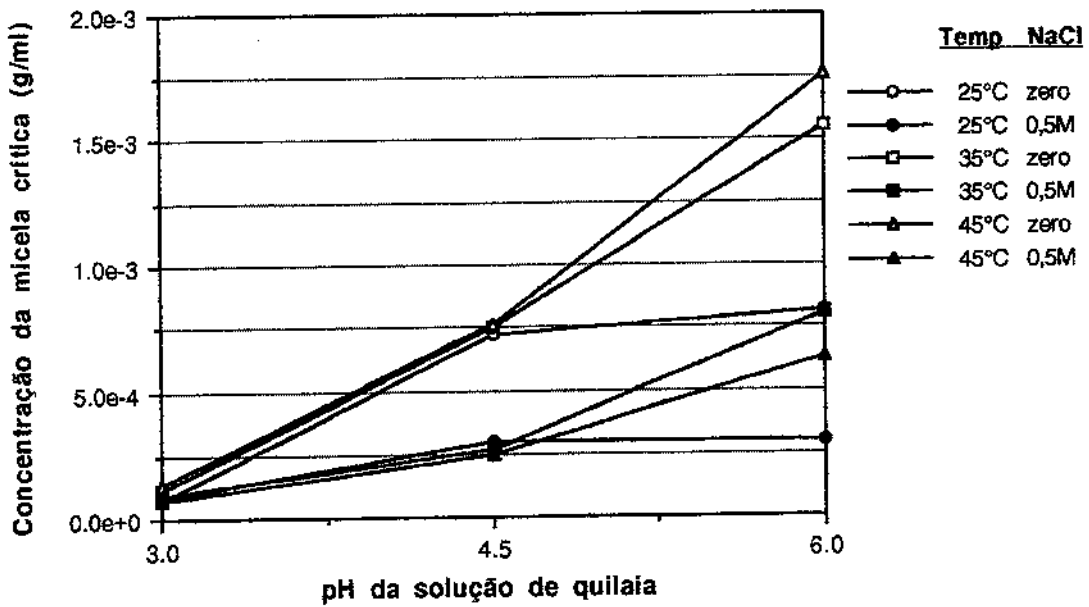


FIGURA IV.31. Efeito do pH na CMC da quilaia SIGMA.

TABELA IV.14. Efeito do pH na CMC da quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento | | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------------|----------|-----|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura (°C) | NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 25 | zero | 3,0 | 3 | 7,6 E-05 | 5,9 E-05 | 9,4 E-05 |
| | | 4,5 | 3 | 7,2 E-04 | 6,5 E-04 | 8,0 E-04 |
| | | 6,0 | 3 | 8,1 E-04 | 7,0 E-04 | 9,2 E-04 |
| | 0,5 | 3,0 | 3 | 8,0 E-05 | 2,9 E-05 | 1,3 E-04 |
| | | 4,5 | 3 | 2,9 E-04 | 2,4 E-04 | 3,5 E-04 |
| | | 6,0 | 3 | 3,0 E-04 | 2,7 E-04 | 3,4 E-04 |
| 35 | zero | 3,0 | 3 | 1,1 E-04 | 8,2 E-05 | 1,4 E-04 |
| | | 4,5 | 3 | 7,5 E-04 | 6,4 E-04 | 8,7 E-04 |
| | | 6,0 | 3 | 1,6 E-03 | 1,3 E-03 | 1,9 E-03 |
| | 0,5 | 3,0 | 3 | 8,9 E-05 | 5,8 E-05 | 1,2 E-04 |
| | | 4,5 | 3 | 2,7 E-04 | 2,4 E-04 | 3,1 E-04 |
| | | 6,0 | 3 | 8,1 E-04 | 5,8 E-04 | 1,0 E-03 |
| 45 | zero | 3,0 | 3 | 1,3 E-04 | 6,7 E-05 | 2,0 E-04 |
| | | 4,5 | 3 | 7,6 E-04 | 7,2 E-04 | 8,1 E-04 |
| | | 6,0 | 3 | 1,8 E-03 | 1,2 E-03 | 2,3 E-03 |
| | 0,5 | 3,0 | 3 | 7,6 E-05 | 7,0 E-05 | 8,1 E-05 |
| | | 4,5 | 3 | 2,5 E-04 | 2,0 E-04 | 2,9 E-04 |
| | | 6,0 | 3 | 6,3 E-04 | 5,4 E-04 | 7,2 E-04 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

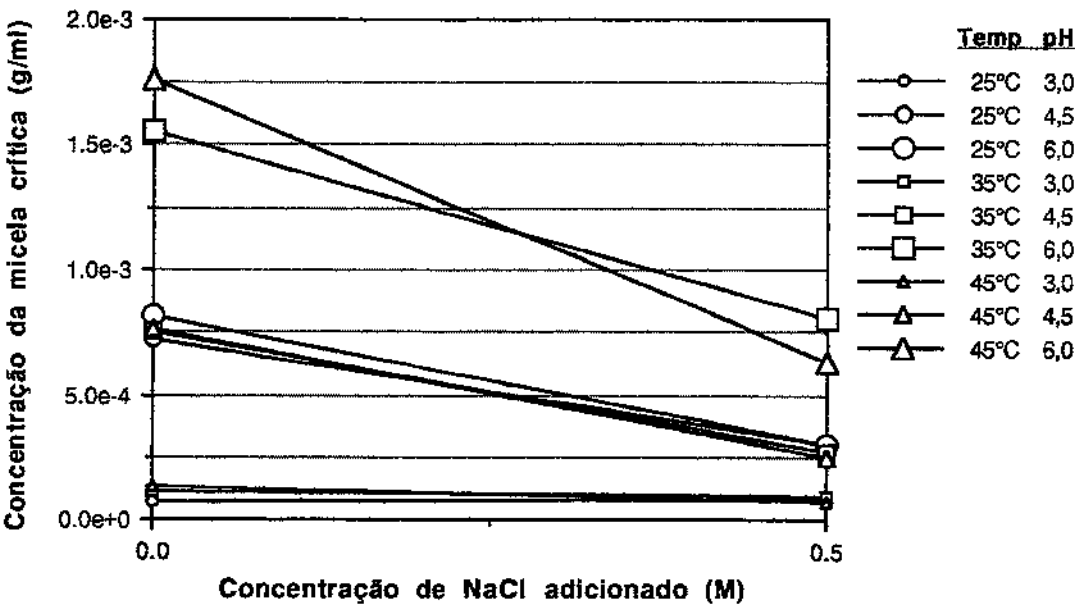


FIGURA IV.32. Efeito da adição de NaCl na CMC da quilaia SIGMA.

TABELA IV.15. Efeito da adição de NaCl na CMC da quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento | | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------------|-----|----------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura (°C) | pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 25 | 3,0 | 0,5 | 3 | 8,0 E-05 | 2,9 E-05 | 1,3 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,6 E-05 | 5,9 E-05 | 9,4 E-05 |
| | 4,5 | 0,5 | 3 | 2,9 E-04 | 2,4 E-04 | 3,5 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,2 E-04 | 6,5 E-04 | 8,0 E-04 |
| | 6,0 | 0,5 | 3 | 3,0 E-04 | 2,7 E-04 | 3,4 E-04 |
| | | zero | 3 | 8,1 E-04 | 7,0 E-04 | 9,2 E-04 |
| 35 | 3,0 | 0,5 | 3 | 8,9 E-05 | 5,8 E-05 | 1,2 E-04 |
| | | zero | 3 | 1,1 E-04 | 8,2 E-05 | 1,4 E-04 |
| | 4,5 | 0,5 | 3 | 2,7 E-04 | 2,4 E-04 | 3,1 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,5 E-04 | 6,4 E-04 | 8,7 E-04 |
| | 6,0 | 0,5 | 3 | 8,1 E-04 | 5,8 E-04 | 1,0 E-03 |
| | | zero | 3 | 1,6 E-03 | 1,3 E-03 | 1,9 E-03 |
| 45 | 3,0 | 0,5 | 3 | 7,6 E-05 | 7,0 E-05 | 8,1 E-05 |
| | | zero | 3 | 1,3 E-04 | 6,7 E-05 | 2,0 E-04 |
| | 4,5 | 0,5 | 3 | 2,5 E-04 | 2,0 E-04 | 2,9 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,6 E-04 | 7,2 E-04 | 8,1 E-04 |
| | 6,0 | 0,5 | 3 | 6,3 E-04 | 5,4 E-04 | 7,2 E-04 |
| | | zero | 3 | 1,8 E-03 | 1,2 E-03 | 2,3 E-03 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

2.2. Evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções aquosas de quilaia

Estes experimentos visaram definir, no contato de soluções de colesterol em decano com soluções aquosas de quilaia SIGMA a várias concentrações, a evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo. Os parâmetros temperatura, pH e concentração de NaCl adicionado foram mantidos fixos a 35 °C, 4,5 e 0,25M, respectivamente, que são os valores médios das faixas de interesse. Procurou-se estabelecer o tempo de contato necessário para alcance da condição de equilíbrio, informação necessária aos estudos posteriores de solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia.

A evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções de quilaia a várias concentrações é ilustrada na Figura IV.33; os valores numéricos das médias e intervalos com 95% de confiança são apresentados na Tabela IV.16. Os resultados sugerem que, nas três concentrações da solução de quilaia, a condição de equilíbrio é atingida com 8 horas de contato, uma vez que os intervalos com 95% de confiança construídos para 8 e 12 horas se sobrepõem. Não há portanto, nas condições empregadas, uma redução estatisticamente significativa na concentração de colesterol na fase decano com o aumento do tempo de contato de 8 para 12 horas.

Uma outra constatação decorrente destas curvas é o efeito importante da concentração da solução de quilaia (CSQ) nos níveis de colesterol solubilizado na fase aquosa: aumentando a CSQ diminui o teor de equilíbrio de colesterol na fase decano, ou seja, aumenta o nível de solubilização na fase aquosa.

É importante lembrar que o tempo de equilíbrio obtido se aplica, estritamente, às condições T/pH/NaCl empregadas e que constituem o ponto central das faixas de interesse previstas para estudo da solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia.

Assim, nos ensaios do efeito da temperatura, pH e adição de NaCl na solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia, estava prevista a investigação em toda faixa de interesse destas variáveis, utilizando-se condições T/pH/NaCl não cobertas por estas curvas. Por esta razão, optou-se por dar uma margem de segurança substancial de modo a garantir o alcance do equilíbrio em todas as condições previstas, optando-se pelo tempo de contato de 24 horas para utilização nos ensaios relatados a seguir.

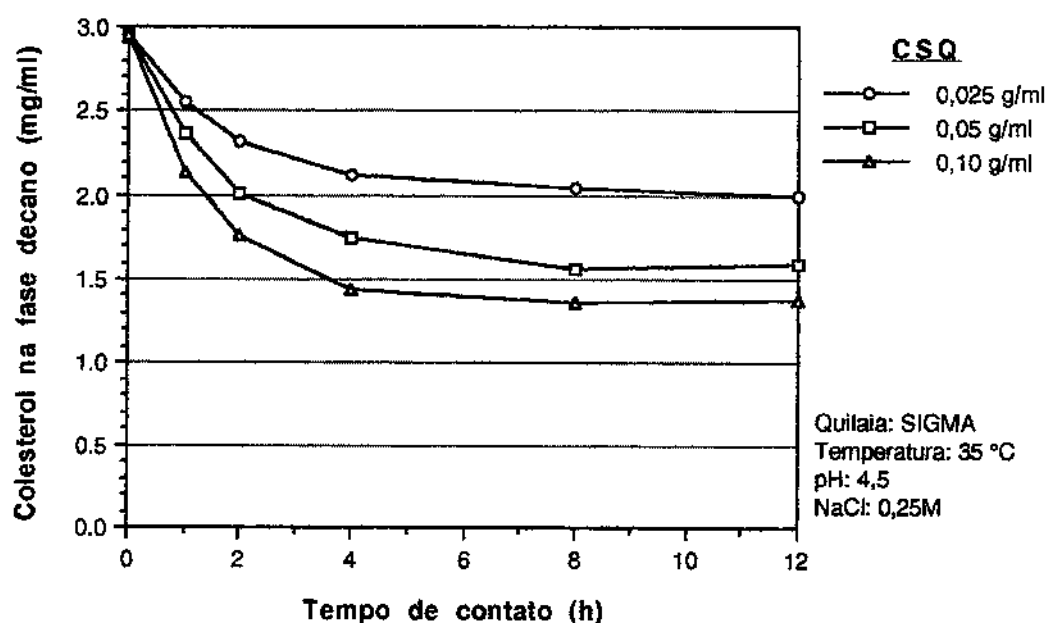


FIGURA IV.33. Evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA a três concentrações (CSQ), 35 °C, pH 4,5 e 0,25M de NaCl adicionado.

TABELA IV.16. Evolução da concentração de colesterol na fase decano com o tempo de contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA a três concentrações, 35 °C, pH 4,5 e 0,25M de NaCl adicionado: comparação das médias dos tratamentos.

| Concentração de quilaia (g/ml) | Tempo de contato (h) | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|--------------------------------|----------------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 0,025 | 0 | 5 | 2,96 | 2,93 | 2,99 |
| | 1 | 3 | 2,55 | 2,45 | 2,64 |
| | 2 | 3 | 2,32 | 2,31 | 2,33 |
| | 4 | 3 | 2,12 | 2,07 | 2,17 |
| | 8 | 3 | 2,03 | 1,98 | 2,09 |
| | 12 | 3 | 2,00 | 1,97 | 2,03 |
| 0,05 | 0 | 5 | 2,96 | 2,93 | 2,99 |
| | 1 | 3 | 2,36 | 2,33 | 2,40 |
| | 2 | 3 | 2,01 | 1,98 | 2,04 |
| | 4 | 3 | 1,75 | 1,74 | 1,76 |
| | 8 | 3 | 1,56 | 1,53 | 1,58 |
| | 12 | 3 | 1,60 | 1,55 | 1,64 |
| 0,10 | 0 | 5 | 2,96 | 2,93 | 2,99 |
| | 1 | 3 | 2,14 | 2,12 | 2,16 |
| | 2 | 3 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | 4 | 3 | 1,44 | 1,43 | 1,44 |
| | 8 | 3 | 1,36 | 1,34 | 1,37 |
| | 12 | 3 | 1,38 | 1,35 | 1,40 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

2.3. Solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia

Este estudo visou determinar o efeito da temperatura (T), do pH e da adição de cloreto de sódio (NaCl) na solubilização de colesterol na fase aquosa, a partir da fase decano contendo uma concentração inicial de 3,0 mg/ml. Buscou-se definir o efeito destas variáveis na quantidade de colesterol solubilizada em soluções aquosas de quilaia SIGMA a concentração fixa de 0,025 g/ml, definindo as condições que promovem a solubilização. O tempo de contato empregado nestes ensaios foi de 24 horas, considerado como suficiente para alcance de equilíbrio, com substancial margem de segurança, como relatado anteriormente.

Para verificar se as variáveis independentes exercem algum efeito nas concentrações de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD), foi empregada a análise de variância (ANOVA). Os resultados são apresentados na Tabela O.1 do Apêndice O e indicam como significativos ($P < 0,05$) os efeitos principais de todas as variáveis independentes, assim como das interações entre a temperatura e o pH e entre o pH e a adição de NaCl.

Essa situação recomenda uma análise mais detalhada, utilizando-se os valores médios e os intervalos com 95% de confiança da CECFD, resultantes dos 18 tratamentos realizados, apresentados nas Figuras O.1 a O.8 do Apêndice O.

• Efeito da temperatura na solubilização

O efeito da temperatura, em todas as condições pH/NaCl, é apresentado na Figura IV.34 onde as médias exibem a tendência geral de um aumento da CECFD com o aumento da temperatura. Assim sendo, observa-se que o processo da solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia é favorecido com a redução de temperatura, na faixa estudada.

Esta tendência é a mesma para todas as condições pH/NaCl. Considerados os intervalos de confiança apresentados na Tabela IV.17 verifica-se que, tanto nos casos de não adição como de adição de 0,5M de NaCl, esta tendência é estatisticamente significativa.

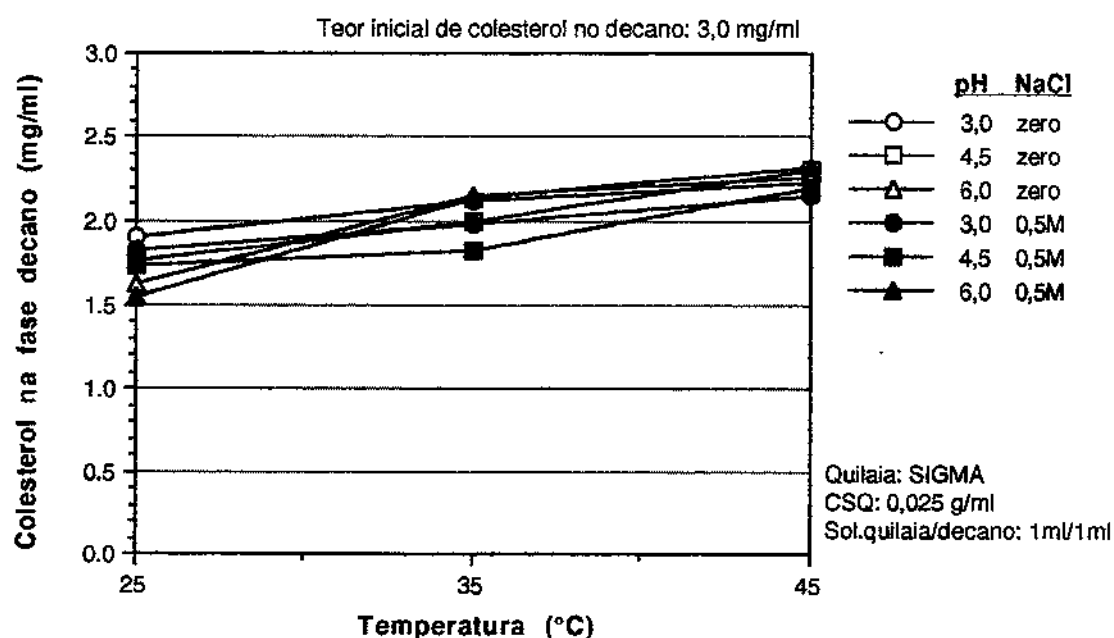


FIGURA IV.34. Efeito da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA.

TABELA IV.17. Efeito da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento | | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|-----|------------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | Temperatura (°C) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 3,0 | 25 | 6 | 1,90 | 1,83 | 1,96 |
| | | 35 | 6 | 2,12 | 2,08 | 2,16 |
| | | 45 | 6 | 2,22 | 2,16 | 2,28 |
| | 4,5 | 25 | 6 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | | 35 | 6 | 2,00 | 1,94 | 2,06 |
| | | 45 | 6 | 2,31 | 2,27 | 2,35 |
| | 6,0 | 25 | 6 | 1,63 | 1,55 | 1,70 |
| | | 35 | 6 | 2,14 | 1,96 | 2,33 |
| | | 45 | 6 | 2,26 | 2,21 | 2,32 |
| 0,5 | 3,0 | 25 | 6 | 1,82 | 1,77 | 1,87 |
| | | 35 | 6 | 1,98 | 1,95 | 2,01 |
| | | 45 | 6 | 2,15 | 2,10 | 2,20 |
| | 4,5 | 25 | 6 | 1,74 | 1,71 | 1,76 |
| | | 35 | 6 | 1,82 | 1,79 | 1,85 |
| | | 45 | 6 | 2,19 | 2,17 | 2,21 |
| | 6,0 | 25 | 6 | 1,54 | 1,50 | 1,58 |
| | | 35 | 6 | 2,13 | 1,87 | 2,38 |
| | | 45 | 6 | 2,32 | 2,28 | 2,35 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

• Efeito do pH na solubilização

O efeito do pH em todas as condições T/NaCl é ilustrado na Figura IV.35, onde podem ser observadas tendências distintas (e mesmo conflitantes) para a CECFD dependendo da temperatura considerada. As tendências representadas pelas médias, com o aumento do pH, parecem ser: a 25 °C uma diminuição, a 35 °C uma oscilação e virtual invariabilidade, e a 45 °C um aumento na CECFD.

Considerar os intervalos de confiança, apresentados na Tabela IV.18, também não contribui para esclarecer a situação. Foram estudadas 8 combinações T/NaCl e a tendência observada com o aumento de pH é em 2 delas (25 °C / zero NaCl e 25 °C / 0,5 M NaCl) a diminuição, em 3 (35 °C / zero NaCl, 35 °C / 0,5 M NaCl e 45 °C / zero NaCl) a invariabilidade, e em 1 (45 °C / 0,5 M NaCl) o aumento da CECFD. Estas tendências resultam de diferenças pequenas mas são estatisticamente significativas.

Por outro lado observe-se que, em cada condição T/NaCl, a variação de pH corresponde uma variação muito pequena e por vezes oscilante na CECFD. Mais ainda, ao se considerar a média das três temperaturas, a variação de pH resulta em CECFD virtualmente idênticos (numérica e estatisticamente), tanto a zero como a 0,5 M de NaCl adicionado. Assim sendo, na tentativa de definir uma tendência global e tendo em vista as pequenas diferenças observadas, uma conclusão poderia ser a da ausência de um efeito do pH. Entretanto, a significância estatística da interação entre temperatura e o pH, que indica que o efeito de uma variável depende do nível da outra, não suporta este tipo de conclusão.

Não há portanto como definir, a partir desta análise estatística, uma tendência clara e única da evolução da CECFD com a variação do pH da solução de quilaia. O efeito do pH é pequeno mas estatisticamente significativo, e sua ação parece depender do nível de temperatura. Os dados sugerem que ao aumento do pH podem corresponder várias tendências da CECFD: uma diminuição a 25 °C, uma invariabilidade a 35 °C e um aumento a 45 °C. Assim sendo, em termos do processo de solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia, o aumento do pH favorece o processo a 25 °C, não o afeta a 35 °C e o desfavorece a 45 °C. Observe-se que as diferenças observadas, quando existentes, são geralmente pequenas.

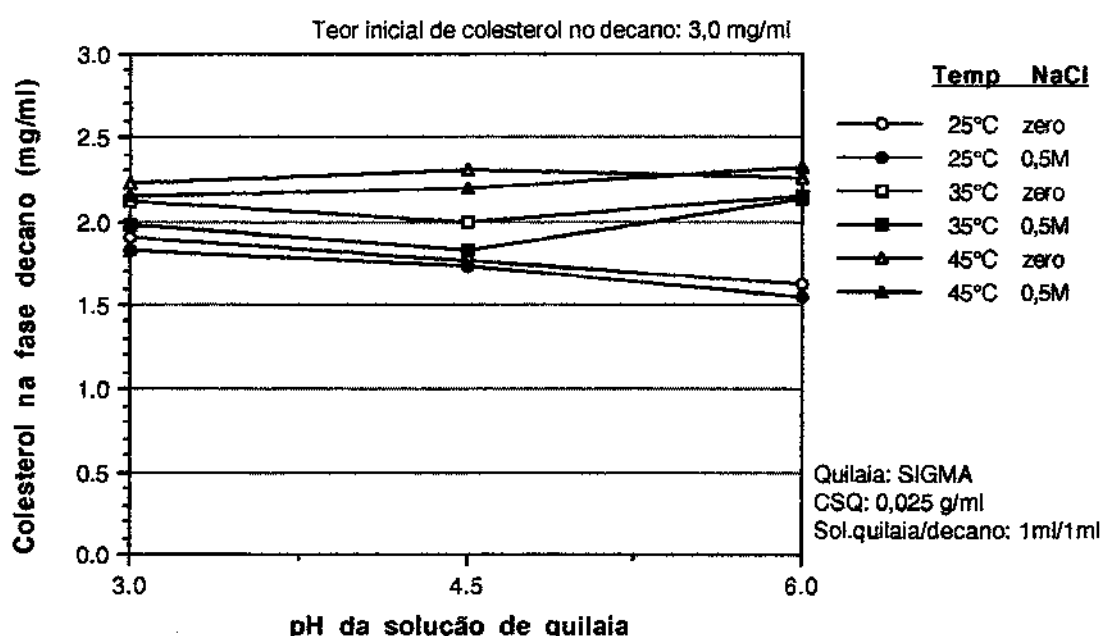


FIGURA IV.35. Efeito do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA.

TABELA IV.18. Efeito do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento | | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------------|----------|-----|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura (°C) | NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 25 | zero | 3,0 | 6 | 1,90 | 1,83 | 1,96 |
| | | 4,5 | 6 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | | 6,0 | 6 | 1,63 | 1,55 | 1,70 |
| | 0,5 | 3,0 | 6 | 1,82 | 1,77 | 1,87 |
| | | 4,5 | 6 | 1,74 | 1,71 | 1,76 |
| | | 6,0 | 6 | 1,54 | 1,50 | 1,58 |
| 35 | zero | 3,0 | 6 | 2,12 | 2,08 | 2,16 |
| | | 4,5 | 6 | 2,00 | 1,94 | 2,06 |
| | | 6,0 | 6 | 2,14 | 1,96 | 2,33 |
| | 0,5 | 3,0 | 6 | 1,98 | 1,95 | 2,01 |
| | | 4,5 | 6 | 1,82 | 1,79 | 1,85 |
| | | 6,0 | 6 | 2,13 | 1,87 | 2,38 |
| 45 | zero | 3,0 | 6 | 2,22 | 2,16 | 2,28 |
| | | 4,5 | 6 | 2,31 | 2,27 | 2,35 |
| | | 6,0 | 6 | 2,26 | 2,21 | 2,32 |
| | 0,5 | 3,0 | 6 | 2,15 | 2,10 | 2,20 |
| | | 4,5 | 6 | 2,19 | 2,17 | 2,21 |
| | | 6,0 | 6 | 2,32 | 2,28 | 2,35 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

- Efeito da adição de NaCl na solubilização

O efeito da adição de NaCl em todas as condições T/pH é apresentado na Figura IV.36 e, de maneira geral, observa-se uma pequena redução da CECFD com a adição de NaCl. Assim sendo, observa-se que o processo de solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia é favorecido com a adição de NaCl. Observe-se, entretanto, que as diferenças observadas são geralmente bastante pequenas.

A Tabela IV.19 apresenta os intervalos com 95% de confiança que indicam que, em algumas situações, a tendência evidenciada pelas médias não é estatisticamente significativa; entretanto, quando tais diferenças são significativas, a adição de NaCl sempre resulta numa menor CECFD. Assim sendo, o efeito global da adição de NaCl parece ser o de uma pequena diminuição da CECFD.

- Análise comparativa global da extensão dos efeitos das variáveis

Para uma análise comparativa global da extensão dos efeitos das variáveis temperatura, pH e adição de NaCl, considerem-se as Figuras IV.37 a IV.40.

Nas Figuras IV.37 a IV.39 o efeito principal de cada variável (temperatura, pH e adição de NaCl, respectivamente) é apresentado. Para tanto, calcularam-se os valores médios e intervalos com 95% de confiança da CECFD correspondentes à ação de cada variável individualmente, sem considerar a existência e eventual contribuição das outras duas. Este procedimento simplificado pode gerar algumas distorções na interpretação do efeito das variáveis mas, neste caso, é útil para ilustrar a importância relativa delas como indutoras da variação da CECFD.

O efeito da concentração da solução de quilaia é apresentado na Figura IV.40, construída a partir dos resultados dos ensaios para obtenção do tempo de equilíbrio. Nesta figura, a concentração de quilaia zero corresponde o teor inicial de colesterol no decano, uma vez que o colesterol é virtualmente insolúvel em água, nas condições empregadas nestes ensaios.

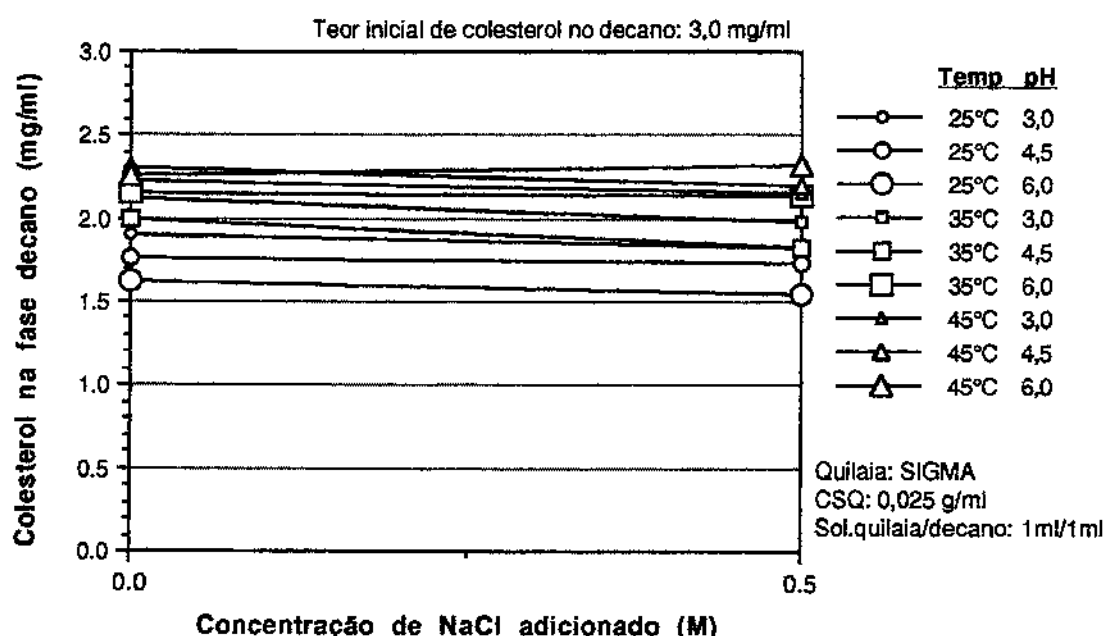


FIGURA IV.36. Efeito da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA.

TABELA IV.19. Efeito da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA: comparação das médias dos tratamentos.

| Tratamento | | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------------|-----|----------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura (°C) | pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 25 | 3,0 | zero | 6 | 1,90 | 1,83 | 1,96 |
| | | 0,5 | 6 | 1,82 | 1,77 | 1,87 |
| | 4,5 | zero | 6 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | | 0,5 | 6 | 1,74 | 1,71 | 1,76 |
| | 6,0 | zero | 6 | 1,63 | 1,55 | 1,70 |
| | | 0,5 | 6 | 1,54 | 1,50 | 1,58 |
| 35 | 3,0 | zero | 6 | 2,12 | 2,08 | 2,16 |
| | | 0,5 | 6 | 1,98 | 1,95 | 2,01 |
| | 4,5 | zero | 6 | 2,00 | 1,94 | 2,06 |
| | | 0,5 | 6 | 1,82 | 1,79 | 1,85 |
| | 6,0 | zero | 6 | 2,14 | 1,96 | 2,33 |
| | | 0,5 | 6 | 2,13 | 1,87 | 2,38 |
| 45 | 3,0 | zero | 6 | 2,22 | 2,16 | 2,28 |
| | | 0,5 | 6 | 2,15 | 2,10 | 2,20 |
| | 4,5 | zero | 6 | 2,31 | 2,27 | 2,35 |
| | | 0,5 | 6 | 2,19 | 2,17 | 2,21 |
| | 6,0 | zero | 6 | 2,26 | 2,21 | 2,32 |
| | | 0,5 | 6 | 2,32 | 2,28 | 2,35 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

Note-se que, para permitir uma comparação, a ordenada nestas 4 figuras é a mesma: a CECFD (média e intervalo com 95% de confiança), com o valor de 3,0 mg/ml correspondendo ao teor inicial aproximado de colesterol no decano (ou seja, o teor antes do contato com a solução de quilaia) em todos os casos.

A análise das figuras sugere que:

1º) a CECFD resultante do contato com soluções aquosas de quilaia apresenta correlação direta com a temperatura, correlações inversas com o NaCl e com a concentração de quilaia em solução, e uma oscilação e virtual ausência de correlação com o pH.

2º) nas faixas estudadas, as variações da CECFD correspondentes a variações da concentração da solução de quilaia são muito maiores que aquelas eventualmente observadas e decorrentes de variações dos demais parâmetros (temperatura, pH ou adição de NaCl).

3º) nas faixas estudadas, as variações da CECFD correspondentes a variações de temperatura são muito maiores que aquelas eventualmente presentes e correspondentes a variações de pH ou à adição de NaCl. Em outras palavras, comparativamente ao pH e à adição de NaCl, a temperatura apresenta o maior efeito.

• Distribuição de colesterol no sistema bifásico

Há uma observação experimental interessante referente ao sistema bifásico resultante do contato solução de colesterol em decano/solução aquosa de quilaia. Neste sistema, além das fases decano e aquosa, observa-se claramente na região intermediária entre elas uma camada fina de textura cremosa e coloração branca análoga a uma emulsão. Entretanto, a quantidade desta terceira "fase", comparativamente às fases decano e aquosa correspondentes, numa avaliação visual, é muito pequena. Este fato não foi detectado com tanta clareza quando da utilização de óleo de manteiga e extratos comerciais de quilaia, uma vez que a visualização de interfaces e eventual separação de fases é bastante dificultada pela coloração escura da solução aquosa e opacidade do óleo de manteiga.

Aproveitando a melhor visibilidade encontrada no sistema modelo, procurou-se verificar a distribuição de colesterol neste sistema, buscando definir se o colesterol se encontra efetivamente e em quantidades substanciais no seio da fase aquosa e,

também, se há uma eventual acumulação na região intermediária. Ressalte-se que não foi observada a formação de precipitados neste sistema.

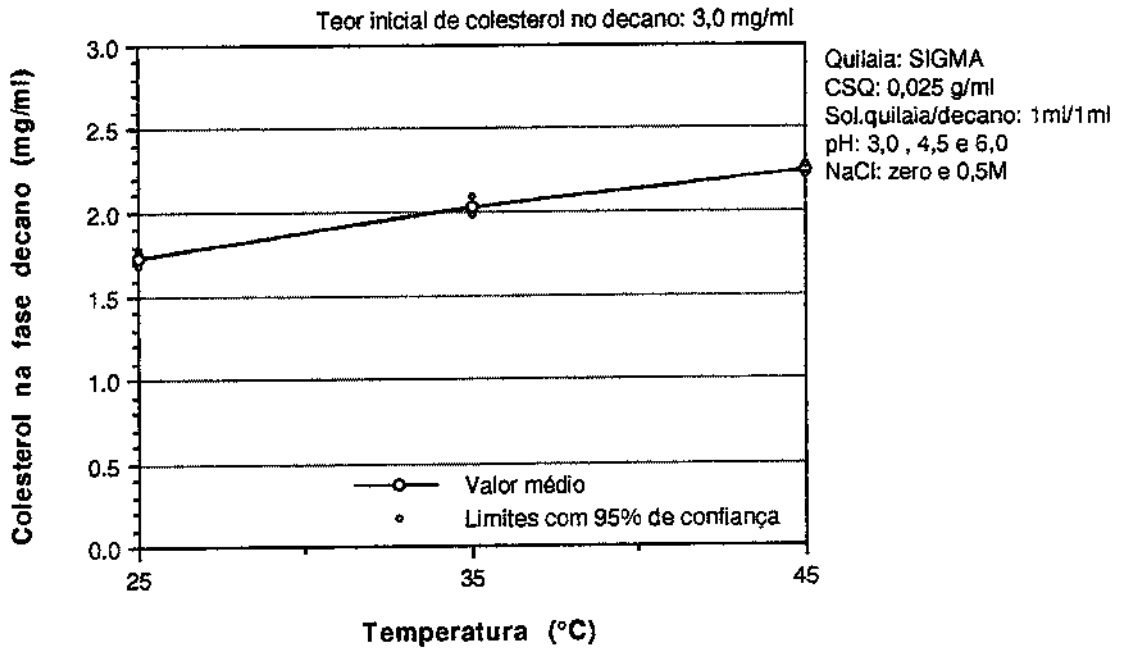
Para tanto foi aproveitado o conteúdo dos frascos resultantes dos 6 tratamentos pH/NaCl realizados a 45 °C. Em cada tratamento havia 3 frascos cujo conteúdo foi combinado e colocado em funil de separação, até uma separação visualmente razoável de fases. Foram então coletadas as amostras da fase aquosa, da camada intermediária branca e da fase decano para cada um dos tratamentos pH/NaCl.

Procedeu-se então a solubilização das amostras em etanol absoluto, na proporção de 0,5 ml de amostra para 5 ml de etanol, injetando-se diretamente estas soluções no cromatógrafo. Para efeito da quantificação do teor de colesterol nas amostras, utilizou-se como padrão uma solução preparada pela adição de 0,5 ml de uma solução contendo 3,0 mg/ml de colesterol em decano a 5 ml de etanol absoluto.

Os resultados, apresentados na Figura IV.41, indicam que há efetivamente uma concentração substancial de colesterol no seio da fase aquosa (média global de 0,62 mg/ml). As concentrações de colesterol nas camadas intermediárias e fases decano correspondentes são próximas: as eventuais diferenças das médias não são significativas, como demonstrado pelos intervalos de confiança estatística.

Estes resultados indicam que não há acumulação de colesterol na camada intermediária, sugerindo que trata-se de uma emulsão rica na fase decano.

Balanços de massa foram realizados para cada tratamento, assumindo a imiscibilidade das fases decano e aquosa, e os resultados são apresentados na Figura IV.42. Observe-se que os índices de recuperação do total de colesterol introduzido no sistema (com a solução a 3,0 mg/ml em decano) a partir dos teores determinados nas fases decano e aquosa são razoáveis (média global de 89 %), particularmente se consideradas as dificuldades de amostragem e outros erros experimentais.

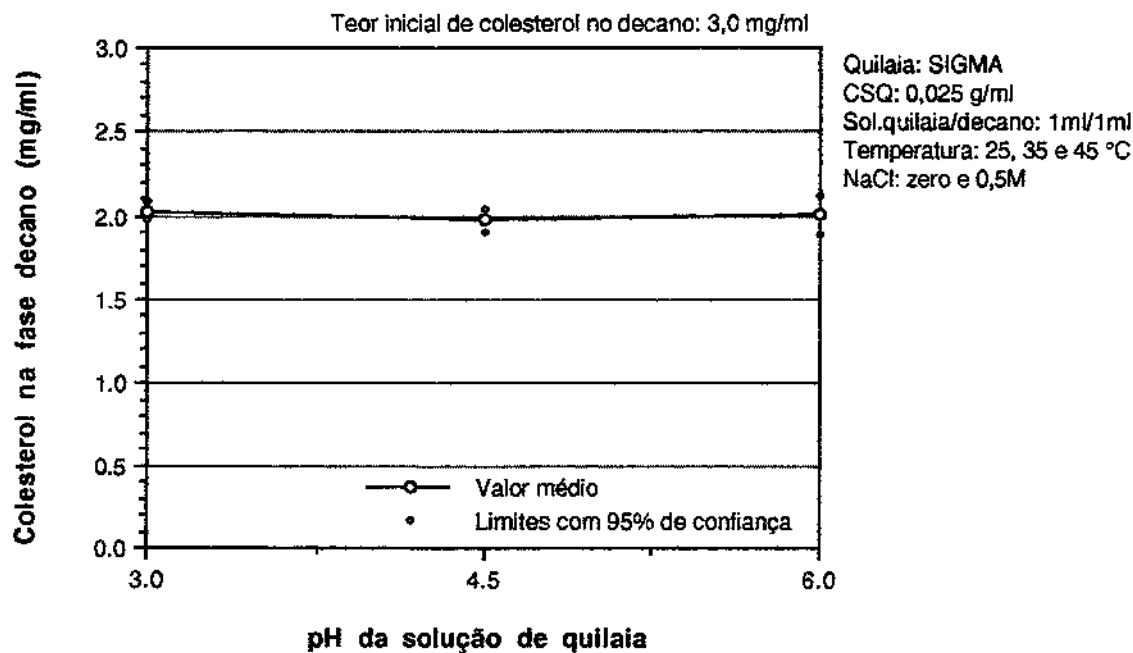


Comparação das médias dos tratamentos

| Temperatura (°C) | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 25 | 36 | 1,73 | 1,69 | 1,78 |
| 35 | 36 | 2,03 | 1,98 | 2,09 |
| 45 | 36 | 2,24 | 2,22 | 2,27 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA IV.37. Efeito principal da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA.

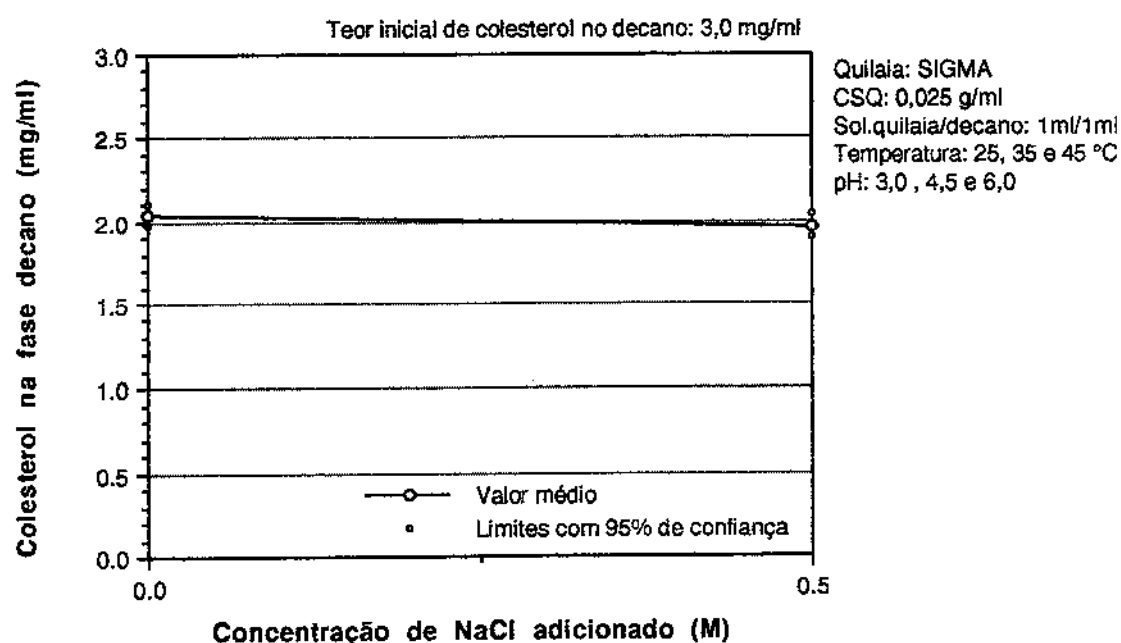


Comparação das médias dos tratamentos

| pH | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|-----|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 36 | 2,03 | 1,98 | 2,08 |
| 4,5 | 36 | 1,97 | 1,90 | 2,05 |
| 6,0 | 36 | 2,00 | 1,89 | 2,12 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA IV.38. Efeito principal do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA.

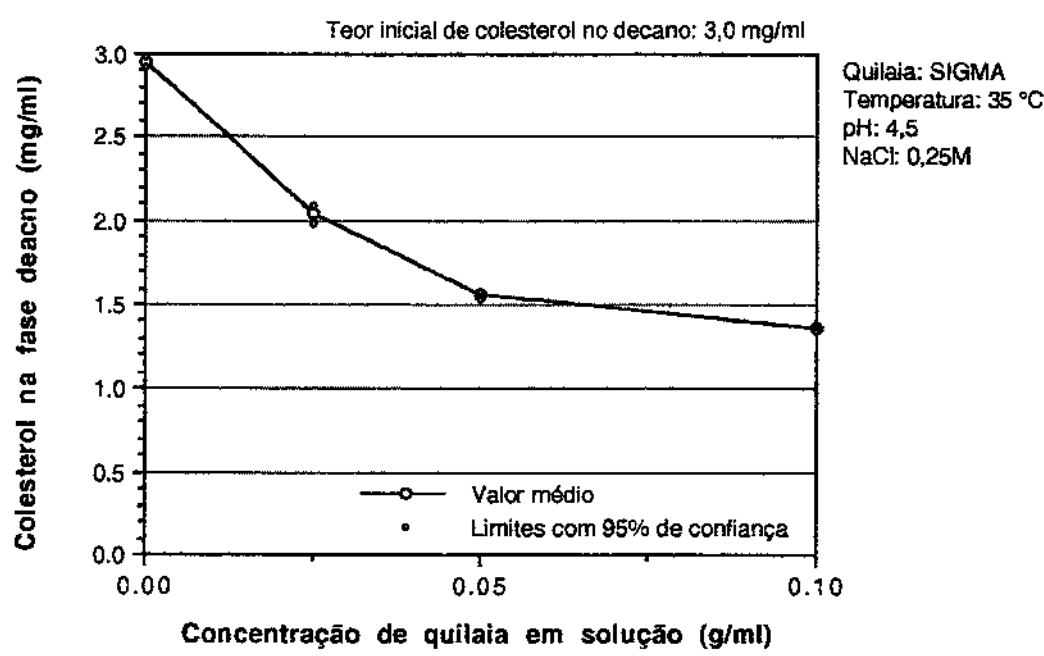


Comparação das médias dos tratamentos

| NaCl (M) | N ^a | Coolesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|----------|----------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 54 | 2,04 | 1,98 | 2,10 |
| 0,5 | 54 | 1,97 | 1,90 | 2,03 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA IV.39. Efeito principal da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas da quilaia SIGMA.

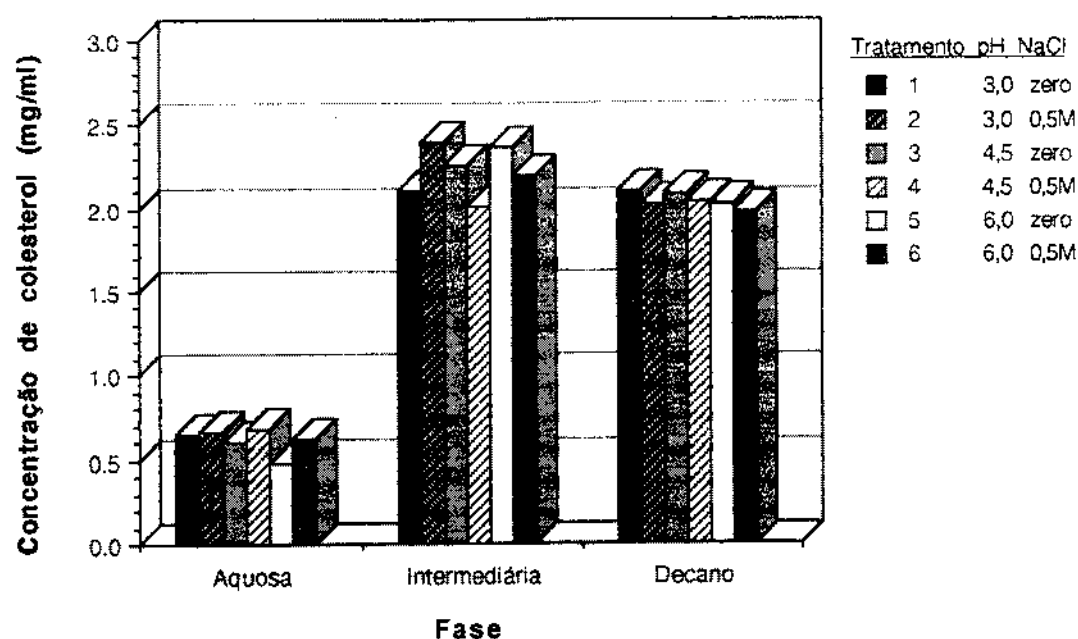


Comparação das médias dos tratamentos

| Concentração de quilaia (g/ml) | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|--------------------------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 5 | 2,96 | 2,93 | 2,99 |
| 0,025 | 3 | 2,03 | 1,98 | 2,09 |
| 0,05 | 3 | 1,56 | 1,53 | 1,58 |
| 0,10 | 3 | 1,36 | 1,34 | 1,37 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA IV.40. Efeito principal da concentração de quilaia SIGMA em solução aquosa na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato.

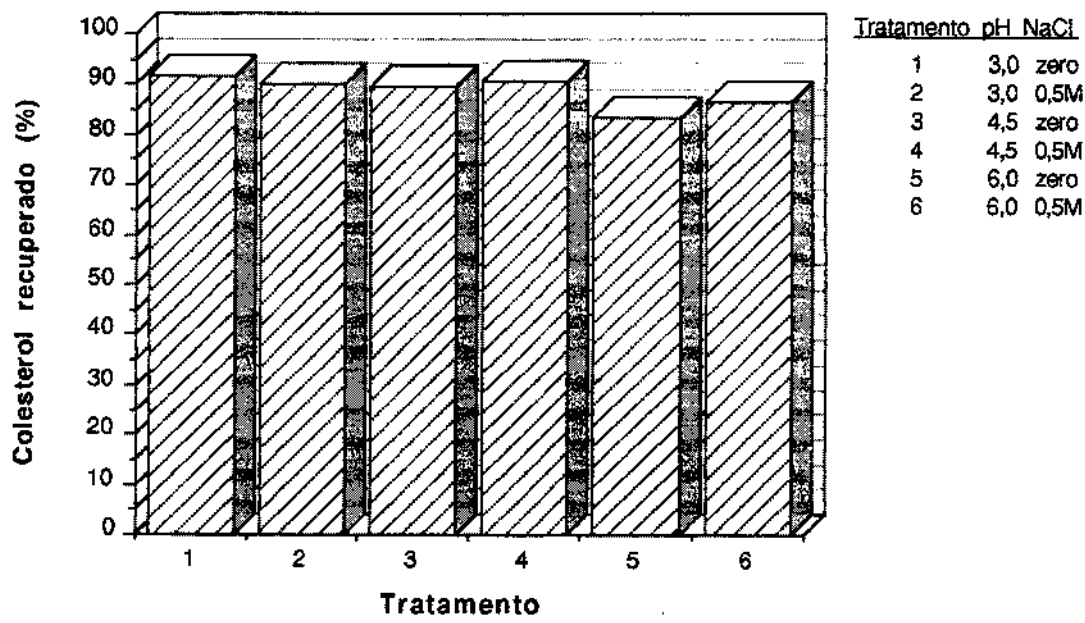


Comparação das médias

| Tratamento | Fase | N ^a | Concentração de colesterol (mg/ml) | | |
|------------|---------------|----------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 1 | Aquosa | 3 | 0,65 | 0,55 | 0,75 |
| | Intermediária | 3 | 2,10 | 1,91 | 2,29 |
| | Decano | 3 | 2,11 | 2,03 | 2,19 |
| 2 | Aquosa | 3 | 0,67 | 0,63 | 0,71 |
| | Intermediária | 3 | 2,40 | 2,24 | 2,56 |
| | Decano | 3 | 2,03 | 1,87 | 2,19 |
| 3 | Aquosa | 3 | 0,61 | 0,51 | 0,70 |
| | Intermediária | 3 | 2,25 | 2,09 | 2,41 |
| | Decano | 3 | 2,08 | 2,02 | 2,15 |
| 4 | Aquosa | 3 | 0,68 | 0,60 | 0,77 |
| | Intermediária | 3 | 2,01 | 1,94 | 2,08 |
| | Decano | 3 | 2,03 | 1,90 | 2,17 |
| 5 | Aquosa | 3 | 0,48 | 0,44 | 0,52 |
| | Intermediária | 3 | 2,36 | 2,16 | 2,56 |
| | Decano | 3 | 2,03 | 1,89 | 2,17 |
| 6 | Aquosa | 3 | 0,62 | 0,57 | 0,68 |
| | Intermediária | 3 | 2,19 | 2,01 | 2,37 |
| | Decano | 3 | 1,97 | 1,83 | 2,11 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA IV.41. Concentrações de colesterol na fase decano, camada intermediária e fase aquosa resultantes do contato entre uma solução de colesterol em decano a 3,0 mg/ml e uma solução de quilaia SIGMA a 0,025 g/ml a 45 °C.



| Comparação das médias | | | | |
|-----------------------|----------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Tratamento | N ^a | Colesterol recuperado (%) | | |
| | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 1 | 3 | 91,8 | 86,1 | 97,5 |
| 2 | 3 | 90,1 | 83,8 | 96,3 |
| 3 | 3 | 89,6 | 87,6 | 91,6 |
| 4 | 3 | 90,7 | 85,8 | 95,5 |
| 5 | 3 | 83,6 | 78,5 | 88,7 |
| 6 | 3 | 86,5 | 81,5 | 91,5 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA IV.42. Colesterol recuperado via balanço de massa nas fases aquosa e decano, assumida sua imiscibilidade, em relação ao efetivamente presente no sistema.

• Comentários finais

Os resultados sugerem que no sistema bifásico decano/solução aquosa de quilaia, a CECFD se reduz significativa e substancialmente com o aumento da concentração de quilaia em solução, que exerce o maior efeito dentre as variáveis consideradas. Uma redução também significativa e importante, ainda que em menor escala, ocorre com a diminuição da temperatura. A adição de NaCl promove a remoção de colesterol, muito embora este efeito seja bastante pequeno. A variação do pH parece também produzir um efeito pequeno mas significativo; entretanto, não se pode definir uma tendência clara e única da evolução da CECFD com o pH, uma vez que as tendências se mostraram dependentes do nível de temperatura considerado.

No sistema modelo, além das fases decano e aquosa, se observa claramente na região intermediária entre elas uma camada fina de textura cremosa que os resultados sugerem ser uma emulsão rica na fase decano. Análises indicaram que o colesterol removido da fase decano se encontra efetivamente no seio da fase aquosa, não havendo acumulação seletiva na região intermediária entre elas.

Empregando soluções de quilaia à concentração de 0,025 g/ml e variando a temperatura, pH e nível de adição de NaCl, foram obtidas concentrações de colesterol solubilizado na fase aquosa variando na faixa de 0,68 a 1,46 mg/ml; aumentando a CSQ para 0,10 g/ml (a 35 °C, pH de 4,5 e 0,25 M de NaCl adicionado) obteve-se 1,60 mg colesterol/ml de fase aquosa. Considerada a virtual insolubilidade do colesterol em água, demonstrada por uma solubilidade aparente em água a 37 °C de no máximo 1,64 µg/ml (BRUCKDORFER & SHERRY, 1984), os valores obtidos são muito expressivos.

2.4. Correlação entre os fenômenos de formação de micelas e remoção de colesterol pelo contato com soluções aquosas de quilaia

O mecanismo proposto por SUNDFELD (1992) e SUNDFELD *et al.* (1993 a, 1993 b) para justificar a redução observada do teor de colesterol do óleo de manteiga quando colocado em contato com soluções aquosas de quilaia, foi a solubilização do colesterol em micelas de saponinas presentes na fase aquosa.

A estratégia seguida para reunir evidências do envolvimento de micelas na separação foi baseada na correlação dos fenômenos de formação de micela e de remoção de colesterol, utilizando as soluções de colesterol em decano como modelo para o óleo de manteiga. Esta tentativa de correlação foi desenvolvida em 2 frentes distintas, cujos resultados são apresentados a seguir.

- Análise comparativa das tendências da concentração de micela crítica (CMC) da quilaia e das concentrações de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) com a variação de temperatura, pH e adição de NaCl

Nesta primeira abordagem, buscou-se verificar se a concentração de micela crítica (CMC) da quilaia e as concentrações de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) seguiam, com a variação de temperatura, pH e adição de NaCl, tendências compatíveis com o mecanismo proposto. Nesta comparação foi considerada a seguinte regra geral: a concentrações fixas de surfatante, situações que desfavorecem a formação de micelas (contribuindo para o aumento da CMC) também desfavorecem a solubilização de solutos em micelas (contribuindo, no caso presente, para o aumento da CECFD).

Os resultados permitem uma constatação inicial: os efeitos da temperatura, do pH e da adição de NaCl são muito mais pronunciados na CMC que na CECFD. A faixa de variação (valores mínimo e máximo) observada nos experimentos foi de $7,6 \times 10^{-5}$ a $1,8 \times 10^{-3}$ g/ml para a CMC e de 1,54 a 2,32 mg/ml para a CECFD. Assim, enquanto que o maior valor observado da CMC é 24 vezes o menor, para a CECFD esta relação é de apenas 1,5 vezes.

Quanto ao efeito da temperatura, as tendências da CMC e CECFD são estatisticamente as mesmas em duas das seis condições pH/NaCl estudadas, quando ambas aumentaram com o aumento da temperatura. Não foram observadas tendências opostas da CMC e da CECFD com a variação de temperatura em nenhuma das condições pH/NaCl estudadas. O efeito do aumento da temperatura

aumentando a CMC foi estatisticamente significativo somente em duas situações (a pH 6,0), enquanto que para a CECFD foi significativo em todas as situações de pH/NaCl estudadas. Em geral, o efeito da temperatura foi mais relevante na CECFD que na CMC. Em uma análise global, o efeito do aumento da temperatura, quando significativo, concorre para aumentos tanto da CMC quanto da CECFD.

Quanto ao efeito do pH, as tendências da CMC e CECFD são estatisticamente as mesmas em apenas uma das seis condições T/NaCl estudadas, quando ambas aumentaram com o aumento do pH. Foram observadas tendências opostas da CMC e da CECFD com a variação do pH em duas condições T/NaCl. O efeito do aumento do pH aumentando a CMC foi estatisticamente significativo em todas as condições T/NaCl estudadas. O efeito do aumento do pH aumentando a CECFD foi significativo em uma das seis condições T/NaCl estudadas, observando-se também diminuição e invariabilidade em duas e três delas, respectivamente. Em geral, o efeito do pH foi mais relevante na CMC que na CECFD. Assim, não há tendência única em uma análise global: há coincidência de tendências a 45 °C (quando tanto a CMC quanto a CECFD aumentam com o aumento de pH) e, nas demais temperaturas, os resultados indicam que, associado ao aumento de pH, há um aumento da CMC que pode corresponder tanto a uma invariância (a 35 °C) como a uma diminuição (a 25 °C) da CECFD.

Quanto ao efeito da adição de NaCl, as tendências de diminuição da CMC e CECFD são estatisticamente as mesmas em duas das nove condições T/pH estudadas; em duas outras a CMC e a CECFD não variaram com a adição de NaCl. Não foram observadas tendências opostas da CMC e da CECFD com a adição de NaCl em nenhuma das condições T/pH estudadas. O efeito da adição de NaCl diminuindo a CMC foi significativo em seis das nove condições T/pH estudadas, enquanto que para a CECFD foi significativo em três. Em geral, o efeito da adição de NaCl foi mais relevante na CMC que na CECFD. Em uma análise global, o efeito da adição de NaCl, quando significativo, concorre para diminuição tanto da CMC quanto da CECFD.

A análise anterior demonstra a existência de similaridade parcial nas tendências da CMC e na CECFD com a variação dos parâmetros estudados. As Figuras IV.43 a IV.45 ilustram casos de coincidência das tendências da CMC e da CECFD.

Em uma análise global, os efeitos da diminuição da temperatura e da adição de NaCl, quando significativos, concorrem para diminuição da CMC e da CECFD. O efeito do pH na CMC e na CECFD mostrou coincidência de tendências a 45 °C, e tendências opostas a 25 °C.

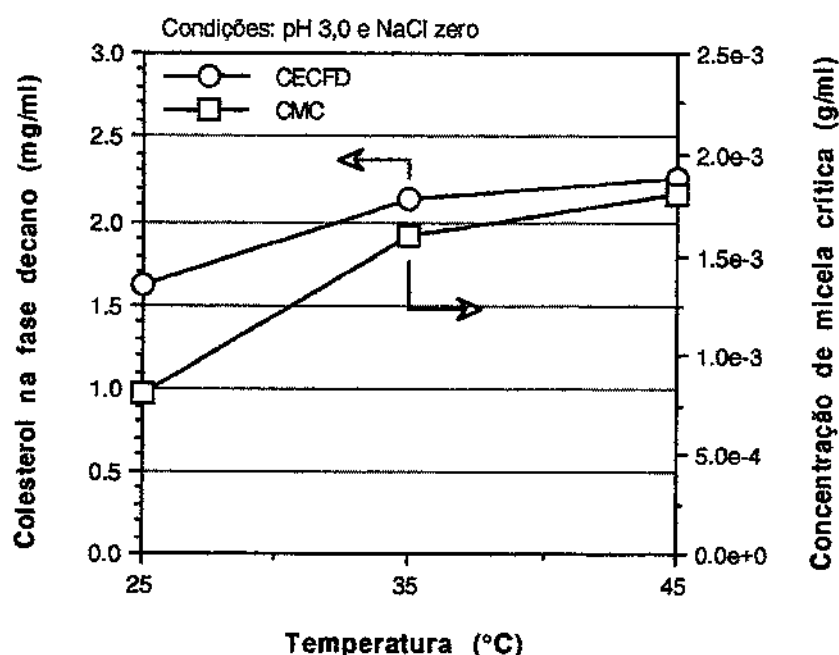


FIGURA IV.43. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) e da concentração de micela crítica (CMC) com a temperatura a pH 3,0 e sem adição de NaCl.

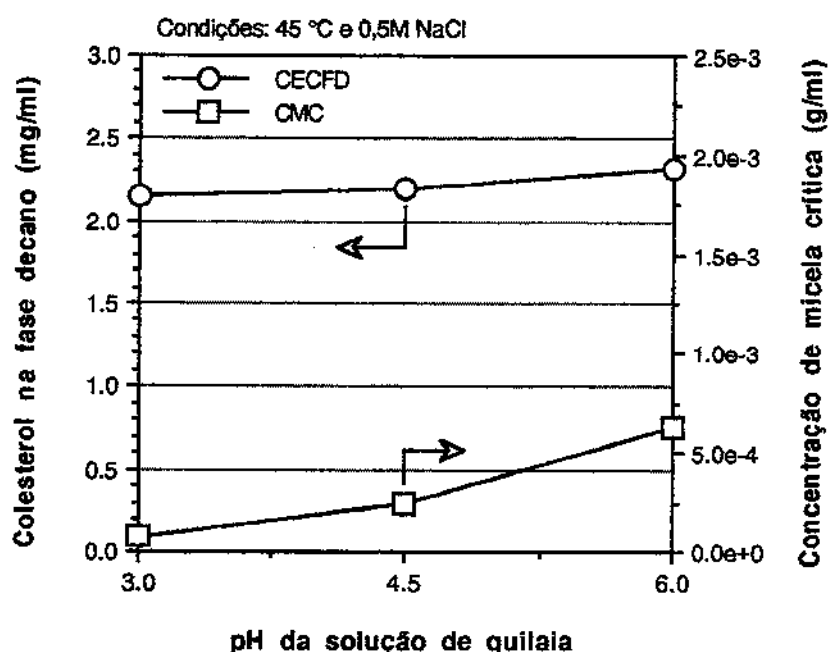


FIGURA IV.44. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) e da concentração de micela crítica (CMC) com o pH a 45 °C e 0,5M de NaCl adicionado.

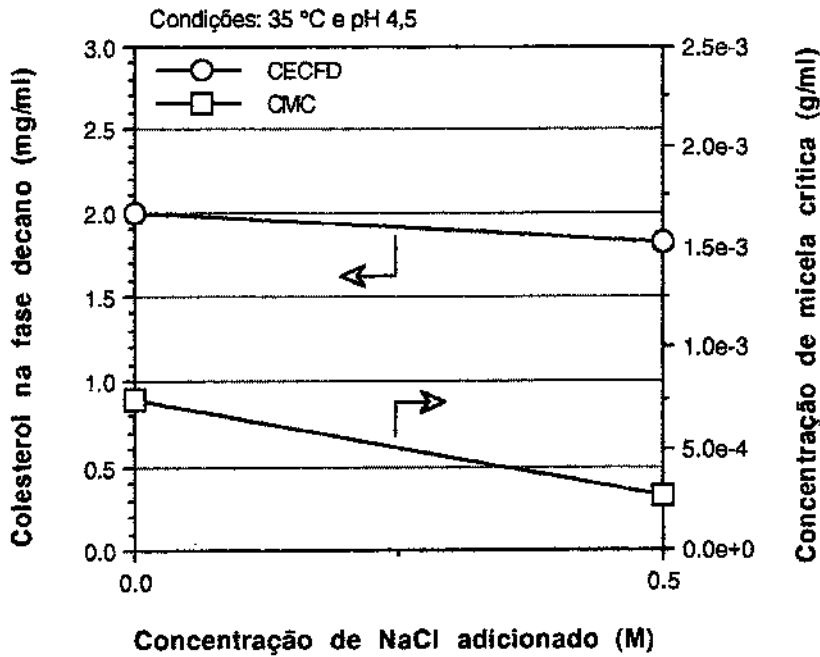


FIGURA IV.45. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) e da concentração de micela crítica (CMC) com a adição de NaCl a 35 °C e pH 4,5.

Concluindo, os resultados apresentados indicam a existência de similaridade entre as tendências globais da CMC e da CECFD com a variação de temperatura e adição de NaCl, e similaridade apenas parcial com a variação de pH. Assim, atendem apenas parcialmente a regra geral de que, a concentrações fixas de surfatante, situações que favorecem a formação de micelas (contribuindo para a diminuição da CMC) também favorecem a solubilização de solutos em micelas (contribuindo para a diminuição da CECFD). Portanto, se a regra geral se aplica ao sistema em estudo, os resultados não sugerem o mecanismo proposto como único operante. A evolução da CMC e da CECFD com a temperatura, pH e adição de NaCl suportam a hipótese de que micelas estejam envolvidas na solubilização em algumas condições experimentais enquanto que, em outras, abrem a possibilidade de participação de outros mecanismos (que não solubilização em micelas) na remoção de colesterol observada.

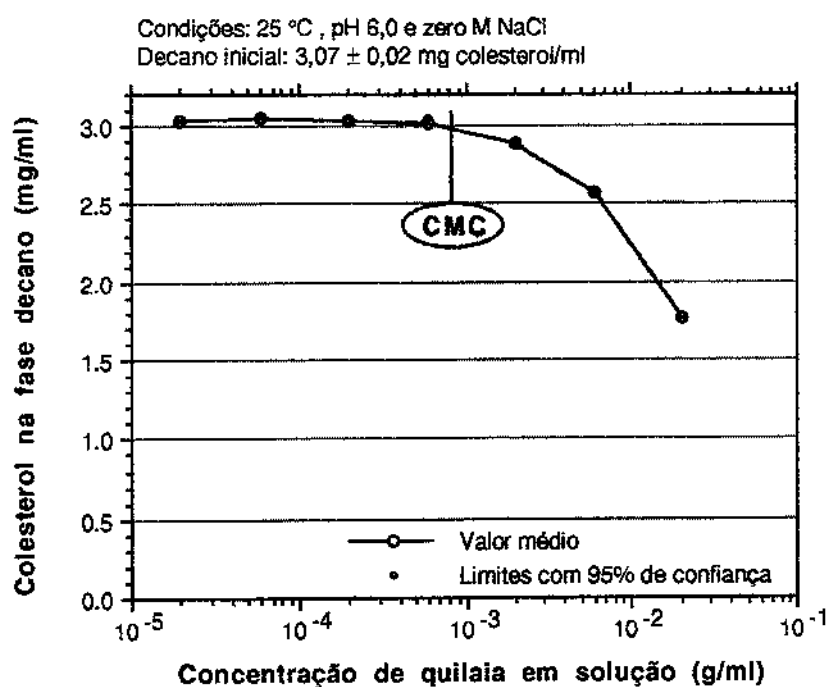
- Ocorrência de separação de colesterol em contato com soluções aquosas de quilaia abaixo da CMC

Nesta segunda estratégia para reunir evidências do envolvimento de micelas na separação, considerou-se que a solubilização em micelas pressupõe sua existência física em solução, o que só ocorre acima da CMC. Assim, a observação de qualquer redução do teor de colesterol em contato com soluções de quilaia abaixo da CMC, constituiria uma evidência para rejeição do mecanismo proposto.

É relevante lembrar que o procedimento empregado constitui um método clássico para determinação da CMC de agentes tensoativos. Neste método determina-se a evolução da concentração de um soluto orgânico (que deve ser insolúvel ou muito pouco solúvel em água) solubilizado numa série de soluções aquosas contendo concentrações crescentes de tensoativo. Abaixo da CMC a concentração deste soluto deve ser zero (ou aquela representada pela sua baixa solubilidade em água) e, acima da CMC, a solubilidade deve aumentar com a concentração. Num gráfico de concentração de tensoativo em solução versus solubilidade do soluto pode-se então localizar a CMC como a concentração de tensoativo correspondente à descontinuidade da curva.

Os resultados da evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano (CECFD) com a concentração de quilaia em solução são apresentados na Figura IV.46.

Nesta figura pode-se verificar que, relativamente ao teor inicial de colesterol na solução em decano, não há redução na CECFD nas concentrações de quilaia em solução abaixo da CMC. Acima da CMC, ocorre uma diminuição progressiva da CECFD com o aumento da concentração de quilaia em solução. Estas observações tem validade estatística garantida pelos intervalos com 95% de confiança. À luz destes resultados, não se pode rejeitar a hipótese de que micelas estejam envolvidas na solubilização de colesterol em meio aquoso, nas condições experimentais empregadas.



Comparação das médias

| Concentração de quilaia (g/ml) | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|--------------------------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 2,0 E-02 | 6 | 1,77 | 1,76 | 1,79 |
| 6,0 E-03 | 6 | 2,58 | 2,57 | 2,59 |
| 2,0 E-03 | 6 | 2,89 | 2,88 | 2,91 |
| 6,0 E-04 | 6 | 3,03 | 3,00 | 3,05 |
| 2,0 E-04 | 6 | 3,04 | 3,03 | 3,06 |
| 6,0 E-05 | 6 | 3,04 | 3,03 | 3,06 |
| 2,0 E-05 | 6 | 3,04 | 3,02 | 3,06 |
| Decano inicial | 6 | 3,07 | 3,05 | 3,09 |

^a número de observações ; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA IV.46. Evolução da concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano com a variação da concentração de soluções aquosas de quilaia SIGMA a 25 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl.

• Considerações finais

Os resultados apresentados indicam a existência de similaridade apenas parcial entre as tendências da CMC e da CECFD, com a variação de temperatura, pH, e adição de NaCl. Embora em várias condições experimentais estudadas as variações indutoras de diminuições da CMC tenham resultado em aumentos da solubilização de colesterol no meio aquoso, em outras observaram-se diminuições ou mesmo invariância. Portanto, se a regra geral se aplica ao sistema em estudo, os resultados não sugerem a solubilização em micelas como única possibilidade de mecanismo operante. A evolução da CMC e da CECFD com a variação dos parâmetros estudados suportam a hipótese de que micelas estejam envolvidas na solubilização em algumas condições experimentais enquanto que, em outras, abrem a possibilidade de participação de outros mecanismos (que não solubilização em micelas) na remoção de colesterol observada.

Por outro lado, verificou-se que o início da solubilização de colesterol em meio aquoso coincide com a CMC, não ocorrendo redução na CECFD em contato com soluções de quilaia abaixo da CMC. À luz destes resultados, não se pode rejeitar a hipótese de que micelas estejam envolvidas na solubilização de colesterol em meio aquoso, nas condições experimentais empregadas (25 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl).

Entretanto, não foram obtidas evidências diretas do envolvimento de micelas na solubilização de colesterol no meio aquoso, nas variadas situações de composição global (proporção água - decano - quilaia - colesterol) e condições de temperatura, pH e nível de adição de NaCl empregadas nos ensaios.

No presente trabalho, em todas as situações estudadas, observou-se a partição de colesterol, a partir de soluções em decano, nas soluções aquosas de quilaia. A solubilização de colesterol na fase aquosa mostrou-se susceptível a variações dos parâmetros estudados (pH, temperatura, concentração da solução de quilaia e nível de adição de NaCl). A concentração da solução de quilaia apresentou o efeito mais pronunciado nos níveis de solubilização observados, seguindo-se o efeito da temperatura; a adição de NaCl e o pH produziram efeitos bastante pequenos ou nulos, nas faixas estudadas. Embora o mecanismo particular de solubilização em micelas represente uma das possibilidades, há outras, e mecanismos mais gerais de separação envolvendo estruturas coloidais podem ser propostos. Há numerosos relatos na literatura de que fatores tais como a concentração do tensoativo e temperatura impactam significativamente a composição de fases em equilíbrio

descritas no diagrama de fases de sistemas similares. Ao se considerar tais diagramas, surgem possibilidades concretas de que: 1) a composição global do sistema envolva outras estruturas (que não micelas) e mesmo a coexistência de mais de uma estrutura coloidal (micelas e/ou vários tipos de cristais líquidos) no meio aquoso, que resultem em igual nível de solubilização de colesterol, e 2) variações dos parâmetros estudados (concentração de quilaia, temperatura, pH e nível de adição de NaCl) que resultem nos mesmos efeitos na solubilização de colesterol, mas que envolvam outras fases (que não exclusivamente as micelas). Assim, alternativas de solubilização associadas a outras estruturas coloidais (que não micelas), inclusive com a participação de outros componentes dos extratos (ex.: taninos), constituem situações perfeitamente possíveis a serem consideradas.

Concluindo, a definição do conjunto de possibilidades efetivamente envolvidas (em termos do teor de colesterol solubilizado e das estruturas presentes - micelas, cristais líquidos, entre outros) poderá ser feita através da construção do diagrama de fases do sistema água - decano - quilaia - colesterol. Embora micelas contendo colesterol solubilizado constituam uma das possíveis fases presentes, situações bem mais complexas de coexistência de fases (diferentes estruturas com teores distintos de colesterol) podem estar envolvidas no meio aquoso.

V. CONCLUSÕES

Dos estudos de caráter eminentemente tecnológico, de avaliação das opções de processo de separação (LL e SLL) e do efeito de variáveis nos níveis de remoção de colesterol, utilizando extratos de quilaia em pó e óleo de manteiga comercialmente disponíveis, conclui-se que:

- O nível de remoção de colesterol promovido pelo processo SLL não foi significativamente afetado pela temperatura. Nas faixas estudadas, níveis crescentes de remoção de colesterol foram obtidos com a diminuição do pH e com o aumento tanto da concentração da solução de quilaia (CSQ) quanto da quantidade de terra diatomácea (QTD).
- No processo SLL existe uma perda potencial do produto final (óleo com teor reduzido de colesterol) devido à sua oclusão na torta, uma perda que aumenta com o aumento da QTD empregada.
- Balanços de massa estimativos aplicados ao processo SLL indicaram que ocorre uma distribuição de colesterol entre todas as três fases (oleosa, aquosa e sólida) em contato, resultando uma fase oleosa com teor de colesterol menor que o observado no óleo de manteiga inicial.
- O acompanhamento da evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo nas etapas de contato líquido-líquido e sólido-líquido-líquido dos processos LL e SLL, independentemente, indicou tempos de equilíbrio de 20 e 10 minutos, respectivamente, nas condições experimentais empregadas.
- As curvas de distribuição de colesterol no equilíbrio entre as fases (oleosa, aquosa e torta) resultantes dos processos LL e SLL resultaram pouco favoráveis, obtendo-se níveis mensuráveis de redução de colesterol somente a altas CSQ's e utilizando-se óleos de manteiga contendo elevado teor inicial de colesterol.
- As curvas relacionando as concentrações de equilíbrio de colesterol entre as fases oleosa e aquosa, e entre as fases oleosa e torta, resultaram não lineares. A pequena partição de colesterol nas fases aquosa e torta resultantes dos processos LL e SLL para teores na fase oleosa abaixo de 0,70 mg/g, sugere dificuldades para redução do teor de colesterol nesta faixa de concentração, nas condições experimentais empregadas.
- O processo SLL se mostrou mais efetivo que o LL removendo, nas mesmas condições, maiores quantidades de colesterol do óleo de manteiga. Nas simulações

dos processos em múltiplo estágio de fluxo cruzado, a partir das curvas de distribuição no equilíbrio, atingiram-se, após 3 estágios, previsões de níveis de remoção de colesterol de 45 e 32%, respectivamente, para os processos SLL e LL.

- Verificou-se que, além de sua concentração em solução, a procedência da quilaia afeta significativamente os níveis de remoção de colesterol obtidos pelos processos LL e SLL. A caracterização das quilaia em pó PENCO e BELL indicou que estes extratos comerciais são misturas das saponinas com uma série de outros componentes, sendo particularmente notórias diferenças nos teores de açúcares totais, taninos e fibras. O teor de sapogeninas (e, portanto, de saponinas) da quilaia PENCO é aproximadamente o triplo do da BELL.

Dos estudos da concentração de micela crítica (CMC) de quilaia e da distribuição de colesterol entre fases no sistema bifásico modelo (solução de colesterol em decano-solução aquosa de quilaia), verificando-se o efeito de variáveis de processo na formação de micelas e remoção de colesterol, conclui-se que:

- De maneira geral, a formação de micelas em soluções aquosas de quilaia é favorecida com a redução do pH e da temperatura, e com a adição de NaCl: estas variações resultam em diminuição da CMC.
- No sistema bifásico modelo, o teor de colesterol solubilizado na fase aquosa aumenta substancialmente com o aumento da concentração de quilaia em solução, que exerce o maior efeito dentre as variáveis consideradas. Um aumento também significativo e importante, ainda que em menor escala, ocorre com a diminuição da temperatura. A adição de NaCl promove a solubilização de colesterol em meio aquoso, muito embora este efeito seja bastante pequeno. A variação do pH teve um efeito pequeno mas significativo, dependente do nível de temperatura empregado.
- No sistema bifásico modelo não foi observada a formação de nenhum precipitado e análises indicaram que o colesterol removido da fase decano se encontra efetivamente no seio da fase aquosa: obteve-se uma concentração de colesterol na fase aquosa de até 1,6 mg/ml.
- Na ausência de evidências diretas e à luz dos resultados obtidos, não se pode rejeitar a hipótese de que a solubilização em micelas seja um dos mecanismos envolvidos na separação de colesterol. Por outro lado, alternativas de solubilização associadas a outras estruturas coloidais (cristais líquidos), que poderiam ser formadas em soluções aquosas pelos compostos anfifílicos dos extratos de quilaia, devem também ser consideradas.

VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Há vários aspectos em aberto para pesquisa futura.

Não existem evidências diretas dos mecanismos operantes na separação de colesterol nos processos estudados e elas deveriam ser obtidas.

Quanto à solubilização de colesterol no meio aquoso, a definição do conjunto de possibilidades efetivamente envolvidas (em termos do teor de colesterol solubilizado e das estruturas presentes (micelas, cristais líquidos, entre outros), delimitando-se os efeitos dos parâmetros de processo no sistema) poderia ser feita através da construção de diagramas de fase do sistema água - óleo - quilaia - colesterol, nas faixas relevantes de composições globais e parâmetros de processos de interesse. Embora micelas contendo colesterol solubilizado constituam uma das possíveis fases presentes, situações bem mais complexas de coexistência de fases (diferentes estruturas com teores distintos de colesterol) podem estar envolvidas no meio aquoso. Tais informações, além do interesse científico, tem vasto alcance tecnológico. Permitiria o projeto de processos, e definição das condições mais adequadas de separação, uma vez que se poderia prever qual a proporção dos componentes individuais numa mistura que resultaria em um determinado equilíbrio de fases e nível de separação de colesterol (mantidos fixos a pressão, temperatura, força iônica e pH do sistema). Forneceria também informações imprescindíveis ao estabelecimento de sistemas de controle.

Extratos de quilaia são misturas complexas de saponinas com outros componentes das cascas. Há que se estudar mais detalhadamente a composição química destes extratos e a relação causa - efeito das variações da composição dos produtos comerciais na remoção de colesterol. As possibilidades de solubilização associadas a outros componentes da quilaia, particularmente os taninos, merecem ser consideradas em maior profundidade. Há potencial de atuação associada de taninos e saponinas, ambos anfifílicos, em estruturas coloidais (micelas, cristais líquidos) propostas como atuantes na solubilização de colesterol em meio aquoso.

As condições para eliminação de resíduos de quilaia presentes nas fases oleosas com teor reduzido de colesterol são de extrema relevância e deveriam ser estudadas, uma vez que tais resíduos podem atribuir gosto indesejável ao produto final. A recuperação do colesterol como subproduto e a reutilização da quilaia e terra diatomácea são também questões críticas relacionadas com a viabilidade econômica e ambiental do processo.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ADAMSON, A. W. **Physical chemistry of surfaces**. 5 ed. New York: John Wiley, 1990. 777 p.
- AKIYAMA, T.; TAKAGI, S.; SANKAWA, U.; INARI, S.; SAITO, H. Saponin-cholesterol interaction in the multibilayers of egg yolk lecithin as studied by deuterium nuclear magnetic resonance: digitonin and its analogues. **Biochemistry**, v.19, n.9, p.1904-1911, 1980.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 14 ed. Arlington: 1984.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15 ed. Arlington: 1990.
- APPLEBAUM, S.W.; MARCO, S.; BIRK, Y. Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. **J. Agric. Food Chem.**, n.17, p.618-622, 1969.
- ARUL, J.; BOUDREAU, A.; MAKHLOUF, J.; TARDIF, R.; GRENIER, B. Distribution of cholesterol in milk fat fractions. **J. Dairy Res.**, n.55, p.361, 1988.
- ATWAL, A.S.; HIDIROGLOU, M.; KRAMER, J.K.G.; BINNS, M.R. Effects of feeding α -tocopherol and calcium salts of fatty acids on vitamin E and fatty acid composition of cow's milk. **J. Dairy Sci.**, v.73, n.10, p.2832, 1990.
- BANGHAM, A.D.; HORNE, R.W. Action of saponin on biological cell membranes. **Nature**, n.196, p.952-953, 1962.
- BANGHAM, A.D.; HORNE, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **J. Mol. Biol.**, n.8, p.660, 1964.
- BANGHAM, J.A.; LEA, E.J.A. The interaction of detergents with bilayer lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, n.511, p.388-396, 1978.
- BARLA, P.; LARSSON, K.; LJUSBERG-WAHREN, H.; NORIN, T.; ROBERTS, K. Phase equilibria in a ternary system saponin - sunflower oil monoglycerides - water; interactions between aliphatic and alicyclic amphiphiles. **J. Sci. Food Agric.**, n.30, p.864-868, 1979.

- BARR, A. Consumer motivational forces affecting the sale of light dairy products. **Food Technol.**, v.44, n.10, p.97, 1990.
- BIRK, Y.; BONDI, A.; GESTETNER, B.; ISHAAYA, I. A thermostable haemolytic factor in soybeans. **Nature**, n.197, p.1089-1090, 1963.
- BISIO, P.D.; CARTLEDGE, J.G.; KEESOM, W.H.; RADKE, C.J. Molecular orientation of aqueous surfactants on a hydrophobic solid. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.78, n.1, p.225-237, 1980.
- BITTING, D.; HARWELL, J.H. Effects of counterions on surfactant surface aggregates at the alumina/aqueous interface. **Langmuir**, v.3, n.4, p.500-511, 1987.
- BLADON, P. Chemistry. In: COOK, R.P. **Cholesterol**. New York: Academic Press, 1958. p. 15-115.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian J. of Biochem. and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BLOOR, W.R. The determination of cholesterol in blood. **J. Biol. Chem.**, n.24, p.227, 1916.
- BLOOR, W.R.; KNUDSON, A. The separate determination of cholesterol and cholesterol esters in small amounts of blood. **J. Biol. Chem.**, n.27, p.107, 1916.
- BORGSTRON, B. Lipid absorption: physico-chemical considerations. In: DAWSON, R.M.C.; RHODES, D.N. **Metabolism and physiological significance of lipids**. New York: John Wiley, 1964. p.221
- BOURGÉS, M.; SMALL, D.M.; DERVICHIAN, D.G. Biophysics of lipid associations. II. The ternary systems cholesterol-lecithin-water. **Biochim. Biophys. Acta**, n.137, p.157-167, 1967 a.
- BOURGÉS, M.; SMALL, D.M.; DERVICHIAN, D.G. Biophysics of lipid associations. III. The quaternary systems lecithin-bile salt-cholesterol-water. **Biochim. Biophys. Acta**, n.144, p.189-201, 1967 b.
- BOURREL, M.; SCHECHTER, R.R. Microemulsions and related systems: formulation, solvency, and physical properties. **Surfactant Science Series**, v.30, 1988.
- BRADLEY, R.L. Removing cholesterol from milkfat using supercritical carbon dioxide. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.12, p.221-232, 1991.

- BRAGAGNOLO, N. Fatores que influenciam os níveis de colesterol nos alimentos. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996, Campinas. Anais ... Campinas: ITAL, 1996. (p.67-73).
- BRAY, G.A. A health and nutritional perspective on fat, cholesterol, and risks to health. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.12, p.13-19, 1991.
- BRAWN, P.R.; LINDNER, N.M.; MILLER, J.M.; TELLING, G.M. A gas chromatographic method for the determination of medicagenic acid in lucerne (alfalfa) leaf protein concentrate. **J. Sci. Food Agric.**, n.32, p.1157-1162, 1981.
- BRUCKDORFER, K.R.; SHERRY, M.K. The solubility of cholesterol and its exchange between membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, n.769, p.187, 1984.
- CAREY, M.C.; SMALL, D.M. Solubility of cholesterol in bile. In: MATERN, S.; BACK, P.; HACKENSCHIMDT, J.; GEROK, W. **Advances in Bile Acid Research III**. New York: Schattauer Verlag, 1975. p. 277-283.
- CHRISTEN, G.L. A method to quantify butteroil added to butter-margarine blends. **J. Food Qual.**, n.11, p.453, 1989.
- CHRISTIAN, S.D.; SCAMEHORN, J.F. Use of micellar - enhanced ultrafiltration to remove dissolved organics from aqueous streams. **Surfactant Science Series**, v.33, p.3-28, 1989.
- CHRISTIE, W.W. The analysis of lipids with special reference to milk fat. In: HAMILTON, R.J.; BHATI, A. **Recent Advances in Chemistry and Technology of Fats and Oils**. Essex: Elsevier, 1987. p. 57-78.
- COURCHAINE, A.J.; MILLER, W.H.; STEIN JR., D.B. Rapid semimicro procedure for estimating free and total cholesterol. **Clin. Chem.**, v.5, n.6, p.609, 1959.
- DALSGAARD, K. Saponin adjuvants. **Arch. Gesamte Virusforsch**, n.44, p.243, 1974.
- DEHAL, S.S.; FREIER, T.A.; YOUNG, J.W.; HARTMAN, P.A.; BEITZ, D.C. A novel method to decrease the cholesterol content of foods. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.12, p.203-220, 1991.
- DE MAN, J.M. The free and ester cholesterol content of milk and dairy products. **Z. Ernaehrungswiss.**, v.5, n.1, p.1-4, 1964.

- DEV, S.; GUPTA, A.S.; PATWARDHAN, S.A. **CRC Handbook of terpenoids: pentacyclic and hexacyclic triterpenoids**. Boca Raton: CRC Press, 1989. v.2, p.437-438.
- DRAKE, J.J.P.; BUTTERWORTH, K.R.; GAUNT, I.F.; HOOSON, J.; EVANS, J.G.; GANGOLLI, S.D. Long-term toxicity study of quillaia extract in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.20, n.1, p.15-23, 1982.
- ELLIOT D.F.; KON, G.A.R. Sapogenins - Part VI - Quillaic acid. **J. Chem. Soc.**, p.1130-1135, 1939.
- ELLIOT, D.F.; KON, G.A.R.; SOPER, H.R. Sapogenins - Part VII - The structure of quillaic acid and its relation to echinocystic acid. **J. Chem. Soc.**, p. 612-617, 1940.
- ELWORTHY, P. H.; FLORENCE, A.T.; MACFARLANE, C.B. **Solubilization by surface-active agents and its applications in Chemistry and Biological Sciences**. London: Chapman and Hall, 1968.
- EVERETT, D.H. **Basic principles of colloid science**. London: The Royal Society of Chemistry, 1989. 243 p.
- FEELEY, R.M.; CRINER, P.E.; WATT, B.K. Cholesterol content of foods. **J. Amer. Diet Assoc.**, n.61, p.134, 1972.
- FELDMAN, E.B.; BORGSTROM, B. Phase distribution of sterols: studies by gel filtration. **Biochim. Biophys. Acta**, n.125, p.136-147, 1966.
- FENWICK, D.E.; OAKENFULL, D. Saponin content of soybeans and some commercial soybean products. **J. Sci. Food Agric.**, n.32, p.273-278, 1981.
- FENWICK, D.E.; OAKENFULL, D. Saponin content of food plants and some prepared foods. **J. Sci. Food Agric.**, n.34, p.186-191, 1983.
- FLEISCHER, S.; BRIERLEY, G. Solubilization of cholesterol in phospholipid micelles in water. **Biochem Biophys. Res. Commun.**, v.5, n.5, p.367-372, 1961.
- FLORENCE, A.T. Biological implications of micelle formation. In: MITTAL, K.L. **Micellization, solubilization, and microemulsions**, v.1, p.55. New York: Plenum Press, 1976.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, n.226, p.497, 1957.

- FOX, F.W.; GARDNER, J.A. The sterol content of cow's milk. **Biochem. J.**, n.27, p.94, 1923.
- FRIBERG, S.E.; NEOGI, P. Microemulsion - based separations. **Surfactant Science Series**, v.33, p.119-138, 1989.
- GAUNT, I.F.; GRASSO, P.; GANGOLLI, S.D. Short-term toxicity study of quillaja extract in rats. **Food Cosmet. Toxicol.**, n.12, p.641-650, 1974.
- GENERAL MILLS INC., S. S. Marschner, J. B. Fine. **Simultaneous deodorization and cholesterol reduction of fat or oil**. Int. A23D 005/00, C11B 003/00. US n. 4804555. 14 fev. 1989
- GEORGE, A.J. Legal status and toxicity of saponins. **Food Cosmet. Toxicol.**, v.3, p.85-91, 1965.
- GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. Action of saponin on biological cell membranes. **Nature**, n.196, p.953-955, 1962.
- GREENWALD, C.G. Overview on fat and cholesterol reduction technologies. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.12, p.21-32, 1991.
- HALL, D.G.; TIDY, G.J.T. Surfactant solutions: dilute and concentrated. **Surfactant Science Series**, v.11, p.55-108, 1981.
- HAMMOCK, D.A. The consumer dilemma: they demand low fat, but will they eat it ? **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.12, p.3-11, 1991.
- HARTLEY, G.S. Micelles - retrospect and prospect. In: MITTAL, K.L. **Micellization, solubilization, and microemulsions**, v.1, p.23. New York: Plenum Press, 1976.
- HARWELL, J.H.; HOSKINS, J.C.; SCHECHTER, R.S.; WADE, W.H. Pseudophase separation model for surfactant adsorption: isomerically pure surfactants. **Langmuir**, v.1, n.2, p.251-262, 1985.
- HARWELL, J.H.; O'REAR, E.A. Adsorbed surfactant bilayers as two-dimensional solvents: admicellar-enhanced chromatography. **Surfactant Science Series**, v.33, p.155-171, 1989.
- HATTON, T.A. Reversed micellar extraction of proteins. **Surfactant Science Series**, v.33, p.55-90, 1989.
- HETTINGA, D.H. Why alter milk composition ? **J. Dairy Sci.**, v.72, n.10, p.2790-2800, 1989.

- HIEMENZ, P.C. **Principles of colloid and surface chemistry**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1986. 815 p.
- HIGUCHI, R.; KOMORI, T. Structures of compounds derived from the acyl moieties of quillajasaponin. **Phytochemistry**, v.26, n.8, p.2357-2360, 1987.
- HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y.; KOMORI, T. An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja saponaria*. **Phytochemistry**, v.27, n.4, p.1165-1168, 1988.
- HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y.; FUJIOKA, T.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.; OAKENFULL D.G. Structure of desacylsaponins obtained from the bark of *Quillaja saponaria*. **Phytochemistry**, v.26, n.1, p.229-235, 1987.
- HOLLAND, B.; UNWIN, I.D.; BUSS, D.H. **Milk products and eggs - Fourth supplement to McCance and Widdowson's The Composition of Foods**. 4 ed. London: Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods, 1989.
- HOMER, D.R.; VIRTANEN, A.I. Cow's milk cholesterol-studies on the milk of cows on normal and protein-free feeds. **Milchwissenschaft**, v.22, n.1, p.1-7, 1967.
- HOYES, S.D.; SAUNDERS, L. The dispersion of some steroids in lecithin sols. **Biochim. Biophys. Acta**, n.116, p.184, 1966.
- HUH, N.W.; PORTER, N.A.; McINTOSH, T.J.; SIMON, S.A. The interaction of polyphenols with bilayers: conditions for increasing bilayer adhesion. **Biophys. J.**, v.71, n.6, p.3261-3277, 1996.
- HUANG, T.C.; CHEN, C.P.; WEFLER, V.; RAFTERY, A. A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction. **Anal. Chem.**, v.33, n.10, p.1405, 1961.
- HUBBARD, W.D.; SHEPPARD, A.J.; NEWKIRK, D.R.; PROSSER, A.R.; OSGOOD, T. Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterols from food products. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, n.54, p.81, 1977.
- HUNTER, R.J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1988. 386 p.
- HURST, W.J.; ALEO, M.D.; MARTIN JR., R.A. High performance liquid chromatographic analysis of cholesterol in milk. **J. Dairy Sci.**, v.66, n.10, p.2192, 1983.

- HURST, W.J.; ALEO, M.D.; MARTIN JR., R.A. Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic analysis for cholesterol in milk chocolate. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.67, n.4, p.698, 1984.
- HURST, W.J.; ALEO, M.D.; MARTIN JR., R.A. HPLC determination of the cholesterol content of egg noodles as an indicator of egg solids. **J. Agric. Food Chem.**, v.33, n.5, p.820, 1985.
- INDUSTRIAL Y FORESTAL S.A.C., Jorge Verdugo Lagos. **Extraccion del colesterol de los alimentos mediante un tratamiento con saponinas grado alimento**. Chile n. PI 615-91, 03 jul. 1991.
- IRELAND, P.A.; DZIEDZIC, S.Z. Analysis of soybean sapogenins by high-performance liquid chromatography. **J. of Chromatography**, n.325, p.275-281, 1985.
- JENNESS, R.; PATTON, S. **Principles of dairy chemistry**. New York: John Wiley, 1959.
- JENSEN, R.G.; FERRIS, A.M.; LAMMI-KEEFE, C.J.; HENDERSON, R.A. Lipids of bovine and human milks: a comparison. **J. Dairy Sci.**, v.73, n.2, p.223-240, 1990.
- KABARA, J.J. Determination and microscopic localization of cholesterol. **Methods of Biochemical Analysis**, n.10, p.263-318, 1961.
- KABARA, J.J.; MCLAUGHLIN, J.T.; RIEGEL, C.A. Quantitative microdetermination of cholesterol using tomatine as precipitating agent. **Anal. Chem.**, v.33, n.2, p.305, 1961.
- KAIZUKA, H.; TAKAHASHI, K. High-performance liquid chromatography system for a wide range of naturally occurring glycosides. **J. of Chromatography**, n.258, p.135-146, 1983.
- KANTOR, M.A. Light dairy products: the need and consequences. **Food Technol.**, v.44, n.10, p.81, 1990.
- KARTNIG, T.; RI, C.Y. Dunnschichtchromatographische Untersuchungen an den Saponinen aus Cortex Quillajae. **Planta Med.**, v.23, n.3, p.269-271, 1973.
- KASAI, R.; MIYAKOSHI, M.; MATSUMOTO, K.; LIE, R.L.; ZHOU, J.; MORITA, T.; TANAKA, O. Tubeimoside I, a new cyclic bisdesmoside from chinese cucurbitaceous folk medicine "Tu Bei Mu", a tuber of *Bolbostemma paniculatum*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.34, n.9, p.3974, 1986.

- KATZ, I.; KEENEY, M. Rapid method for isolation of unesterified sterols and its application to detection of milkfat adulteration with vegetable oils. **J. Dairy Science**, v.50, n.11, p.1764-1768, 1967.
- KENSIL, C.R.; PATEL, U.; LENNICK, M.; MARCIANI, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. **J. Immunology**, v.146, n.2, p.431-437, 1991.
- KRUSS GMBH. **Processor tensiometer K12: user's manual**. Hamburg: KRUSS GmbH, 1992.
- KUKSIS, A. Chromatography of simple lipids and their constituents. **J. Chromatogr.**, n.143, p.3, 1977.
- LABRIOLA, R.A.; DEULOFEU, V. The structure of prosapogenin from quillaja saponin. **Experientia**, v.25, n.2, p.124-125, 1969.
- LA CROIX, D.E. Extraction of plant sterols from adulterated butter oil using a digitonin-impregnated Celite column. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.52, n.3, p.600, 1969.
- LA CROIX, D.E. Collaborative study of the extraction of plant sterols from adulterated butter oil using a digitonin-impregnated Celite column. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.53, n.3, p.535, 1970.
- LA CROIX, D.E.; FEELEY, R.M.; WONG, N.P.; ALFORD, J.A. Comparison of two extraction procedures for the determination of cholesterol in dairy products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.55, n.1, p.972, 1972.
- LA CROIX, D.E.; MATTINGLY, W.A.; WONG, N.P.; ALFORD, J.A. Cholesterol, fat, and protein in dairy products. **J. Am. Diet. Assoc.**, n.62, p.275, 1973.
- LEUNG, A.Y. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics**. New York: John Wiley, 1980. p.276-277.
- LUCY, J.A.; GLAUERT, A.M. Structure and assembly of macromolecular lipid complexes composed of globular micelles. **J. Mol. Biol.**, n.8, p.727, 1964.
- MACKAY, R.A. Solubilization. In: SCHICK, M.J. **Nonionic surfactants: physical chemistry**, p.297-368. New York: Marcel Dekker, 1987.
- MC CARTHY, M.J.; KUKSIS, A.; BEVERIDGE, J.M.R. Composition of molecular distillates of butter oil: isolation and identification of components other than glycerides. **J. Lipid Res.**, v.5, p.609-615, 1964.

- MICICH, T.J. Behavior of polymer-supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butteroil. **J. Agric. Food Chem.**, v.38, n.9, p.1839-1843, 1990.
- MILLER, R.G. Interactions between digitonin and bilayer membranes. **Biochim.Biophys. Acta**, n.774, p.151-157, 1984.
- MITRA, S.; DUNGAN, S.R. Micellar properties of quillaja saponin. 1. Effects of temperature, salt, and pH on solution properties. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p.1587-1595, 1997.
- MITTAL, K.L.; MUKERJEE, P. The wide world of micelles. In: MITTAL, K.L. **Micellization, solubilization, and microemulsions**, v.1, p.1. New York: Plenum Press, 1976.
- MONSERBIO, Jean Courregelongue, Jean-Pierre Mafrand. **Process for eliminating cholesterol contained in a fatty substance of animal origin and the fatty substance with reduced cholesterol obtained**. Int. CO9F 5/10, A23C 12/02. US n. 4.880.573. 14 nov. 1989.
- MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 3 ed. New York: John Wiley, 1991. 649 p.
- MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HOGLUND, S.; DALSGAARD, K.; OSTERHAUS, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. **Nature**, n.308, p.457, 1984.
- MORITA, T.; NIE, R.L.; FUJINO, H.; ITO, K.; MATSUFUJI, N.; KASAI, R.; ZHOU, J.; WU, C.Y.; YATA, N.; TANAKA, O. Saponins from chinese cucurbitaceous plants: solubilization of saikosaponin-A with hemslosides Ma2 and Ma3 and structure of hemsloside H1 from *Hemsleya chinensis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.34, n.1, p.401, 1986.
- MORRIS, C.E. Focus on fat reduction. **Food Engineering**, v.62, n.6, p.93, 1990.
- MORRIS, C.E. Dairy science removes cholesterol, replaces fat. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.12, p.201-202, 1991.
- MUCK, G.A. Overview of dairy products modifications. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.12, p.233-238, 1991.
- MUKERJEE, P. Solubilization in aqueous micellar systems. In: MITTAL, K.L. **Solution chemistry of surfactants**, v.1, p.153. New York: Plenum Press, 1976.

VII. Bibliografia

- MURAMATSU, K.; FUKUYO, M.; HARA, Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol - fed rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)**, v.32, n.6, p.613-622, 1986.
- NAKAMURA, T.; INOUE, K.; NOJIMA, S.; SANKAWA, U.; SHOJI, J.; KAWASAKI, T.; SHIBATA, S. Interaction of saponins with red blood cells as well as with phosphatidylcholine liposomal membranes. **J. Pharm. Dyn.**, n.2, p.374-382, 1979.
- NAKAYAMA, K.; FUJINO, H.; KASAI, R.; MITOMA, Y.; YATA, N.; TANAKA, O. Solubilizing properties of saponins from *Sapindus mukurossi* GAERTN. **Chem Pharm. Bull.**, v.34, n.8, p.3279, 1986.
- NATAF, B.; MICKELSEN, O.; KEYS, A.; PETERSEN, W.E. The cholesterol content of cow's milk. **J. Nutr.**, n.36, p.495, 1948.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Report of the expert panel on population strategies for blood cholesterol reduction - executive summary. NIH Publication No. 90-3047, U.S. Dept. of Health and Human Services, 1990.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.W. **Food Chemistry**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p.139-244.
- NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. **Applied linear statistical models**. 3 ed. Boston: Irwin, 1990. 1181 p.
- NEW ZEALAND DAIRY RESEARCH INSTITUTE, Alan Robert Keen. **Method of removing sterols from edible fats and/or oils and/or fats and/or oils from which sterols have been removed**. Int. A23D 5/00, C11B 3/00, A23C 15/14. European Patent Application n. 88311223.7. 25 nov. 1988.
- NISHIKAWA, M.; NOJIMA, S.; AKIYAMA, T.; SANKAWA, U.; INOUE, K. Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol. **J. Biochem.**, n.96, p.1231-1239, 1984.
- OAKENFULL, D.G. Saponins in food - a review. **Food Chemistry**, n.6, p.19-40, 1981.
- OAKENFULL, D.G. Aggregation of saponins and bile acids in aqueous solution. **Aust. J. Chem.**, n.39, p.1671-1683, 1986.

- OAKENFULL, D.G.; SIDHU, G.S. A physico-chemical explanation for the effects of dietary saponins on cholesterol and bile salt metabolism. **Nutr. Rep. Intern.**, v.27, n.6, p.1253-1259, 1983.
- OAKENFULL, D.G.; SIDHU, G.S. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia ? **European J. of Clinical Nutrition**, n.44, p.79-88, 1990.
- OAKENFULL, D.G.; SIDHU, G.S. **Processing technology for cholesterol extraction**. In: THE 1991 CONFERENCE ON FAT AND CHOLESTEROL REDUCED FOODS: Technologies and Ingredients, 1991, Atlanta. **Proceedings** ... South Natick: IBC USA Conferences Inc., 1991.
- OAKENFULL, D.G.; TOPPING, D.L. Saponins and plasma cholesterol. **Atherosclerosis**, v.48, n.3, p.301, 1983.
- OAKENFULL, D.G.; TOPPING, D.L.; ILLMAN, R.J.; FENWICK, D.E. Prevention of dietary hypercholesterolaemia in the rat by soya bean and quillaja saponins. **Nutr. Rep. Intern.**, v.29, n.5, p.1039-1046, 1984.
- PARK, S.W.; ADDIS, P.B. Cholesterol oxidation products in some muscle foods. **J. Food Sci.**, v.52, n.6, p.1500, 1987.
- PARODI, P.W. The sterol content of milk fat, animal fats, margarines and vegetable oils. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.28, n.3, p.135-137, 1973.
- PEN KEM INC. **Pen Kem system 3000 automated electrokinetics analyzer: integrated approach to the study of colloid systems**. Bedford Hills: Pen Kem Inc., 1992a. 6p.
- PEN KEM INC. **Pen Kem system 3000 automated electrokinetics analyzer: operation and maintenance manual**. Bedford Hills: Pen Kem Inc., 1992b.
- PENNINGTON, J.A.T. **Dietary nutrient guide**. Westport: AVI, 1976.
- PENTON, Z. Determination of neutral lipids by high temperature GC. Part I. Triglycerides and cholesteryl esters in foods. **GC Varian Application Note**, n.22, 1990.
- PHILLIPS, J.C.; BUTTERWORTH, K.R.; GAUNT, I.F.; EVANS, J.G.; GRASSO, P. Long-term toxicity study of quillaja extract in mice. **Food Cosmet. Toxicol.**, v.17, p.23-27, 1979.

- PILLION, D.J.; AMSDEN, J.A.; KENSIL, C.R.; RECCHIA, J. Structure - function relationship among Quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin. **J. Pharm. Sci.**, v.85, n.5, p.518-524, 1996.
- POSATI, L.P.; ORR, M.L. **Composition of foods: dairy and egg products - raw, processed, prepared.** Consumer and Food Economics Institute, USDA Agriculture Handbook 8-1, 1976.
- POTTER, J.D.; ILLMAN, R.J.; CALVERT, G.D.; OAKENFULL, D.G.; TOPPING, D.L. Soya saponins, plasma lipids, lipoproteins and fecal bile acids: a double-blind cross-over study. **Nutr. Rep. Int.**, v.22, n.4, p.521, 1980.
- PRASAD, R.; PANDITA, N.N. Variations in the cholesterol content of butter fat. **Indian J. Dairy Sci.**, v.40, n.1, p.55-57, 1987.
- PRICE, K.R.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R. The chemistry and biological significance of saponins in food and feedstuffs. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.26, n.1, p.27-135, 1987.
- PUNWAR, J.J. Gas-liquid chromatographic determination of total cholesterol in multicomponent foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.58, n.4, p.804, 1975.
- PUNWAR, J.J. Collaborative study for the comparison of two methods for the determination of total cholesterol in multicomponent foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.59, n.1, p.46, 1976.
- Q. P. CORPORATION. Low cholesterol food preparation by cholesterol extraction with supercritical carbon dioxide. Int. A23C 001/00, A23C 009/16, A23L 001/32, B01D 011/00. JP n. 87051092. 28 out. 1987.
- RAO, A.V.; KENDALL, C.W. Dietary saponins and serum lipids. **Food Chem. Toxicol.**, v.24, n.5, p.441, 1986.
- REEVES III, J.B.; WEIHRAUCH, J.L. **Composition of foods: fats and oils - raw, processed, prepared.** Consumer and Food Economics Institute, USDA Agriculture Handbook 8-4, 1979.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. Análise de colesterol em alimentos: perspectiva histórica e tendências atuais. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996, Campinas. Anais ... Campinas: ITAL, 1996. (p.59-65).

- ROSEN, M.J. Comparative effects of chemical structure and environment on the adsorption of surfactants at the L/A interface and on micellization. In: MITTAL, K.L. **Solution chemistry of surfactants**, v.1, p.45. New York: Plenum Press, 1976.
- ROUHI, A.M. Researchers unlocking potential of diverse, widely distributed saponins. **Chemical & Engineering News**, 11 set. 1995, p.28-35, 1995.
- RUSSELL, C.E.; GRAY, I.K. The cholesterol content of dairy products. **N. Z. J. Dairy Sci. Technol.**, v.14, p.281-289, 1979.
- SALVA, T.J.G. **Tecnologia para redução de colesterol em alimentos: métodos enzimáticos**. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996, Campinas. **Anais ...** Campinas: ITAL, 1996. (p.7-13).
- SCAMEHORN, J.F.; HARWELL, J.H. Surfactant-based separation processes. **Surfactant Science Series**, v.33. New York: Marcel Dekker, 1989.
- SCAMEHORN, J.F.; SCHECHTER, R.S.; WADE, W.H. Adsorption of surfactants on mineral oxide surfaces from aqueous solutions. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.85, n.2, p.463-478, 1982.
- SCHWARTZ, D.P.; BREWINGTON, C.R.; BURGWALD, L.H. Rapid quantitative procedure for removing cholesterol from butterfat. **J. Lipid Research**, v.8, p.54-59, 1967.
- SEEMAN, P. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis. **Federation Proceedings**, v.33, n.10, p.2116-2124, 1974.
- SIDHU, G.S.; OAKENFULL, D.G. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. **British J. of Nutrition**, v.55, p.643-649, 1986.
- SIMON, S.A.; DISALVO, E.A.; GAWRISCH, K.; BOROVYAGIN, V.; TOONE, E.; SCHIFFMAN, S.S.; NEEDHAM, D.; McINTOSH, T.J. Increased adhesion between neutral lipid bilayers: interbilayer bridges formed by tannic acid. **Biophys. J.**, v.66, n.6, p.1943-1958, 1994.
- SIRACUSA, P.A.; SOMASUNDARAN, P. The role of mineral dissolution in the adsorption of dodecylbenzenesulfonate on kaolinite and alumina. **Colloids and Surfaces**, n.26, p.55-57, 1987.

- SMALL, D.M.; BOURGES, M.C.; DERVICHIAN, D.G. The biophysics of lipid associations. I. The ternary systems lecithin-bile salt-water. **Biochim. Biophys. Acta**, n.125, p.563-580, 1966.
- SOMASUNDARAN, P.; FUERSTENAU, D.W. Mechanisms of alkyl sulfonate adsorption at the alumina-water interface. **J. Physical Chem.**, v.70, n.1, 1966.
- SPERBER, R.M. New technologies for cholesterol reduction. **Food Process.**, v.50, n.12, p.154-160, 1989.
- SUNDFELD, E. **Separation of cholesterol from butteroil by treatment with quillaja saponin solution and diatomaceous earth**. Davis: Universidade da California, 1992. 151p. (Tese de mestrado).
- SUNDFELD, E.; YUN, S.; KROCHTA, J.M.; RICHARDSON, T. Separation of cholesterol from butteroil using quillaja saponins. I. Effects of pH, contact time, and adsorbent. **J. Food Process Engineering**, v. 16, n.3, p.191-205, 1993a.
- SUNDFELD, E.; KROCHTA, J.M.; RICHARDSON, T. Separation of cholesterol from butteroil using quillaja saponins. II. Effects of temperature, agitation, and concentration of quillaja solution. **J. Food Process Engineering**, v. 16, n.3, p.207-226, 1993b.
- SWAISGOOD, H.E. Characteristics of edible fluids of animal origin: milk. In: FENNEMA, O.W. **Food Chemistry**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p.791-827.
- SWEENEY, J.P.; WEIHRAUCH, J.L. Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.8, p.131-159, 1976.
- THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, Esdras Sundfeld, John M. Krochta, Thomas Richardson. **Aqueous process to remove cholesterol from food products**. Int. Cl. A23D 7/00. US PI n.5.370.890, 06 dez. 1994.
- THOMPSON, M.P.; BRUNNER, J.R.; STINE, C.M.; LINDQUIST, K. Lipid components of the fat-globule membrane. **J. Dairy Sci.**, v.44, p.1589-1596, 1961.
- TOPPING, D.L.; ILLMAN, R.J.; FENWICK, D.E.; OAKENFULL, D.G. Effects of quillaja and soya saponins on plasma cholesterol and faecal steroid excretions in the rat. **Proc. Nutr. Soc. Aust.**, v.5, p.195, 1980.
- VARSHNEY, I.P.; BEG, M.F.A.; SANKARAM, A.V.B. Saponins and sapogenins from *Quillaja saponaria*. **Fitoterapia**, v.56, p.254, 1985.

- YOKOYAMA, S. Tecnologia para redução de colesterol em alimentos. In: SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE", 1996, Campinas. **Anais ...** Campinas: ITAL, 1996. (p.15-18).
- YUGARANI, T.; TAN, B.K.; TEH, M.; DAS, N.P. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. **Lipids**, v.27, n.3, p.181-186, 1992.
- ZLATKIS, A.; ZAK, B.; BOYLE, A.J. A new method for the direct determination of serum cholesterol. **J. Lab. Clin. Med.**, n.41, p.486, 1953.
- WALPOLE, R.E.; MYERS, R.H. **Probability and statistics for engineers and scientists**. 4 ed. New York: Macmillan, 1989. 765 p.
- WARE, B.R. Analytical limits of electrophoretic light scattering. **Chemical Analysis**, v.87, p.493-519, 1986.
- WINDAUS, A. Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. **Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.**, n.42, p.238, 1909.
- WINDAUS, A. Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen un pathologischen Nieren. **Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.**, n.65, p.111, 1910.
- WISCONSIN MILK MARKETING BOARD. Cholesterol reduction technologies overview: special report. **WMMB Research Review**, n.2, 1989.
- WOOD, D.L.; BITMAN, J. Cholesteryl esters of cow's milk. **J. Dairy Sci.**, v.69, n.8, p.2203-2208, 1986.

VIII. APÊNDICES

APÊNDICE A. Balanço de massa para estimativa da distribuição de colesterol entre fases resultantes do processo sólido-líquido-líquido (SLL)

BASE DE CÁLCULO:

O sistema é definido como 1 frasco ao qual foram medidos e adicionados:

MOM: massa de óleo de manteiga anidro (g)

VSQ: volume de solução de quilaia (ml)

MCEL: massa de terra diatomácea - Celite® 545 (g)

DADOS DE ENTRADA:

Estes dados foram obtidos através de análise das amostras resultantes dos experimentos:

XOM: teor de colesterol no óleo de manteiga anidro inicial (mg/g)

XFO: teor de colesterol na fase oleosa obtida (mg/g)

XT: teor de colesterol na torta obtida (mg/g)

%OT: teor de óleo na torta obtida (% m/m)

%UT: teor de umidade na torta obtida (% m/m)

CÁLCULOS:

• Massa total de colesterol presente no sistema

A massa total de colesterol presente no sistema (**MCSIS**, em mg) é igual àquela introduzida inicialmente com a massa de óleo de manteiga anidro (**MOM**, em g), com teor de colesterol (**XOM**, em mg/g) determinado. Assim sendo, temos que:

$$\mathbf{MCSIS = MOM \times XOM}$$

• Massa de colesterol presente na torta

Desconsiderando-se a contribuição da quilaia à massa de torta resultante no sistema, o que é feito por necessidade devido à indisponibilidade de dados, a torta é

constituída por 3 componentes: Celite® 545 anidro, óleo e umidade. Assim sendo, e uma vez que os teores de óleo (%OT, em % m/m) e umidade (%UT, em % m/m) na torta foram determinados, temos que o teor de Celite® 545 na torta obtida (%CEL, em % m/m) é dado por:

$$\%CEL = 100 - (\%OT + \%UT)$$

Sabendo-se a massa de Celite® 545 adicionado ao sistema (MCEL, em g), pode-se calcular a massa de torta obtida (MT, em g) por:

$$MT = \frac{MCEL}{\%CEL} \times 100$$

Uma vez que o teor de colesterol na torta obtida (XT, em mg/g) foi determinado, a massa de colesterol na torta (MCT, em mg) é dada por:

$$MCT = MT \times XT$$

• Massa de colesterol presente na fase oleosa

Em primeiro lugar, será desconsiderada uma eventual contribuição da quilaia à massa da fase oleosa obtida, por necessidade devido à indisponibilidade de dados e também devido à sua alta solubilidade no meio aquoso.

Note-se que uma camada fina de textura cremosa, com características de uma emulsão, pode ser visualizada na interface das fases oleosa e aquosa após a centrifugação; entretanto, numa análise visual, sua massa é muito pequena comparativamente às das demais fases do sistema. Assim, assumiu-se uma perfeita separação das fases aquosa e oleosa, desconsiderando uma eventual presença de óleo residual associado à fase aquosa. Também, como a fase oleosa apresenta um teor de umidade bastante baixo, tipicamente ao redor de 2 - 3 %, esta contribuição à massa de fase oleosa não será também considerada. Portanto, considera-se a fase oleosa como sendo composta unicamente por óleo anidro.

Note-se que uma certa quantidade de óleo está associada à torta, medido pelo teor de óleo na torta (%OT, em % m/m). Assim sendo, a massa de fase oleosa obtida (MFO, em g) pode ser calculada a partir da massa de óleo de manteiga anidro adicionada ao sistema (MOM, em g), descontando-se a massa de óleo associado à torta, por:

$$MFO = MOM - \left(\frac{\%OT \times MT}{100} \right)$$

Uma vez que o teor de colesterol na fase oleosa obtida (**XFO**, em mg/g) foi determinado, e assumindo-se que não há acúmulo seletivo de colesterol na interface das fases oleosa e aquosa, a massa de colesterol na fase oleosa (**MCFO**, em mg) é dada por:

$$\mathbf{MCFO = MFO \times XFO}$$

• Massa de colesterol presente na fase aquosa

Considerados resultados anteriores, pode-se calcular a massa de colesterol presente na fase aquosa (**MCFA**, em mg), por diferença, como:

$$\mathbf{MCFA = MCSIS - MCT - MCFO}$$

Sabendo-se o volume de solução aquosa de quilaia adicionado ao sistema (**VSQ**, em ml), desconta-se aquela associada à terra diatomácea e determinada através do teor de umidade da torta (**%UT**, em % m/m), pode-se então estimar o volume de fase aquosa obtida (**VFA**, em ml) como:

$$\mathbf{VFA = VSQ - \left(\frac{MT \times \%UT}{100} \right)}$$

Note-se que foi assumida uma perfeita separação das fases aquosa e oleosa, desconsiderando-se a eventual presença de solução aquosa associada à fase oleosa.

Pode-se então, a partir destes resultados, estimar a concentração de colesterol na fase aquosa (**XFA**, em mg/ml) por:

$$\mathbf{XFA = \frac{MCFA}{VFA}}$$

• Outros dados relevantes

É relevante comparar os teores de colesterol determinados nas fases oleosas com aqueles calculados e denominados teores hipotéticos de colesterol no óleo associado à torta, resultantes dos mesmos tratamentos, como indicativo da seletividade da separação.

Considere-se que podem ser calculados teores hipotéticos de colesterol no óleo associado à torta (**XOT**, em mg/g), obtidos como segue com base nos teores

determinados de colesterol (**XT**, em mg/g) e óleo (**%OT**, em % m/m) na torta, seriam iguais.

$$\mathbf{XOT} = \frac{\mathbf{XT}}{\mathbf{\%OT}} \times 100$$

Considere-se agora a hipótese de que todo o colesterol presente na torta não é resultado de uma acumulação seletiva, mas simplesmente consequência da oclusão mecânica da fase oleosa contendo colesterol. Se esta hipótese se verifica, os teores de colesterol medidos na fase oleosa (**XFO**, em mg/g) e os teores hipotéticos de colesterol no óleo associado à torta calculados (**XOT**, em mg/g), seriam iguais.

Uma segunda abordagem relevante é estimar a quantidade de colesterol que, presente na torta, poderia estar seletivamente associado (**XCELT**, em mg/g). Para tanto, desconta-se da quantidade total de colesterol presente na torta (**MCT**, em mg) aquela associada à fase oleosa mecanicamente ocluída (e cujo teor de colesterol é igual ao da fase oleosa, **XFO**, em mg/g), e divide-se a quantidade de colesterol restante assim obtida pela massa de Celite® 545 presente no sistema (**MCEL**, em g), como segue:

$$\mathbf{XCELT} = \frac{\mathbf{MCT} - (\mathbf{\%OT} / 100 \times \mathbf{MT} \times \mathbf{XFO})}{\mathbf{MCEL}}$$

APÊNDICE B. Balanço de massa para estimativa da distribuição de colesterol entre fases resultantes do processo líquido-líquido (LL)

BASE DE CÁLCULO:

O sistema é definido como 1 frasco ao qual foram medidos e adicionados:

MOM: massa de óleo de manteiga anidro (g)

VSQ: volume de solução de quilaia (ml)

DADOS DE ENTRADA:

Estes dados foram obtidos através de análise das amostras resultantes dos experimentos:

XOM: teor de colesterol no óleo de manteiga anidro inicial (mg/g)

XFO: teor de colesterol na fase oleosa obtida (mg/g)

CÁLCULOS:

• Massa total de colesterol presente no sistema

A massa total de colesterol presente no sistema (**MCSIS**, em mg) é igual àquela introduzida inicialmente com a massa de óleo de manteiga anidro (**MOM**, em g), com teor de colesterol (**XOM**, em mg/g) determinado. Assim sendo, temos que:

$$\mathbf{MCSIS = MOM \times XOM}$$

• Massa de colesterol presente na fase oleosa

Em primeiro lugar, será desconsiderada uma eventual contribuição da quilaia à massa da fase oleosa obtida, por necessidade devido à indisponibilidade de dados e também devido à sua alta solubilidade no meio aquoso. Também, desprezando a pequena quantidade de emulsão na interface das fases oleosa e aquosa (vide Apêndice A), assumiu-se uma perfeita separação das fases aquosa e oleosa, desconsiderando uma eventual presença de óleo residual associado à fase aquosa. Também, como a fase oleosa apresenta um teor de umidade bastante baixo,

típicamente ao redor de 2 - 3 %, esta contribuição à massa de fase oleosa também não será considerada. Portanto, considera-se a fase oleosa como sendo composta unicamente por óleo anidro, com massa igual à do óleo de manteiga anidro (**MOM**, em g).

Uma vez que o teor de colesterol na fase oleosa obtida (**XFO**, em mg/g) foi determinado, e assumindo-se que não há acúmulo seletivo de colesterol na interface das fases oleosa e aquosa, a massa de colesterol na fase oleosa (**MCFO**, em mg) é dada por:

$$\mathbf{MCFO = MOM \times XFO}$$

• Massa de colesterol presente na fase aquosa

Considerados resultados anteriores, pode-se calcular a massa de colesterol presente na fase aquosa (**MCFA**, em mg), por diferença, como:

$$\mathbf{MCFA = MCSIS - MCFO}$$

Sabendo-se o volume de solução aquosa de quilaia adicionado ao sistema (**VSQ**, em ml), e mantidas as considerações feitas anteriormente, pode-se então estimar a concentração de colesterol na fase aquosa (**XFA**, em mg/ml) por:

$$\mathbf{XFA = \frac{MCFA}{VSQ}}$$

APÊNDICE C. Resultados detalhados do estudo do efeito da temperatura nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo de separação sólido-líquido-líquido (SLL)

TABELA C.1. Análise de variância: efeito da temperatura no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL.

| Análise de variância | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------|------|--------------|
| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
| Temperatura | 2 | 0,0005262 | 0,0002631 | 0,05 | 0,9502 |
| Resíduo | 8 | 0,0409614 | 0,0051202 | | |

| Comparação das médias dos tratamentos | | | |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
| 45°C | 3 | 2,46 ± 0,07 | A |
| 55°C | 4 | 2,46 ± 0,07 | A |
| 65°C | 4 | 2,48 ± 0,08 | A |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH da solução de quilaia: 4,2.

TABELA C.2. Análise de variância: efeito da temperatura no teor de colesterol da torta resultante do processo SLL.

| Análise de variância | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------|------|--------------|
| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
| Temperatura | 2 | 0,0009035 | 0,0004518 | 0,38 | 0,6961 |
| Resíduo | 9 | 0,0107787 | 0,0011976 | | |

| Comparação das médias dos tratamentos | | | |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
| 45°C | 4 | 0,24 ± 0,06 | B |
| 55°C | 4 | 0,23 ± 0,02 | B |
| 65°C | 4 | 0,22 ± 0,01 | B |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH da solução de quilaia: 4,2.

TABELA C.3. Teores de umidade e óleo nas tortas resultantes do estudo do efeito da variação de temperatura no processo SLL.

| Temperatura (°C) | Composição da torta ^b | | | |
|---------------------|----------------------------------|--------------|----------------|-----------------|
| | N ^a | % óleo (m/m) | N ^a | % umidade (m/m) |
| 45 | 2 | 5,3 ± 0,2 | 4 | 56,5 ± 0,4 |
| 55 | 2 | 5,8 ± 0,7 | 4 | 57,3 ± 1,3 |
| 65 | 2 | 4,9 ± 0,2 | 4 | 56,6 ± 0,5 |
| Média Global | 6 | 5,3 ± 0,5 | 12 | 56,8 ± 0,8 |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão.

TABELA C.4. Concentrações de colesterol na fase aquosa e seletivamente associado à torta, obtidos por balanço de massa, para estudo do efeito da variação de temperatura no processo SLL.

| Temperatura (°C) | Concentração de colesterol | |
|---------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | na fase aquosa (XFA, mg/ml) | associado ao Celite® (XCELT, mg/g) |
| 45 | 0,25 | 0,32 |
| 55 | 0,26 | 0,24 |
| 65 | 0,24 | 0,26 |
| Média Global | 0,25 | 0,27 |

APÊNDICE D. Resultados detalhados do estudo do efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo sólido-líquido-líquido (SLL)

TABELA D.1. Análise de variância: efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL.

Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------------|
| pH | 2 | 0,4855382 | 0,2427691 | 24,90 | 0,0001 |
| Temperatura | 1 | 0,0119698 | 0,0119698 | 1,23 | 0,2833 |
| pH*Temperatura | 2 | 0,0332648 | 0,0166324 | 1,71 | 0,2113 |
| Resíduo | 17 | 0,1657547 | 0,0097503 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| pH | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|-----|----------------|-------------------------|--------------------|
| 3,0 | 8 | 2,43 ± 0,12 | A |
| 4,2 | 7 | 2,61 ± 0,04 | B |
| 7,0 | 8 | 2,77 ± 0,12 | C |

| Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|-------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 45°C | 12 | 2,58 ± 0,17 | A |
| 65°C | 11 | 2,63 ± 0,19 | A |

| Tratamento pH / Temperatura | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 3,0 / 45°C | 4 | 2,40 ± 0,13 | A |
| 3,0 / 65°C | 4 | 2,45 ± 0,12 | A B |
| 4,2 / 45°C | 4 | 2,63 ± 0,04 | B C D |
| 4,2 / 65°C | 3 | 2,58 ± 0,03 | A B C |
| 7,0 / 45°C | 4 | 2,70 ± 0,12 | C D |
| 7,0 / 65°C | 4 | 2,84 ± 0,07 | D |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga.

TABELA D.2. Análise de variância: efeito combinado do pH da solução de quilaia e da temperatura no teor de colesterol da torta de terra diatomácea resultante do processo SLL.

Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------------|
| pH | 2 | 0,0404116 | 0,0202058 | 14,31 | 0,0003 |
| Temperatura | 1 | 0,0000084 | 0,0000084 | 0,01 | 0,9393 |
| pH*Temperatura | 2 | 0,0208859 | 0,0104430 | 7,40 | 0,0053 |
| Resíduo | 16 | 0,0225911 | 0,0014119 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| pH | N a | Colesterol b | Grupo c |
|-----|-----|--------------|---------|
| 3,0 | 8 | 0,31 ± 0,03 | A |
| 4,2 | 7 | 0,24 ± 0,05 | B |
| 7,0 | 7 | 0,20 ± 0,06 | B |

| Temperatura | N a | Colesterol b | Grupo c |
|-------------|-----|--------------|---------|
| 45°C | 11 | 0,25 ± 0,05 | A |
| 65°C | 11 | 0,25 ± 0,08 | A |

| Tratamento pH / Temperatura | N a | Colesterol b | Grupo c |
|--------------------------------|-----|--------------|---------|
| 3,0 / 45°C | 4 | 0,30 ± 0,02 | A |
| 3,0 / 65°C | 4 | 0,31 ± 0,04 | A |
| 4,2 / 45°C | 4 | 0,21 ± 0,03 | B C |
| 4,2 / 65°C | 3 | 0,28 ± 0,03 | A B |
| 7,0 / 45°C | 3 | 0,24 ± 0,05 | A B C |
| 7,0 / 65°C | 4 | 0,16 ± 0,05 | C |

a número de observações; b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração da solução de quilaia: 0,10 g/ml; terra diatomácea: 0,10 g Celite® 545/g óleo de manteiga.

TABELA D.3 Teores de umidade e óleo nas tortas resultantes do estudo do efeito da variação do pH da solução de quilaia e da temperatura no processo SLL.

| Tratamento pH / Temperatura | Composição da torta ^b | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------|----------------|-----------------|
| | N ^a | % óleo (m/m) | N ^a | % umidade (m/m) |
| 3,0 / 45 °C | 2 | 7,3 ± 0,8 | 4 | 54,3 ± 0,5 |
| 3,0 / 65 °C | 2 | 5,9 ± 2,2 | 4 | 55,5 ± 0,4 |
| 4,2 / 45 °C | 2 | 7,0 ± 0,1 | 4 | 55,2 ± 0,8 |
| 4,2 / 65 °C | 2 | 6,4 ± 1,1 | 4 | 65,0 ± 5,3 |
| 7,0 / 45 °C | 2 | 5,8 ± 0,5 | 4 | 43,4 ± 9,2 |
| 7,0 / 65 °C | 2 | 5,7 ± 0,9 | 4 | 55,8 ± 0,5 |
| Média Global | 12 | 6,4 ± 1,2 | 24 | 54,9 ± 7,5 |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão.

TABELA D.4. Concentrações de colesterol na fase aquosa e seletivamente associado à torta, obtidos por balanço de massa, para estudo do efeito da variação do pH da solução de quilaia no processo SLL.

| pH | Concentração de colesterol | |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | na fase aquosa (XFA, mg/ml) | associado ao Celite® (XCELT, mg/g) |
| 3,0 | 0,29 | 0,38 |
| 4,2 | 0,11 | 0,24 |
| 7,0 | - | 0,20 |
| Média Global | 0,20 | 0,28 |

APÊNDICE E. Resultados detalhados do estudo do efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) nos níveis de remoção de colesterol obtidos pelo processo sólido-líquido-líquido (SLL)

TABELA E.1. Análise de variância: efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no teor de colesterol da fase oleosa resultante do processo SLL.

Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|---------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------------|
| CSQ | 3 | 0,9190915 | 0,3063638 | 23,58 | 0,0001 |
| QTD | 2 | 1,1305366 | 0,5652683 | 43,51 | 0,0001 |
| CQS*QTD | 6 | 0,2005404 | 0,0334234 | 2,57 | 0,0379 |
| Resíduo | 32 | 0,4157308 | 0,0129916 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| Conc. solução de quilaia (CSQ) | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g ml ⁻¹ | 10 | 2,24 ± 0,19 | A |
| 0,15 g ml ⁻¹ | 10 | 2,14 ± 0,13 | A |
| 0,25 g ml ⁻¹ | 12 | 2,17 ± 0,20 | A |
| 0,35 g ml ⁻¹ | 12 | 1,88 ± 0,29 | B |

| Quant. terra diatomácea (QTD) | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|-------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g g ⁻¹ óleo | 14 | 2,29 ± 0,13 | A |
| 0,15 g g ⁻¹ óleo | 14 | 2,13 ± 0,17 | B |
| 0,25 g g ⁻¹ óleo | 16 | 1,91 ± 0,25 | C |

| Tratamento CSQ / QTD | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|---|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,39 ± 0,13 | A |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,24 ± 0,10 | A B |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,14 ± 0,19 | A B C |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,24 ± 0,08 | A B |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 3 | 2,22 ± 0,06 | A B |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,01 ± 0,05 | B C |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,37 ± 0,06 | A |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,20 ± 0,14 | A B |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 1,94 ± 0,05 | B C |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 2,17 ± 0,11 | A B C |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 1,91 ± 0,09 | C |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 1,55 ± 0,17 | D |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são significativamente distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g/50 ml; temperatura: 65 °C; pH da solução de quilaia: 4,2.

TABELA E.2. Análise de variância: efeito combinado da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no teor de colesterol da torta de terra diatomácea resultante do processo SLL.

Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|---------|--------------------|--------------------|----------------|--------|--------------|
| CSQ | 3 | 0,3636383 | 0,1212128 | 64,88 | 0,0001 |
| QTD | 2 | 0,7128762 | 0,3564381 | 190,79 | 0,0001 |
| CQS*QTD | 6 | 0,0053597 | 0,0008933 | 0,48 | 0,8199 |
| Resíduo | 35 | 0,0653869 | 0,0018682 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| Conc. solução de quilaia | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|--------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g ml ⁻¹ | 12 | 0,31 ± 0,12 | A |
| 0,15 g ml ⁻¹ | 11 | 0,46 ± 0,14 | B |
| 0,25 g ml ⁻¹ | 12 | 0,51 ± 0,14 | C |
| 0,35 g ml ⁻¹ | 12 | 0,53 ± 0,14 | C |

| Quant. terra diatomácea | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g g ⁻¹ óleo | 15 | 0,32 ± 0,08 | A |
| 0,15 g g ⁻¹ óleo | 16 | 0,42 ± 0,11 | B |
| 0,25 g g ⁻¹ óleo | 16 | 0,61 ± 0,11 | C |

| Tratamento CSQ / QTD | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
|---|----------------|-------------------------|--------------------|
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,20 ± 0,01 | A |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,27 ± 0,02 | A B |
| 0,05 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,46 ± 0,03 | D E |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 3 | 0,30 ± 0,01 | A B C |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,43 ± 0,04 | D E |
| 0,15 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,61 ± 0,07 | F |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,37 ± 0,02 | B C D |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,48 ± 0,09 | E |
| 0,25 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,68 ± 0,02 | F |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,05 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,39 ± 0,05 | C D E |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,15 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,50 ± 0,04 | E |
| 0,35 g ml ⁻¹ / 0,25 g g ⁻¹ óleo | 4 | 0,71 ± 0,01 | F |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são significativamente distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,71 mg/g; quilaia: BELL; proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g/50 ml; temperatura: 65 °C; pH da solução de quilaia: 4,2.

TABELA E.3. Teores de umidade e óleo nas tortas resultantes do estudo do efeito da variação da concentração da solução de quilaia (CSQ) e da quantidade de terra diatomácea (QTD) no processo SLL.

| Tratamento | | Composição da torta ^b | | | |
|--------------|----------------|----------------------------------|--------------|----------------|-----------------|
| CSQ (g/ml) | QTD (g/g óleo) | N ^a | % óleo (m/m) | N ^a | % umidade (m/m) |
| 0,05 | 0,05 | 2 | 3,8 ± 0,3 | 4 | 56,0 ± 0,6 |
| | 0,15 | 2 | 5,5 ± 0,6 | 4 | 56,6 ± 0,1 |
| | 0,25 | 2 | 12,2 ± 0,1 | 4 | 54,9 ± 0,6 |
| 0,15 | 0,05 | 2 | 3,3 ± 0,5 | 4 | 56,0 ± 0,6 |
| | 0,15 | 2 | 7,5 ± 1,8 | 4 | 52,7 ± 0,9 |
| | 0,25 | 2 | 10,3 ± 3,8 | 4 | 53,0 ± 1,7 |
| 0,25 | 0,05 | 2 | 7,6 ± 2,4 | 4 | 50,0 ± 1,8 |
| | 0,15 | 2 | 9,5 ± 0,7 | 4 | 50,7 ± 1,4 |
| | 0,25 | 2 | 13,5 ± 0,7 | 4 | 47,8 ± 1,2 |
| 0,35 | 0,05 | 2 | 6,0 ± 2,9 | 4 | 50,0 ± 1,8 |
| | 0,15 | 2 | 7,3 ± 2,1 | 4 | 49,9 ± 1,4 |
| | 0,25 | 2 | 11,6 ± 1,5 | 4 | 47,9 ± 1,1 |
| Média Global | | 24 | 8,2 ± 3,5 | 48 | 52,1 ± 3,3 |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão.

TABELA E.4. Concentrações de colesterol na fase aquosa e seletivamente associado à torta, obtidos por balanço de massa, para estudo do efeito da quantidade de terra diatomácea (QTD) no processo SLL.

| Tratamento | | Concentração de colesterol | |
|--------------|----------------|-----------------------------|------------------------------------|
| CSQ (g/ml) | QTD (g/g óleo) | na fase aquosa (XFA, mg/ml) | associado ao Celite® (XCELT, mg/g) |
| 0,05 | 0,05 | 0,33 | 0,26 |
| | 0,15 | 0,53 | 0,39 |
| | 0,25 | 0,72 | 0,67 |
| 0,15 | 0,05 | 0,47 | 0,57 |
| | 0,15 | 0,49 | 0,65 |
| | 0,25 | 0,67 | 1,07 |
| 0,25 | 0,05 | 0,33 | 0,45 |
| | 0,15 | 0,50 | 0,62 |
| | 0,25 | 0,72 | 1,08 |
| 0,35 | 0,05 | 0,54 | 0,60 |
| | 0,15 | 0,82 | 0,86 |
| | 0,25 | 1,19 | 1,31 |
| Média Global | | 0,61 | 0,71 |

TABELA E.5. Concentrações de colesterol na fase aquosa e seletivamente associado à torta, obtidos por balanço de massa, para estudo do efeito da concentração da solução de quilaia (CSQ) no processo SLL.

| Tratamento | | Concentração de colesterol | |
|-------------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| QTD (g/g óleo) | CSQ (g/ml) | na fase aquosa (XFA, mg/ml) | associado ao Celite® (XCELT, mg/g) |
| 0,05 | 0,05 | 0,33 | 0,26 |
| | 0,15 | 0,47 | 0,57 |
| | 0,25 | 0,33 | 0,45 |
| | 0,35 | 0,54 | 0,60 |
| 0,15 | 0,05 | 0,53 | 0,39 |
| | 0,15 | 0,49 | 0,65 |
| | 0,25 | 0,50 | 0,62 |
| | 0,35 | 0,82 | 0,86 |
| 0,25 | 0,05 | 0,72 | 0,67 |
| | 0,15 | 0,67 | 1,07 |
| | 0,25 | 0,72 | 1,08 |
| | 0,35 | 1,19 | 1,31 |
| Média Global | | 0,61 | 0,71 |

APÊNDICE F. Resultados detalhados do estudo da evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato nas etapas dos processos de separação LL e SLL

TABELA F.1. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa líquido-líquido (LL) a várias concentrações da solução de quilaia.

Concentração da solução de quilaia = 0,05 g/ml

| Tempo de contato na etapa líquido-líquido (min) | N ^a | Colesterol na fase oleosa ^b | | |
|---|----------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Média | Limite inferior | Limite superior |
| 0 | 3 | 2,75 | 2,53 | 2,98 |
| 10 | 4 | 2,59 | 2,40 | 2,79 |
| 20 | 4 | 2,71 | 2,60 | 2,82 |
| 30 | 4 | 2,56 | 2,46 | 2,65 |
| 60 | 3 | 2,49 | 2,24 | 2,75 |
| 90 | 4 | 2,47 | 2,20 | 2,74 |

Concentração da solução de quilaia = 0,20 g/ml

| Tempo de contato na etapa líquido-líquido (min) | N ^a | Colesterol na fase oleosa ^b | | |
|---|----------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Média | Limite inferior | Limite superior |
| 0 | 3 | 2,75 | 2,53 | 2,98 |
| 10 | 4 | 2,51 | 2,38 | 2,65 |
| 20 | 3 | 2,33 | 2,25 | 2,41 |
| 30 | 4 | 2,33 | 2,23 | 2,43 |
| 60 | 4 | 2,07 | 1,86 | 2,27 |
| 90 | 4 | 2,22 | 2,17 | 2,27 |

Concentração da solução de quilaia = 0,35 g/ml

| Tempo de contato na etapa líquido-líquido (min) | N ^a | Colesterol na fase oleosa ^b | | |
|---|----------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Média | Limite inferior | Limite superior |
| 0 | 3 | 2,75 | 2,53 | 2,98 |
| 10 | 4 | 2,34 | 2,24 | 2,44 |
| 20 | 4 | 2,28 | 2,12 | 2,44 |
| 30 | 3 | 2,28 | 2,19 | 2,38 |
| 60 | 4 | 2,26 | 2,22 | 2,30 |
| 90 | 4 | 2,13 | 2,11 | 2,15 |

^a número de observações; ^b média e intervalo com nível de confiança de 95%, em mg/g amostra. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,75 mg/g; quilaia: BELL; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; pH da solução de quilaia: 4,35; agitação: #6; temperatura: 55 °C.

TABELA F.2. Evolução do teor de colesterol na fase oleosa com o tempo de contato na etapa sólido-líquido-líquido (SLL) a várias concentrações da solução de quilaia.

Concentração da solução de quilaia = 0,05 g/ml

| Tempo de contato na etapa sólido-líquido-líquido (min) | N ^a | Colesterol na fase oleosa ^b | | |
|--|----------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Média | Limite inferior | Limite superior |
| 0 | 4 | 2,65 | 2,55 | 2,75 |
| 10 | 4 | 2,59 | 2,54 | 2,64 |
| 20 | 3 | 2,63 | 2,50 | 2,76 |
| 30 | 4 | 2,49 | 2,21 | 2,78 |
| 60 | 3 | 2,44 | 2,10 | 2,79 |
| 90 | 4 | 2,59 | 2,50 | 2,69 |

Concentração da solução de quilaia = 0,20 g/ml

| Tempo de contato na etapa sólido-líquido-líquido (min) | N ^a | Colesterol na fase oleosa ^b | | |
|--|----------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Média | Limite inferior | Limite superior |
| 0 | 4 | 2,16 | 1,95 | 2,36 |
| 10 | 4 | 2,21 | 2,08 | 2,33 |
| 20 | 4 | 2,19 | 1,90 | 2,47 |
| 30 | 4 | 2,13 | 1,91 | 2,35 |
| 60 | 3 | 1,96 | 1,81 | 2,10 |
| 90 | 4 | 1,98 | 1,60 | 2,36 |

Concentração da solução de quilaia = 0,35 g/ml

| Tempo de contato na etapa sólido-líquido-líquido (min) | N ^a | Colesterol na fase oleosa ^b | | |
|--|----------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Média | Limite inferior | Limite superior |
| 0 | 4 | 1,72 | 1,57 | 1,88 |
| 10 | 4 | 1,71 | 1,57 | 1,85 |
| 20 | 3 | 1,70 | 1,63 | 1,76 |
| 30 | 4 | 1,71 | 1,62 | 1,79 |
| 60 | 2 | 1,60 | 1,25 | 1,96 |
| 90 | 3 | 1,61 | 1,45 | 1,77 |

^a número de observações; ^b média e intervalo com nível de confiança de 95%, em mg/g amostra. Outros parâmetros experimentais: teor de colesterol no óleo de manteiga: 2,75 mg/g; quilaia: BELL; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga; tempo de contato na etapa líquido-líquido: 90 min.; pH da solução de quilaia: 4,35; agitação: #6; temperatura: 55 °C.

APÊNDICE G. Resultados detalhados do estudo da distribuição de colesterol entre as fases resultantes dos processos de separação LL e SLL

TABELA G.1. Teores de colesterol nos óleos de manteiga iniciais e nas fases oleosas resultantes do processo de separação LL, a várias concentrações da solução de quilaia.

| Concentração da solução de quilaia (g/ml) | Teor de colesterol (mg/g) ^b | | | |
|---|--|------------------|----------------|-------------|
| | N ^a | Óleo de manteiga | N ^a | Fase oleosa |
| 0,05 | 4 | 0,73 ± 0,01 | 4 | 0,73 ± 0,01 |
| | 4 | 1,27 ± 0,15 | 3 | 1,20 ± 0,04 |
| | 4 | 1,80 ± 0,09 | 4 | 1,65 ± 0,09 |
| | 4 | 2,36 ± 0,15 | 4 | 2,21 ± 0,09 |
| | 4 | 3,04 ± 0,10 | 4 | 2,66 ± 0,07 |
| 0,20 | 4 | 0,73 ± 0,01 | 4 | 0,73 ± 0,02 |
| | 4 | 1,27 ± 0,15 | 3 | 1,21 ± 0,03 |
| | 4 | 1,80 ± 0,09 | 4 | 1,63 ± 0,03 |
| | 4 | 2,36 ± 0,15 | 4 | 2,10 ± 0,09 |
| | 4 | 3,04 ± 0,10 | 4 | 2,47 ± 0,14 |
| 0,35 | 4 | 0,73 ± 0,01 | 4 | 0,73 ± 0,01 |
| | 4 | 1,27 ± 0,15 | 3 | 1,15 ± 0,02 |
| | 4 | 1,80 ± 0,09 | 4 | 1,63 ± 0,07 |
| | 4 | 2,36 ± 0,15 | 4 | 2,06 ± 0,08 |
| | 4 | 3,04 ± 0,10 | 4 | 2,45 ± 0,05 |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão. Outros parâmetros experimentais: quilaia: BELL; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; pH da solução de quilaia: 4,15; temperatura: 55 °C.

TABELA G.2. Concentrações de colesterol na fases aquosas, obtidas por balanço de massa, para estudo da distribuição de colesterol entre fases resultantes do processo de separação LL, a várias concentrações da solução de quilaia.

| Tratamento | | Concentração de colesterol na fase aquosa (XFA, mg/ml) |
|---|------------------------------------|--|
| Concentração da solução de quilaia (g/ml) | Óleo de manteiga (mg colesterol/g) | |
| 0,20 | 0,73 | 0,01 |
| | 1,27 | 0,06 |
| | 1,80 | 0,17 |
| | 2,36 | 0,26 |
| | 3,04 | 0,57 |
| 0,35 | 0,73 | 0,01 |
| | 1,27 | 0,12 |
| | 1,80 | 0,17 |
| | 2,36 | 0,30 |
| | 3,04 | 0,60 |

Parâmetros experimentais: quilaia: BELL; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; pH da solução de quilaia: 4,15; temperatura: 55 °C.

TABELA G.3. Teores de colesterol nos óleos de manteiga iniciais, fases oleosas e tortas resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

| Concentração da solução de quilaia (g/ml) | Teor de colesterol (mg/g) ^b | | | | | |
|---|--|---------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | N ^a | Óleo de manteiga | N ^a | Fase oleosa | N ^a | Torta anidra |
| 0,05 | 4 | 0,73 ± 0,01 | 4 | 0,74 ± 0,08 | 4 | 0,19 ± 0,02 |
| | 4 | 1,27 ± 0,15 | 4 | 1,22 ± 0,02 | 3 | 0,31 ± 0,03 |
| | 4 | 1,80 ± 0,09 | 4 | 1,62 ± 0,07 | 4 | 0,45 ± 0,03 |
| | 4 | 2,36 ± 0,15 | 4 | 1,95 ± 0,09 | 4 | 0,65 ± 0,03 |
| | 4 | 3,04 ± 0,10 | 4 | 2,63 ± 0,17 | 4 | 0,72 ± 0,04 |
| 0,20 | 4 | 0,73 ± 0,01 | 4 | 0,73 ± 0,02 | 4 | 0,16 ± 0,05 |
| | 4 | 1,27 ± 0,15 | 4 | 1,14 ± 0,06 | 4 | 0,34 ± 0,04 |
| | 4 | 1,80 ± 0,09 | 4 | 1,62 ± 0,11 | 4 | 0,52 ± 0,02 |
| | 4 | 2,36 ± 0,15 | 4 | 2,01 ± 0,07 | 3 | 0,76 ± 0,09 |
| | 4 | 3,04 ± 0,10 | 4 | 2,42 ± 0,13 | 3 | 1,02 ± 0,13 |
| 0,35 | 4 | 0,73 ± 0,01 | 4 | 0,73 ± 0,06 | 4 | 0,17 ± 0,02 |
| | 4 | 1,27 ± 0,15 | 4 | 1,13 ± 0,08 | 4 | 0,42 ± 0,05 |
| | 4 | 1,80 ± 0,09 | 4 | 1,52 ± 0,14 | 4 | 0,65 ± 0,09 |
| | 4 | 2,36 ± 0,15 | 4 | 1,77 ± 0,12 | 4 | 0,88 ± 0,16 |
| | 4 | 3,04 ± 0,10 | 4 | 2,11 ± 0,19 | 4 | 1,20 ± 0,14 |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão. Outros parâmetros experimentais: quilaia: BELL; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH da solução de quilaia: 4,15; temperatura: 55 °C.

TABELA G.4. Teor de óleo nas tortas resultantes do estudo da distribuição de colesterol entre fases resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

| Tratamento | | Torta anidra | |
|---|------------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| Concentração da solução de quilaia (g/ml) | Óleo de manteiga (mg colesterol/g) | N ^a | Teor de óleo ^b (% m/m) |
| 0,05 | 0,73 | 2 | 20,9 ± 1,2 |
| | 1,27 | 2 | 16,3 ± 4,0 |
| | 1,80 | 2 | 15,3 ± 0,4 |
| | 2,36 | 2 | 16,1 ± 0,3 |
| | 3,04 | 2 | 13,3 ± 1,1 |
| 0,20 | 0,73 | 2 | 14,9 ± 5,8 |
| | 1,27 | 2 | 14,7 ± 3,0 |
| | 1,80 | 2 | 12,7 ± 1,9 |
| | 2,36 | 2 | 16,8 ± 1,0 |
| | 3,04 | 2 | 18,6 ± 1,1 |
| 0,35 | 0,73 | 2 | 11,2 ± 2,7 |
| | 1,27 | 2 | 16,8 ± 1,0 |
| | 1,80 | 2 | 17,9 ± 3,8 |
| | 2,36 | 2 | 18,6 ± 3,5 |
| | 3,04 | 2 | 18,4 ± 4,0 |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão. Parâmetros experimentais: quilaia: BELL; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH da solução de quilaia: 4,15; temperatura: 55 °C.

TABELA G.5. Concentrações de colesterol na fase aquosa e seletivamente associado à torta, obtidas por balanço de massa, para estudo da distribuição de colesterol entre fases resultantes do processo de separação SLL, a várias concentrações da solução de quilaia.

| Tratamento | | Concentração de colesterol | |
|---|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Concentração da solução de quilaia (g/ml) | Óleo de manteiga (mg colesterol/g) | na fase aquosa (XFA, mg/ml) | associado ao Celite® (XCELT, mg/g) |
| 0,20 | 0,73 | 0,02 | 0,07 |
| | 1,27 | 0,09 | 0,21 |
| | 1,80 | 0,13 | 0,36 |
| | 2,36 | 0,30 | 0,50 |
| | 3,04 | 0,46 | 0,68 |
| 0,35 | 0,73 | 0,04 | 0,10 |
| | 1,27 | 0,09 | 0,27 |
| | 1,80 | 0,21 | 0,47 |
| | 2,36 | 0,48 | 0,69 |
| | 3,04 | 0,78 | 1,01 |

Parâmetros experimentais: quilaia: BELL; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH da solução de quilaia: 4,15; temperatura: 55 °C.

TABELA G.6. Cálculo da evolução dos teores de colesterol na fase oleosa em função do número de estágios de equilíbrio aplicados no processo de separação LL em fluxo cruzado.

Condições de processo:

- Concentração da solução de quilaia: 0,35 g quilaia BELL/ml solução
- Terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga
- Proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 1 ml/1 g
- pH da solução de quilaia: 4,15
- Temperatura: 55 °C
- Teor de colesterol no óleo de manteiga inicial: 2,40 mg/g
- Equação descrevendo o equilíbrio em cada estágio de contato:

$$Y = -0,0050313 + 1,0366 X - 0,074272 X^2 \quad (R^2 = 0,999)$$

onde: X = teor de colesterol no que entra no estágio de separação, em mg/g, e

Y = teor de colesterol que sai do estágio de separação, em mg/g.

| Teor de colesterol (mg/g) | | Estágio nº | Nível de remoção de colesterol | |
|--|---|---------------|--------------------------------------|-------------------|
| no óleo que entra no estágio de separação (X) | no óleo que sai do separação (Y) | | no estágio (%) | cumulativo (%) |
| 2.40 | 2.06 | 1 | 14.37 | 14.37 |
| 2.06 | 1.81 | 2 | 11.85 | 24.52 |
| 1.81 | 1.63 | 3 | 10.07 | 32.12 |
| 1.63 | 1.49 | 4 | 8.75 | 38.06 |
| 1.49 | 1.37 | 5 | 7.72 | 42.84 |
| 1.37 | 1.28 | 6 | 6.90 | 46.78 |
| 1.28 | 1.20 | 7 | 6.22 | 50.09 |
| 1.20 | 1.13 | 8 | 5.66 | 52.92 |
| 1.13 | 1.07 | 9 | 5.18 | 55.35 |
| 1.07 | 1.02 | 10 | 4.77 | 57.48 |
| 1.02 | 0.98 | 11 | 4.41 | 59.36 |
| 0.98 | 0.94 | 12 | 4.10 | 61.02 |
| 0.94 | 0.90 | 13 | 3.83 | 62.52 |
| 0.90 | 0.87 | 14 | 3.58 | 63.86 |
| 0.87 | 0.84 | 15 | 3.36 | 65.07 |
| 0.84 | 0.81 | 16 | 3.17 | 66.18 |
| 0.81 | 0.79 | 17 | 2.99 | 67.19 |
| 0.79 | 0.77 | 18 | 2.83 | 68.12 |
| 0.77 | 0.74 | 19 | 2.68 | 68.97 |
| 0.74 | 0.73 | 20 | 2.55 | 69.76 |
| 0.73 | 0.71 | 21 | 2.42 | 70.50 |
| 0.71 | 0.69 | 22 | 2.31 | 71.18 |
| 0.69 | 0.68 | 23 | 2.21 | 71.81 |
| 0.68 | 0.66 | 24 | 2.11 | 72.41 |
| 0.66 | 0.65 | 25 | 2.02 | 72.96 |
| 0.65 | 0.64 | 26 | 1.93 | 73.49 |
| 0.64 | 0.62 | 27 | 1.86 | 73.98 |
| 0.62 | 0.61 | 28 | 1.78 | 74.44 |
| 0.61 | 0.60 | 29 | 1.72 | 74.88 |
| 0.60 | 0.59 | 30 | 1.65 | 75.30 |

TABELA G.7. Cálculo da evolução dos teores de colesterol na fase oleosa em função do número de estágios de equilíbrio aplicados no processo de separação SLL em fluxo cruzado.

Condições de processo:

- Concentração da solução de quilaia: 0,35 g quilaia BELL/ml solução
- Terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga
- Proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 1 ml/1 g
- pH da solução de quilaia: 4,15
- Temperatura: 55 °C
- Teor de colesterol no óleo de manteiga inicial: 2,40 mg/g
- Equação descrevendo o equilíbrio em cada estágio de contato:

$$Y = -0,0050313 + 1,0366 X - 0,074272 X^2 \quad (R^2 = 0,999)$$

onde: X = teor de colesterol no que entra no estágio de separação, em mg/g, e

Y = teor de colesterol que sai do estágio de separação, em mg/g.

| Teor de colesterol (mg/g) | | Estágio nº | Nível de remoção de colesterol | |
|--|---|---------------|--------------------------------------|-------------------|
| no óleo que entra no estágio de separação (X) | no óleo que sai do separação (Y) | | no estágio (%) | cumulativo (%) |
| | | | | |
| 2.40 | 1.83 | 1 | 23.73 | 23.73 |
| 1.83 | 1.52 | 2 | 17.01 | 36.70 |
| 1.52 | 1.32 | 3 | 13.30 | 45.12 |
| 1.32 | 1.17 | 4 | 10.86 | 51.08 |
| 1.17 | 1.07 | 5 | 9.11 | 55.54 |
| 1.07 | 0.98 | 6 | 7.79 | 59.00 |
| 0.98 | 0.92 | 7 | 6.75 | 61.76 |
| 0.92 | 0.86 | 8 | 5.91 | 64.02 |
| 0.86 | 0.82 | 9 | 5.21 | 65.90 |
| 0.82 | 0.78 | 10 | 4.63 | 67.47 |
| 0.78 | 0.75 | 11 | 4.13 | 68.82 |
| 0.75 | 0.72 | 12 | 3.70 | 69.97 |
| 0.72 | 0.70 | 13 | 3.33 | 70.97 |
| 0.70 | 0.68 | 14 | 3.00 | 71.84 |
| 0.68 | 0.66 | 15 | 2.72 | 72.61 |
| 0.66 | 0.64 | 16 | 2.46 | 73.28 |
| 0.64 | 0.63 | 17 | 2.24 | 73.88 |
| 0.63 | 0.61 | 18 | 2.04 | 74.41 |
| 0.61 | 0.60 | 19 | 1.85 | 74.89 |
| 0.60 | 0.59 | 20 | 1.69 | 75.31 |

APÊNDICE H. Resultados detalhados do estudo do efeito da procedência das quilaia nos níveis de remoção de colesterol dos processos de separação LL e SLL.

TABELA H.1. Análise de variância: efeito da procedência das quilaia nos teores de colesterol das fases oleosas resultantes dos processos LL e SLL.

| Análise de variância | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|--------------|
| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
| Tratamento | 4 | 6,6143957 | 1,6535989 | 593,21 | 0,0001 |
| Resíduo | 15 | 0,0418135 | 0,0027876 | | |

| Comparação das médias dos tratamentos | | | |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| Tratamento | N ^a | Colesterol ^b | Grupo ^c |
| Branco (BR) | 4 | 2,65 ± 0,03 | A |
| Processo LL, quilaia BELL (LL/B) | 4 | 2,42 ± 0,03 | B |
| Processo LL, quilaia PENCO (LL/P) | 4 | 2,17 ± 0,02 | C |
| Processo SLL, quilaia BELL (SLL/B) | 4 | 1,54 ± 0,06 | D |
| Processo SLL, quilaia PENCO (SLL/P) | 4 | 1,10 ± 0,09 | E |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão do teor de colesterol, em mg/g de amostra; ^c tratamentos num mesmo grupo não são significativamente distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: proporção óleo de manteiga/solução de quilaia: 50 g / 50 ml; concentração das soluções de quilaia: 0,40 g/ml; terra diatomácea: 0,25 g Celite® 545/g óleo de manteiga; pH das soluções de quilaia: 4,65; temperatura: 55 °C.

TABELA H.2. Teores de colesterol nos óleos de manteiga iniciais e nas fases oleosas resultantes do processo de separação SLL, utilizando a quilaia PENCO.

| N ^a | Óleo de manteiga (mg/g) ^b | N ^a | Fase oleosa (mg/g) ^b |
|----------------|--------------------------------------|----------------|---------------------------------|
| 4 | 0,73 ± 0,01 | 3 | 0,61 ± 0,02 |
| 4 | 1,27 ± 0,15 | 4 | 0,73 ± 0,04 |
| 4 | 1,80 ± 0,09 | 4 | 0,92 ± 0,01 |
| 4 | 2,36 ± 0,15 | 4 | 1,11 ± 0,04 |
| 4 | 3,04 ± 0,10 | 4 | 1,18 ± 0,04 |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão. Outros parâmetros experimentais: quilaia: PENCO; concentração da solução de quilaia: 0,35 g/ml; terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga; proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 50 ml/50 g; pH da solução de quilaia: 4,65; temperatura: 55 °C.

TABELA H.3. Cálculo da evolução dos teores de colesterol na fase oleosa em função do número de estágios de equilíbrio aplicados no processo de separação SLL em fluxo cruzado.

Condições de processo:

- Concentração da solução de quilaia: 0,35 g quilaia PENCO/ml solução
- Terra diatomácea: 0,15 g Celite® 545/g óleo de manteiga
- Proporção solução de quilaia/óleo de manteiga: 1 ml/1 g
- pH da solução de quilaia: 4,65
- Temperatura: 55 °C
- Teor de colesterol no óleo de manteiga inicial: 2,40 mg/g
- Equação descrevendo o equilíbrio em cada estágio de contato:

$$Y = 0,039687 + 0,72205 X - 0,11561 X^2 \quad (R^2 = 0,982)$$

onde: X = teor de colesterol no que entra no estágio de separação, em mg/g, e

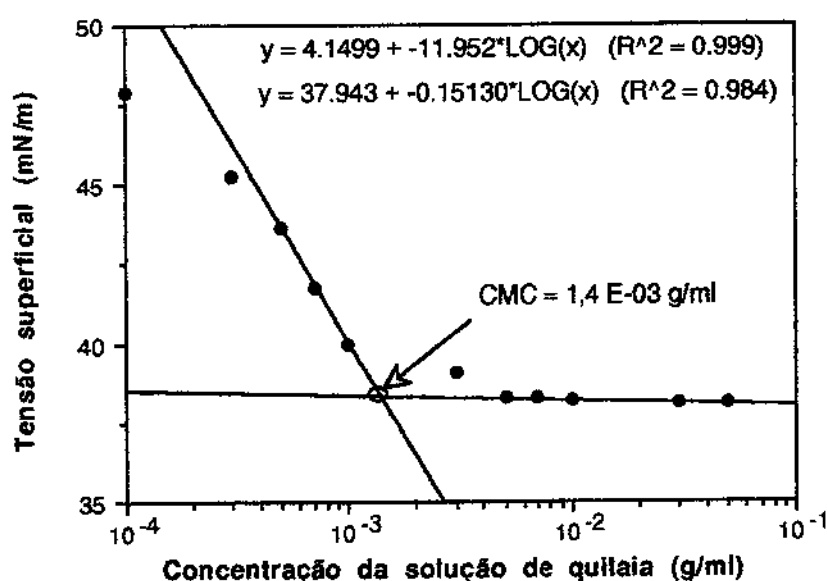
Y = teor de colesterol que sai do estágio de separação, em mg/g.

| Teor de colesterol (mg/g) | | Estágio nº | Nível de remoção de colesterol | |
|--|---|---------------|--------------------------------------|-------------------|
| no óleo que entra no estágio de separação (X) | no óleo que sai do separação (Y) | | no estágio (%) | cumulativo (%) |
| 2.40 | 1.11 | 1 | 53.89 | 53.89 |
| 1.11 | 0.70 | 2 | 37.00 | 70.95 |
| 0.70 | 0.49 | 3 | 30.16 | 79.71 |
| 0.49 | 0.36 | 4 | 25.27 | 84.84 |
| 0.36 | 0.29 | 5 | 21.09 | 88.04 |
| 0.29 | 0.24 | 6 | 17.29 | 90.11 |
| 0.24 | 0.20 | 7 | 13.83 | 91.47 |
| 0.20 | 0.18 | 8 | 10.77 | 92.39 |
| 0.18 | 0.17 | 9 | 8.17 | 93.01 |
| 0.17 | 0.16 | 10 | 6.06 | 93.44 |
| 0.16 | 0.15 | 11 | 4.42 | 93.73 |
| 0.15 | 0.15 | 12 | 3.17 | 93.93 |
| 0.15 | 0.14 | 13 | 2.25 | 94.06 |
| 0.14 | 0.14 | 14 | 1.59 | 94.16 |
| 0.14 | 0.14 | 15 | 1.11 | 94.22 |
| 0.14 | 0.14 | 16 | 0.78 | 94.27 |
| 0.14 | 0.14 | 17 | 0.54 | 94.30 |
| 0.14 | 0.14 | 18 | 0.37 | 94.32 |
| 0.14 | 0.14 | 19 | 0.26 | 94.33 |
| 0.14 | 0.14 | 20 | 0.18 | 94.34 |

APÊNDICE I. Resultados detalhados da determinação da concentração de micela crítica (CMC) das quilaia PENCO e BELL

| Concentração da solução (g/ml) | N ^a | Tensão superficial ^b (mN/m) |
|--------------------------------|----------------|--|
| $1,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $47,88 \pm 1,35$ |
| $3,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $45,26 \pm 0,39$ |
| $5,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $43,64 \pm 0,42$ |
| $7,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $41,79 \pm 0,11$ |
| $1,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $40,04 \pm 0,72$ |
| $3,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $39,11 \pm 0,53$ |
| $5,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $38,28 \pm 0,30$ |
| $7,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $38,28 \pm 0,20$ |
| $1,0 \times 10^{-2}$ | 6 | $38,25 \pm 0,13$ |
| $3,0 \times 10^{-2}$ | 6 | $38,17 \pm 0,16$ |
| $5,0 \times 10^{-2}$ | 6 | $38,14 \pm 0,08$ |

^a número de observações; ^b média \pm desvio padrão.

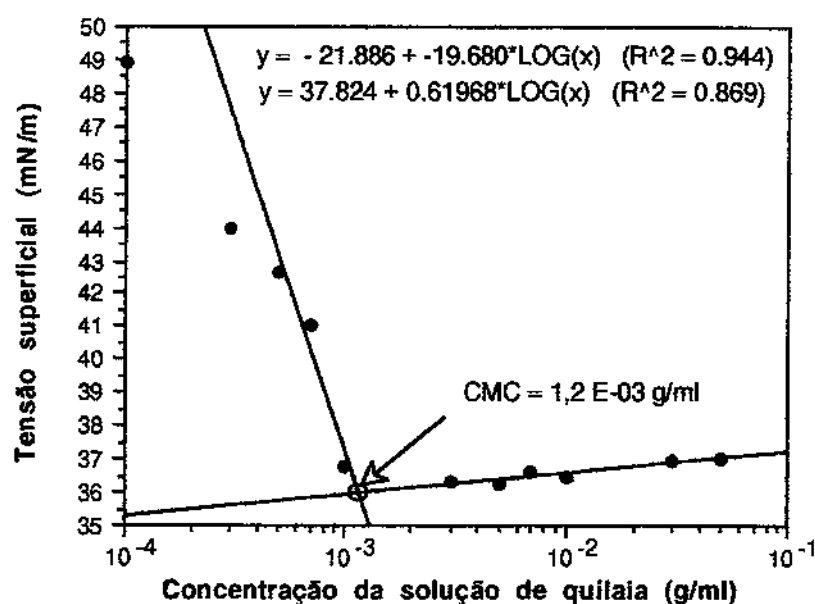


Cálculo da CMC: $4,1499 - 11,952 \log \text{CMC} = 37,493 - 0,15130 \log \text{CMC}$
 $\Rightarrow -11,8007 \log \text{CMC} = 33,7931$
 $\Rightarrow \text{CMC} = 1,369 \times 10^{-3} \text{ g/ml} \approx 1,4 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$

FIGURA I.1. Determinação da CMC da quilaia PENCO a 25 °C e pH 4,6 através da tensão superficial das soluções aquosas.

| Concentração da solução (g/ml) | N ^a | Tensão superficial ^b (mN/m) |
|-----------------------------------|----------------|---|
| $1,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $48,91 \pm 2,33$ |
| $3,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $43,94 \pm 0,98$ |
| $5,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $42,65 \pm 0,68$ |
| $7,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $41,03 \pm 0,64$ |
| $1,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $36,75 \pm 1,10$ |
| $3,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $36,35 \pm 0,70$ |
| $5,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $36,24 \pm 0,27$ |
| $7,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $36,60 \pm 0,32$ |
| $1,0 \times 10^{-2}$ | 6 | $36,49 \pm 0,36$ |
| $3,0 \times 10^{-2}$ | 6 | $36,97 \pm 0,11$ |
| $5,0 \times 10^{-2}$ | 6 | $36,98 \pm 0,05$ |

^a número de observações; ^b média \pm desvio padrão.

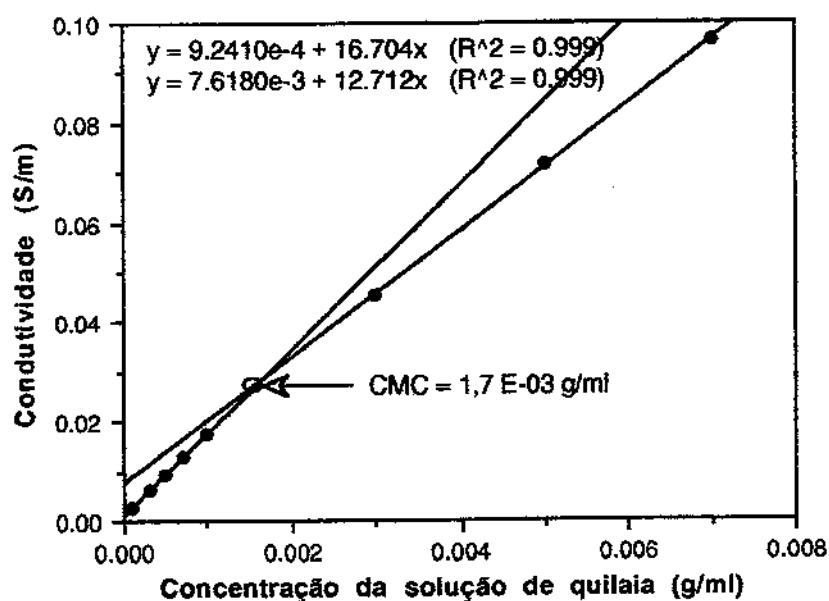


Cálculo da CMC: $-21,866 - 19,680 \log \text{CMC} = 37,824 - 0,61968 \log \text{CMC}$
 $\Rightarrow -20,29968 \log \text{CMC} = 59,690$
 $\Rightarrow \text{CMC} = 1,147 \times 10^{-3} \text{ g/ml} \approx 1,2 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$

FIGURA I.2. Determinação da CMC da quilaia BELL a 25 °C e pH 4,6 através da tensão superficial das soluções aquosas.

| Concentração da solução (g/ml) | N ^a | Condutividade ^b (S/m) |
|--------------------------------|----------------|----------------------------------|
| $1,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,002375 \pm 0,000018$ |
| $3,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,006046 \pm 0,000126$ |
| $5,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,009464 \pm 0,000055$ |
| $7,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,01271 \pm 0,00002$ |
| $1,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,01746 \pm 0,00008$ |
| $3,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,04542 \pm 0,00017$ |
| $5,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,07184 \pm 0,00050$ |
| $7,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,09627 \pm 0,00048$ |

^a número de observações; ^b média \pm desvio padrão.

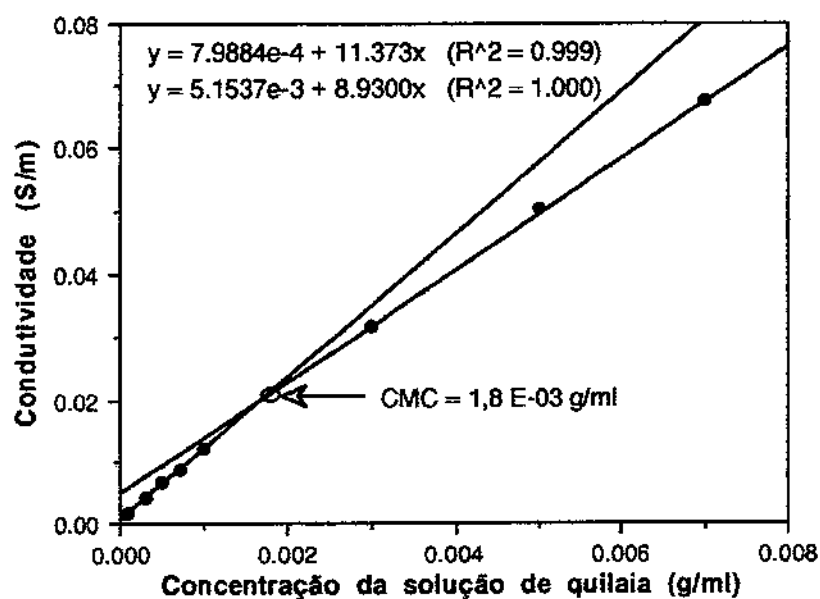


$$\begin{aligned}
 \text{Cálculo da CMC: } & 9,2410 \times 10^{-4} + 16,704 \text{ CMC} = 76,180 \times 10^{-4} + 12,712 \text{ CMC} \\
 \Rightarrow & 3,992 \text{ CMC} = 66,939 \times 10^{-4} \\
 \Rightarrow & \text{CMC} = 1,677 \times 10^{-3} \text{ g/ml} \approx 1,7 \times 10^{-3} \text{ g/ml}
 \end{aligned}$$

FIGURA I.3. Determinação da CMC da quilaia PENCO a 25 °C e pH 4,6 através da condutividade das soluções aquosas.

| Concentração da solução (g/ml) | N ^a | Condutividade ^b (S/m) |
|-----------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| $1,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,001802 \pm 0,000060$ |
| $3,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,004267 \pm 0,000020$ |
| $5,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,006600 \pm 0,000058$ |
| $7,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $0,008840 \pm 0,000091$ |
| $1,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,01206 \pm 0,00005$ |
| $3,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,03176 \pm 0,00012$ |
| $5,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,05018 \pm 0,00016$ |
| $7,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $0,06748 \pm 0,00052$ |

^a número de observações; ^b média \pm desvio padrão.

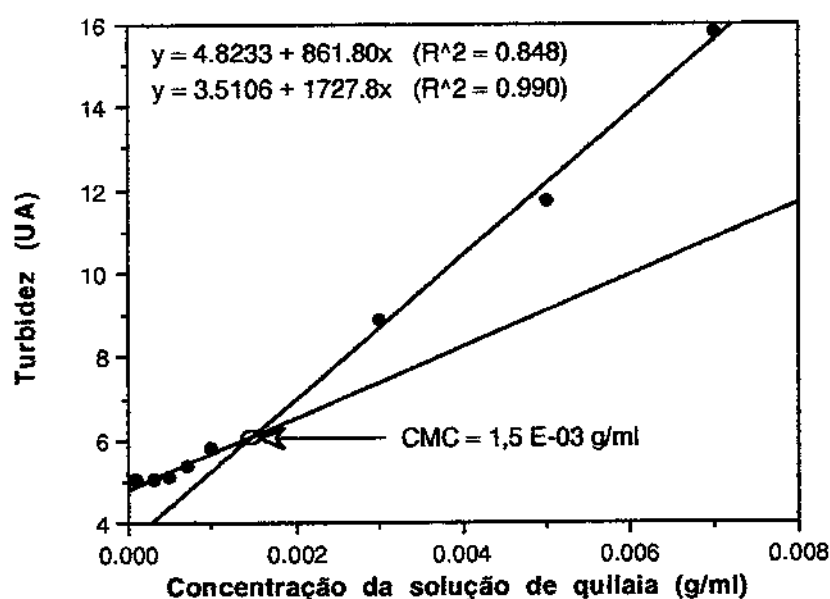


Cálculo da CMC: $7,9884 \times 10^{-4} + 11,373 \text{ CMC} = 51,537 \times 10^{-4} + 8,9300 \text{ CMC}$
 $\Rightarrow 2,443 \text{ CMC} = 43,5486 \times 10^{-4}$
 $\Rightarrow \text{CMC} = 1,783 \times 10^{-3} \text{ g/ml} \approx 1,8 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$

FIGURA I.4. Determinação da CMC da quilaia BELL a 25 °C e pH 4,6 através da condutividade das soluções aquosas.

| Concentração da solução (g/ml) | N ^a | Turbidez ^b (UA) ^c |
|--------------------------------|----------------|---|
| $1,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $5,05 \pm 0,03$ |
| $3,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $5,04 \pm 0,01$ |
| $5,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $5,12 \pm 0,12$ |
| $7,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $5,33 \pm 0,26$ |
| $1,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $5,82 \pm 0,14$ |
| $3,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $8,90 \pm 0,40$ |
| $5,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $11,74 \pm 0,36$ |
| $7,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $15,81 \pm 1,44$ |

^a número de observações; ^b média \pm desvio padrão; ^c unidades arbitrárias.

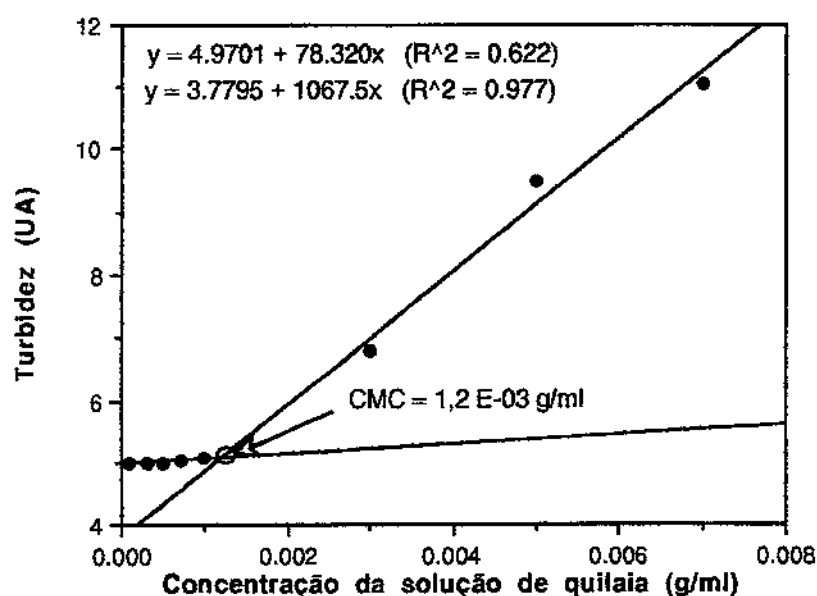


Cálculo da CMC: $4,8233 + 861,80 \text{ CMC} = 3,5106 + 1727,8 \text{ CMC}$
 $\Rightarrow 866 \text{ CMC} = 1,3127$
 $\Rightarrow \text{CMC} = 1,516 \times 10^{-3} \text{ g/ml} \approx 1,5 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$

FIGURA 1.5. Determinação da CMC da quillaia PENCO a 25 °C e pH 4,6 através da turbidez das soluções aquosas.

| Concentração da solução (g/ml) | N ^a | Turbidez ^b (UA) ^c |
|-----------------------------------|----------------|--|
| $1,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $4,99 \pm 0,02$ |
| $3,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $5,00 \pm 0,02$ |
| $5,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $4,97 \pm 0,02$ |
| $7,0 \times 10^{-4}$ | 6 | $5,02 \pm 0,08$ |
| $1,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $5,07 \pm 0,06$ |
| $3,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $6,79 \pm 0,27$ |
| $5,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $9,50 \pm 0,88$ |
| $7,0 \times 10^{-3}$ | 6 | $11,06 \pm 0,50$ |

^a número de observações; ^b média \pm desvio padrão; ^c unidades arbitrárias.



Cálculo da CMC: $4,9701 + 78,320 \text{ CMC} = 3,7795 + 1067,5 \text{ CMC}$
 $\Rightarrow 989,18 \text{ CMC} = 1,1906$
 $\Rightarrow \text{CMC} = 1,204 \times 10^{-3} \text{ g/ml} \approx 1,2 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$

FIGURA I.6. Determinação da CMC da quilaia BELL a 25 °C e pH 4,6 através da turbidez das soluções aquosas.

APÊNDICE J. Verificação do efeito da filtração nas medidas de mobilidade eletroforética e tamanho das partículas em soluções aquosas de quilaia

Uma vez que as soluções das quilaia PENCO e BELL apresentavam algum material insolúvel em suspensão, foram feitos inicialmente alguns testes visando o desenvolvimento e a padronização do preparo das soluções. Para tanto, foram executados experimentos para verificar se a filtração poderia ser empregada com sucesso na eliminação destes insolúveis e, caso empregada, se provocaria alguma variação nas propriedades eletrocinéticas medidas das soluções, especificamente na mobilidade eletroforética (MEF) e diâmetro de Stokes (D_{St}) das partículas.

Foram empregados 3 tratamentos para cada uma das quilaia, quais sejam: 1) solução não filtrada (NF), 2) solução filtrada através de papel de filtro Whatman # 1 (W#1) e 3) solução filtrada através de papel de filtro Whatman # 42 (W#42).

Quanto ao efeito da filtração nos resultados de MEF e D_{St} obtidos para cada uma das quilaia, não parece haver nenhuma influência relevante ($P > 0,05$), como demonstrado pela análise estatística constante das Tabelas J.1 e J.2, respectivamente.

Note-se que os filtros Whatman # 1 e # 42 utilizados apresentam tamanho de poros de 11 e 2,5 μm , respectivamente. Como os D_{St} das partículas de ambas as quilaia foram determinados como sendo menores que os dos poros dos filtros, justifica-se a não retenção significativa de partículas e a ausência de um efeito relevante da filtração. Assim sendo, concluiu-se por dispensar a etapa de filtração, por ser laboriosa e não introduzir diferenças significativas nos resultados.

Não foram feitas tentativas de filtração com filtros de poros menores, uma vez que mesmo a utilização do Whatman # 42 se mostrou bastante difícil. Problemas com a incorporação de ar no filtrado (resultando na formação de espumas) e taxas de filtração bastante reduzidas (levando a tempos de filtração impraticáveis para obtenção do volume requerido de filtrado para análise no equipamento PENKEM 3000) demonstraram ser impraticável investir nesta abordagem, com os equipamentos disponíveis.

TABELA J.1. Análise de variância: efeito da quilaia e da filtração na mobilidade eletroforética das partículas em solução.

Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------------|
| Quilaia | 1 | 5,498 | 5,498 | 44,59 | 0,0001 |
| Filtração | 2 | 0,745 | 0,373 | 3,02 | 0,0865 |
| Quilaia*Filtração | 2 | 0,518 | 0,259 | 2,10 | 0,1649 |
| Resíduo | 12 | 1,480 | 0,123 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| Quilaia | N ^a | Mobilidade eletroforética x 10 ⁹ (m.s ⁻¹ /V.m ⁻¹) | | | |
|---------|----------------|---|---------------|---|---------|
| | | Média | Desvio padrão | Limites do intervalo com 95% de confiança | |
| BELL | 9 | - 3,680 | 0,370 | - 3,964 | - 3,395 |
| PENCO | 9 | - 4,785 | 0,454 | - 5,134 | - 4,436 |

| Filtração ^b | N ^a | Mobilidade eletroforética x 10 ⁹ (m.s ⁻¹ /V.m ⁻¹) | | | |
|------------------------|----------------|---|---------------|---|---------|
| | | Média | Desvio padrão | Limites do intervalo com 95% de confiança | |
| NF | 6 | - 4,516 | 0,658 | - 5,207 | - 3,826 |
| W#1 | 6 | - 4,050 | 0,537 | - 4,613 | - 3,486 |
| W#42 | 6 | - 4,131 | 0,882 | - 5,057 | - 3,205 |

^a número de observações; ^b NF: solução não filtrada, W#1: solução filtrada através de papel de filtro Whatman #1, W#42: solução filtrada através de papel de filtro Whatman #42. Outros parâmetros experimentais: pH das soluções de quilaia PENCO e BELL de 4,65 e 4,24, respectivamente.

TABELA J.2. Análise de variância: efeito da quilaia e da filtração no diâmetro de Stokes das partículas em solução.

Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------------|
| Quilaia | 1 | 3,539 | 3,539 | 32,25 | 0,0001 |
| Filtração | 2 | 0,052 | 0,026 | 0,24 | 0,7942 |
| Quilaia*Filtração | 2 | 0,584 | 0,292 | 2,66 | 0,1107 |
| Resíduo | 12 | 1,317 | 0,110 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| Quilaia | N ^a | Diâmetro de Stokes (μm) | | | |
|---------|----------------|--------------------------------------|---------------|---|-------|
| | | Média | Desvio padrão | Limites do intervalo com 95% de confiança | |
| BELL | 9 | 1,445 | 0,433 | 1,113 | 1,778 |
| PENCO | 9 | 0,558 | 0,239 | 0,375 | 0,742 |

| Filtração ^b | N ^a | Diâmetro de Stokes (μm) | | | |
|------------------------|----------------|--------------------------------------|---------------|---|-------|
| | | Média | Desvio padrão | Limites do intervalo com 95% de confiança | |
| NF | 6 | 1,051 | 0,227 | 0,813 | 1,289 |
| W#1 | 6 | 0,927 | 0,612 | 0,285 | 1,569 |
| W#42 | 6 | 1,027 | 0,814 | 0,173 | 1,881 |

^a número de observações; ^b NF: solução não filtrada, W#1: solução filtrada através de papel de filtro Whatman #1, W#42: solução filtrada através de papel de filtro Whatman #42. Outros parâmetros experimentais: pH das soluções de quilaia PENCO e BELL de 4,65 e 4,24, respectivamente.

APÊNDICE L. Mobilidade eletroforética e diâmetro de Stokes das partículas e condutividade das soluções aquosas de quilaia PENCO e BELL

TABELA L.1. Análise de variância: efeito da procedência da quilaia na mobilidade eletroforética das partículas em solução aquosa a pH 4,6 e 25 °C.

| Análise de variância | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------------|
| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
| Quilaia | 1 | 5,405 | 5,405 | 54,08 | 0,0001 |
| Resíduo | 8 | 0,800 | 0,080 | | |

| Comparação das médias dos tratamentos | | | |
|---------------------------------------|----------------|---|--------------------|
| Quilaia | N ^a | Mobilidade eletroforética x 10 ⁹ (m.s ⁻¹ /V.m ⁻¹) ^b | Grupo ^c |
| BELL | 5 | - 4,624 ± 0,140 | A |
| PENCO | 5 | - 6,094 ± 0,425 | B |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: soluções de quilaia não filtradas e ^d a concentração de 0,05 g/ml.

TABELA L.2. Análise de variância: efeito da procedência da quilaia no diâmetro de Stokes das partículas em solução aquosa a pH 4,6 e 25 °C.

| Análise de variância | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------------|
| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
| Quilaia | 1 | 0,757 | 0,757 | 10,70 | 0,0113 |
| Resíduo | 8 | 0,566 | 0,071 | | |

| Comparação das médias dos tratamentos | | | |
|---------------------------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------|
| Quilaia | N ^a | Diâmetro de Stokes (µm) ^b | Grupo ^c |
| BELL | 5 | 1,119 ± 0,202 | A |
| PENCO | 5 | 0,569 ± 0,318 | B |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: soluções de quilaia não filtradas e ^d a concentração de 0,05 g/ml.

TABELA L.3. Análise de variância: efeito da procedência da quilaia na condutividade das soluções aquosas a pH 4,6 e 25 °C.

Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|---------|--------------------|--------------------|----------------|--------|--------------|
| Quilaia | 1 | 0,0285156 | 0,0285156 | 3933,2 | 0,0001 |
| Resíduo | 8 | 0,0000580 | 0,0000072 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| Quilaia | N ^a | Condutividade (S.m ⁻¹) ^b | Grupo ^c |
|---------|----------------|---|--------------------|
| BELL | 5 | 0,3468 ± 0,0013 | A |
| PENCO | 5 | 0,4536 ± 0,0036 | B |

^a número de observações; ^b média ± desvio padrão; ^c tratamentos num mesmo grupo não são distintos, a nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Outros parâmetros experimentais: soluções de quilaia não filtradas e a concentração de 0,05 g/ml.

APÊNDICE M. Resolução de sub-populações de partículas através de medidas de mobilidade eletroforética com resolução aumentada.

Estes experimentos foram conduzidos visando verificar se as populações de partículas presentes em soluções aquosas das quilaia PENCO e BELL são homogêneas quanto à mobilidade eletroforética (MEF) ou se são constituídas por várias sub-populações. Ao mesmo tempo, foram obtidos novos dados visando confirmar os resultados iniciais de MEF, diâmetro de Stokes (D_{St}) e condutividade das soluções das duas quilaia. Para resolução das várias sub-populações de partículas eventualmente presentes foram realizadas medidas da MEF com resolução aumentada, como brevemente explicado a seguir.

No PENKEM 3000, um histograma da MEF é dividido em 400 intervalos discretos de resolução. Portanto, a definição da faixa de mobilidade analisada (URI, *mobility range intended*) e do número de espectros somados para obter o histograma, controlam a resolução. Para resolver sub-populações numa suspensão coloidal, pode-se aumentar a resolução diminuindo-se a faixa de MEF analisada pelo sistema, ou seja, diminuindo-se a URI. Como a FFT (*Fast Fourier Transform*) calcula 400 pontos, a resolução da MEF do sistema é sempre igual ao valor da URI dividido por 400. Exemplo: se a URI = $4,0 \times 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$, a resolução da mobilidade é de $1,0 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$. Por outro lado, a FFT obtém normalmente uma transformada de 400 pontos com a MEF zero sendo o ponto central. Este ponto central, denominado *mobility offset* (UO), pode ser ajustado ao valor da MEF média da amostra, de modo a que os 400 pontos sejam calculados na faixa de $UO \pm \text{URI}/2$, obtendo-se uma resolução maior da mobilidade. Para efeito da construção gráfica dos histogramas, sem implicações no valor das MEF obtidas, dois parâmetros são ajustados: a faixa de mobilidade colocada como abcissa nos histogramas (HUR, *histogram mobility range*) e o ponto central da escala da abcissa (HUO, *histogram mobility offset*).

Um aspecto também considerado foi a possibilidade da mudança na resolução empregada para construção do histograma eventualmente afetar os resultados da MEF obtida. A Tabela M.1 a seguir apresenta os resultados da MEF obtidos em ensaios com faixas de resolução distintas e indicam que não há efeito significativo da resolução empregada no valor da MEF obtida.

Como a análise é muito mais rápida com URI de $4,0 \times 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$ (menos da metade do tempo gasto comparativamente à URI de $2,0 \times 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}/\text{V.m}^{-1}$) e os resultados são próximos, se justifica a utilização desta faixa de resolução. Por outro lado, há evidente perda de resolução no caso de amostras com sub-populações como a quilaia PENCO.

TABELA M.1. Efeito da faixa de resolução empregada no Penkem 3000 na mobilidade eletroforética obtida para as partículas das quilaia PENCO e BELL, em soluções aquosas a pH 4,6 e 25 °C.

Tratamentos para quilaia PENCO

| Resolução (m.s ⁻¹ /V.m ⁻¹) | N ^a | Mobilidade eletroforética x 10 ⁹ (m.s ⁻¹ /V.m ⁻¹) | | | |
|--|----------------|---|---------------|---|---------|
| | | Média | Desvio padrão | Limites do intervalo com 95% de confiança | |
| 4,0 x 10 ⁻⁷ | 5 | - 6,094 | 0,425 | - 6,621 | - 5,567 |
| 2,0 x 10 ⁻⁸ | 5 | - 6,083 | 0,210 | - 6,345 | - 5,821 |

Tratamentos para quilaia BELL

| Resolução (m.s ⁻¹ /V.m ⁻¹) | N ^a | Mobilidade eletroforética x 10 ⁹ (m.s ⁻¹ /V.m ⁻¹) | | | |
|--|----------------|---|---------------|---|---------|
| | | Média | Desvio padrão | Limites do intervalo com 95% de confiança | |
| 4,0 x 10 ⁻⁷ | 5 | - 4,624 | 0,140 | - 4,797 | - 4,450 |
| 2,0 x 10 ⁻⁸ | 5 | - 4,633 | 0,090 | - 4,744 | - 4,522 |

^a número de observações. Outros parâmetros experimentais: soluções de quilaia não filtradas e a concentração de 0,05 g/ml.

APÊNDICE N. Resultados detalhados dos estudos de formação da micela em soluções aquosas de quilaia

TABELA N.1. Análise de variância: efeitos da temperatura, pH e adição de NaCl na concentração de micela crítica da quilaia SIGMA.

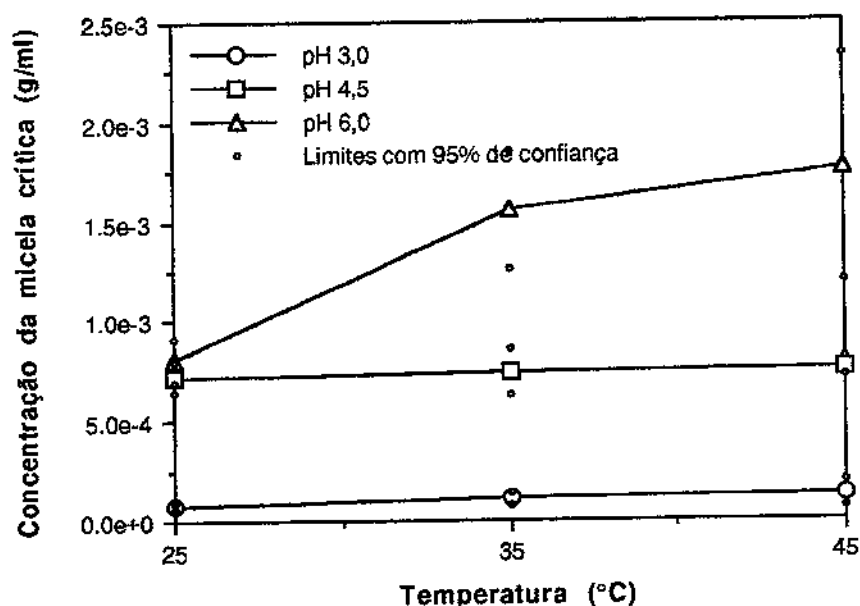
Análise de variância

| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob > F (P) |
|------------------|--------------------|--------------------|----------------|-----------|--------------|
| Temperatura | 2 | 6,0 E-07 | 3,0 E-07 | 6,23 E+01 | 0,0001 |
| pH | 2 | 7,1 E-06 | 3,5 E-06 | 7,62 E+02 | 0,0001 |
| NaCl | 1 | 2,5 E-06 | 2,5 E-06 | 5,45 E+02 | 0,0001 |
| Temp * pH | 4 | 1,0 E-06 | 3,0 E-07 | 5,57 E+01 | 0,0001 |
| Temp * NaCl | 2 | 2,0 E-07 | 1,0 E-07 | 1,63 E+01 | 0,0001 |
| pH * NaCl | 2 | 1,4 E-06 | 7,0 E-07 | 1,46 E+02 | 0,0001 |
| Temp * pH * NaCl | 4 | 2,0 E-07 | 3,93 E-08 | 8,49 | 0,0001 |
| Resíduo | 36 | 2,0 E-07 | 4,63 E-09 | | |

Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | | N a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------------|-----|----------|-----|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Temperatura (°C) | pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior b | Limite superior b |
| 25 | 3,0 | 0,5 | 3 | 8,0 E-05 | 2,9 E-05 | 1,3 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,6 E-05 | 5,9 E-05 | 9,4 E-05 |
| | 4,5 | 0,5 | 3 | 2,9 E-04 | 2,4 E-04 | 3,5 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,2 E-04 | 6,5 E-04 | 8,0 E-04 |
| | 6,0 | 0,5 | 3 | 3,0 E-04 | 2,7 E-04 | 3,4 E-04 |
| | | zero | 3 | 8,1 E-04 | 7,0 E-04 | 9,2 E-04 |
| 35 | 3,0 | 0,5 | 3 | 8,9 E-05 | 5,8 E-05 | 1,2 E-04 |
| | | zero | 3 | 1,1 E-04 | 8,2 E-05 | 1,4 E-04 |
| | 4,5 | 0,5 | 3 | 2,7 E-04 | 2,4 E-04 | 3,1 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,5 E-04 | 6,4 E-04 | 8,7 E-04 |
| | 6,0 | 0,5 | 3 | 8,1 E-04 | 5,8 E-04 | 1,0 E-03 |
| | | zero | 3 | 1,6 E-03 | 1,3 E-03 | 1,9 E-03 |
| 45 | 3,0 | 0,5 | 3 | 7,6 E-05 | 7,0 E-05 | 8,1 E-05 |
| | | zero | 3 | 1,3 E-04 | 6,7 E-05 | 2,0 E-04 |
| | 4,5 | 0,5 | 3 | 2,5 E-04 | 2,0 E-04 | 2,9 E-04 |
| | | zero | 3 | 7,6 E-04 | 7,2 E-04 | 8,1 E-04 |
| | 6,0 | 0,5 | 3 | 6,3 E-04 | 5,4 E-04 | 7,2 E-04 |
| | | zero | 3 | 1,8 E-03 | 1,2 E-03 | 2,3 E-03 |

^a número de observações ; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

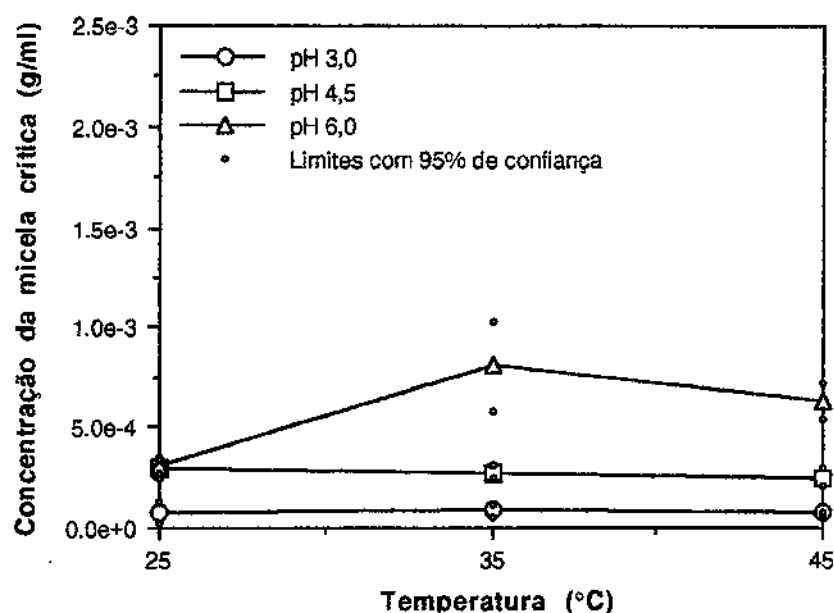


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|------------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | Temperatura (°C) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 25 | 3 | 7,6 E-05 | 5,9 E-05 | 9,4 E-05 |
| | 35 | 3 | 1,1 E-04 | 8,2 E-05 | 1,4 E-04 |
| | 45 | 3 | 1,3 E-04 | 6,7 E-05 | 2,0 E-04 |
| 4,5 | 25 | 3 | 7,2 E-04 | 6,5 E-04 | 8,0 E-04 |
| | 35 | 3 | 7,5 E-04 | 6,4 E-04 | 8,7 E-04 |
| | 45 | 3 | 7,6 E-04 | 7,2 E-04 | 8,1 E-04 |
| 6,0 | 25 | 3 | 8,1 E-04 | 7,0 E-04 | 9,2 E-04 |
| | 35 | 3 | 1,6 E-03 | 1,3 E-03 | 1,9 E-03 |
| | 45 | 3 | 1,8 E-03 | 1,2 E-03 | 2,3 E-03 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.1. Efeito da temperatura na CMC da quitina SIGMA, a vários pH's, sem a adição de NaCl.

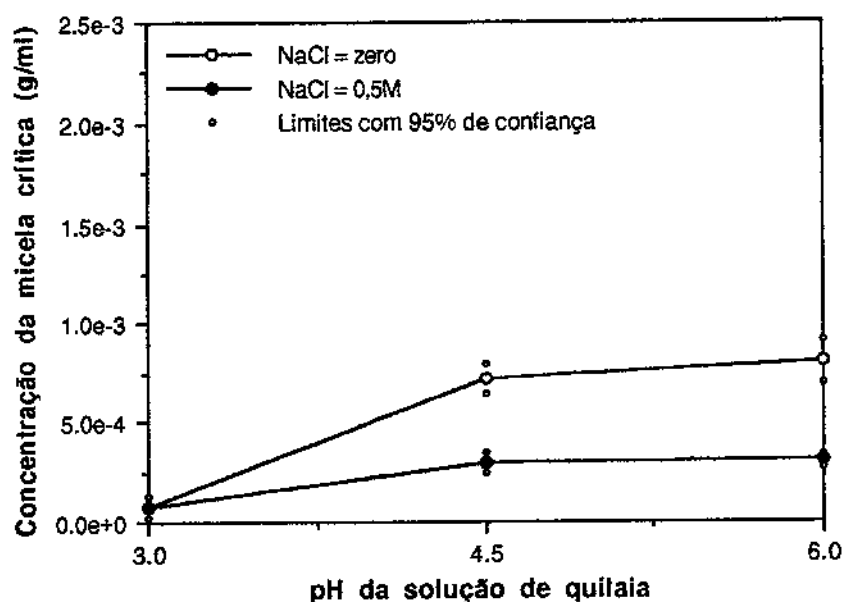


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|------------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | Temperatura (°C) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 25 | 3 | 8,0 E-05 | 2,9 E-05 | 1,3 E-04 |
| | 35 | 3 | 8,9 E-05 | 5,8 E-05 | 1,2 E-04 |
| | 45 | 3 | 7,6 E-05 | 7,0 E-05 | 8,1 E-05 |
| 4,5 | 25 | 3 | 2,9 E-04 | 2,4 E-04 | 3,5 E-04 |
| | 35 | 3 | 2,7 E-04 | 2,4 E-04 | 3,1 E-04 |
| | 45 | 3 | 2,5 E-04 | 2,0 E-04 | 2,9 E-04 |
| 6,0 | 25 | 3 | 3,0 E-04 | 2,7 E-04 | 3,4 E-04 |
| | 35 | 3 | 8,1 E-04 | 5,8 E-04 | 1,0 E-03 |
| | 45 | 3 | 6,3 E-04 | 5,4 E-04 | 7,2 E-04 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.2. Efeito da temperatura na CMC da quilaia SIGMA, a vários pH's, com 0,5M de NaCl adicionado.

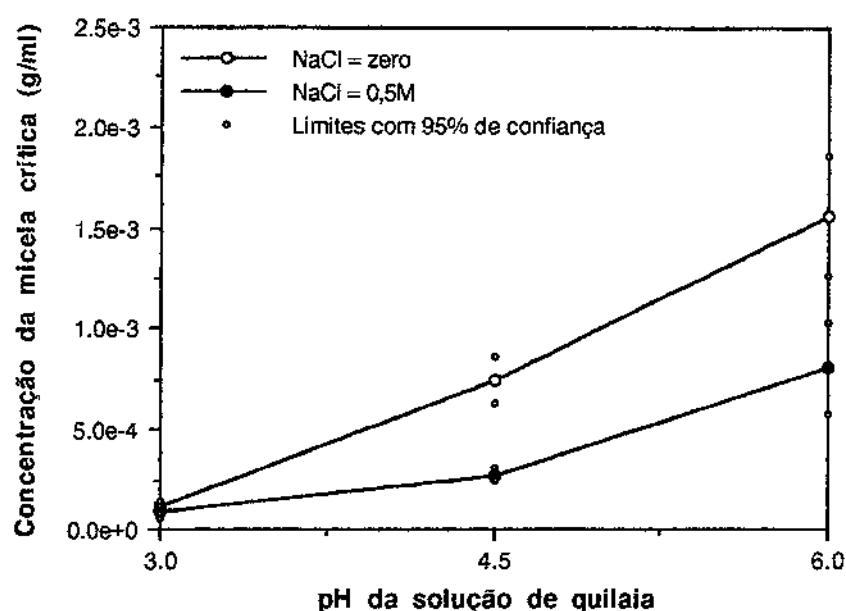


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|-----|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 3,0 | 3 | 7,6 E-05 | 5,9 E-05 | 9,4 E-05 |
| | 4,5 | 3 | 7,2 E-04 | 6,5 E-04 | 8,0 E-04 |
| | 6,0 | 3 | 8,1 E-04 | 7,0 E-04 | 9,2 E-04 |
| 0,5 | 3,0 | 3 | 8,0 E-05 | 2,9 E-05 | 1,3 E-04 |
| | 4,5 | 3 | 2,9 E-04 | 2,4 E-04 | 3,5 E-04 |
| | 6,0 | 3 | 3,0 E-04 | 2,7 E-04 | 3,4 E-04 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.3. Efeito do pH na CMC da quilaia SIGMA, sem a adição e com 0,5M de NaCl adicionado, a 25 °C.

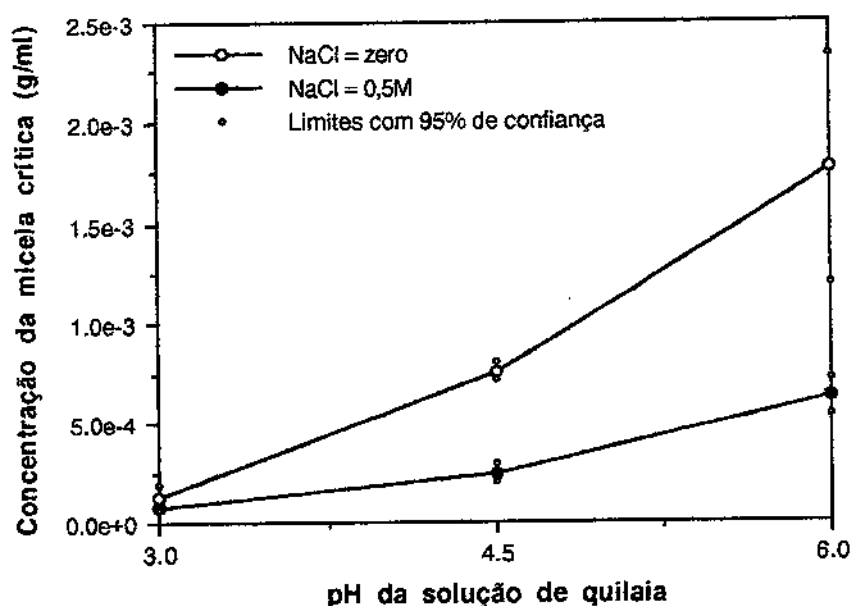


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|-----|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 3,0 | 3 | 1,1 E-04 | 8,2 E-05 | 1,4 E-04 |
| | 4,5 | 3 | 7,5 E-04 | 6,4 E-04 | 8,7 E-04 |
| | 6,0 | 3 | 1,6 E-03 | 1,3 E-03 | 1,9 E-03 |
| 0,5 | 3,0 | 3 | 8,9 E-05 | 5,8 E-05 | 1,2 E-04 |
| | 4,5 | 3 | 2,7 E-04 | 2,4 E-04 | 3,1 E-04 |
| | 6,0 | 3 | 8,1 E-04 | 5,8 E-04 | 1,0 E-03 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.4. Efeito do pH na CMC da quilaia SIGMA, sem a adição e com 0,5M de NaCl adicionado, a 35 °C.

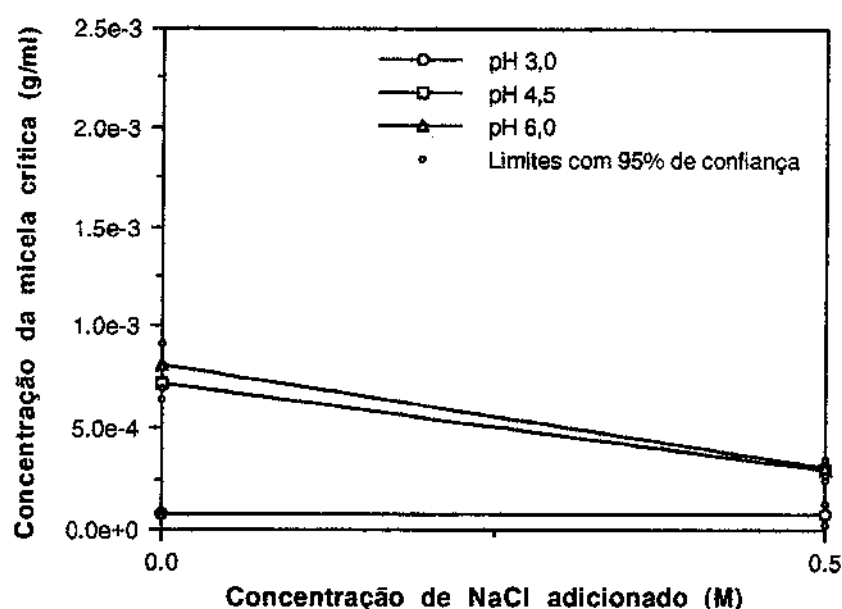


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|-----|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 3,0 | 3 | 1,3 E-04 | 6,7 E-05 | 2,0 E-04 |
| | 4,5 | 3 | 7,6 E-04 | 7,2 E-04 | 8,1 E-04 |
| | 6,0 | 3 | 1,8 E-03 | 1,2 E-03 | 2,3 E-03 |
| 0,5 | 3,0 | 3 | 7,6 E-05 | 7,0 E-05 | 8,1 E-05 |
| | 4,5 | 3 | 2,5 E-04 | 2,0 E-04 | 2,9 E-04 |
| | 6,0 | 3 | 6,3 E-04 | 5,4 E-04 | 7,2 E-04 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.5. Efeito do pH na CMC da quilaia SIGMA, sem a adição e com 0,5M de NaCl adicionado, a 45 °C.

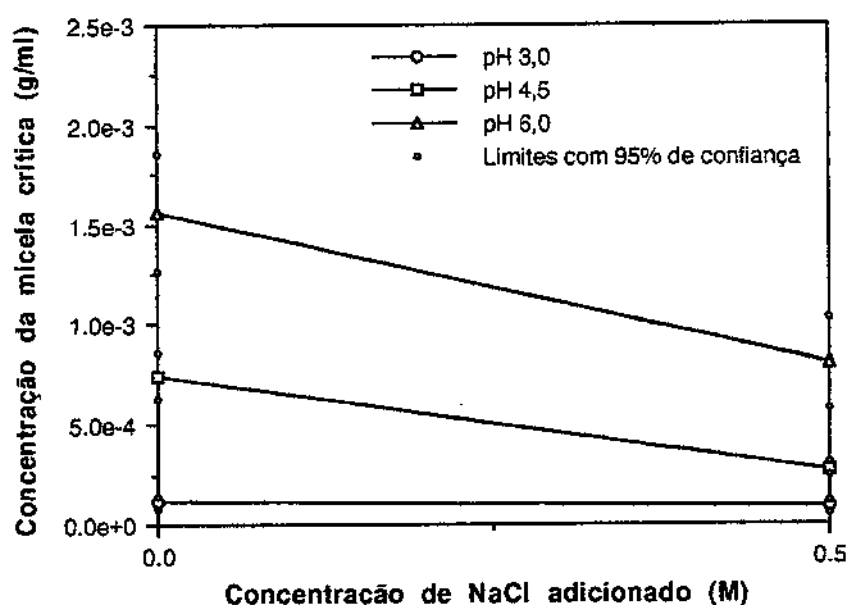


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|----------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 0,5 | 3 | 8,0 E-05 | 2,9 E-05 | 1,3 E-04 |
| | zero | 3 | 7,6 E-05 | 5,9 E-05 | 9,4 E-05 |
| 4,5 | 0,5 | 3 | 2,9 E-04 | 2,4 E-04 | 3,5 E-04 |
| | zero | 3 | 7,2 E-04 | 6,5 E-04 | 8,0 E-04 |
| 6,0 | 0,5 | 3 | 3,0 E-04 | 2,7 E-04 | 3,4 E-04 |
| | zero | 3 | 8,1 E-04 | 7,0 E-04 | 9,2 E-04 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.6. Efeito da adição de NaCl na CMC da quilaia SIGMA, a vários pH's, a 25 °C.

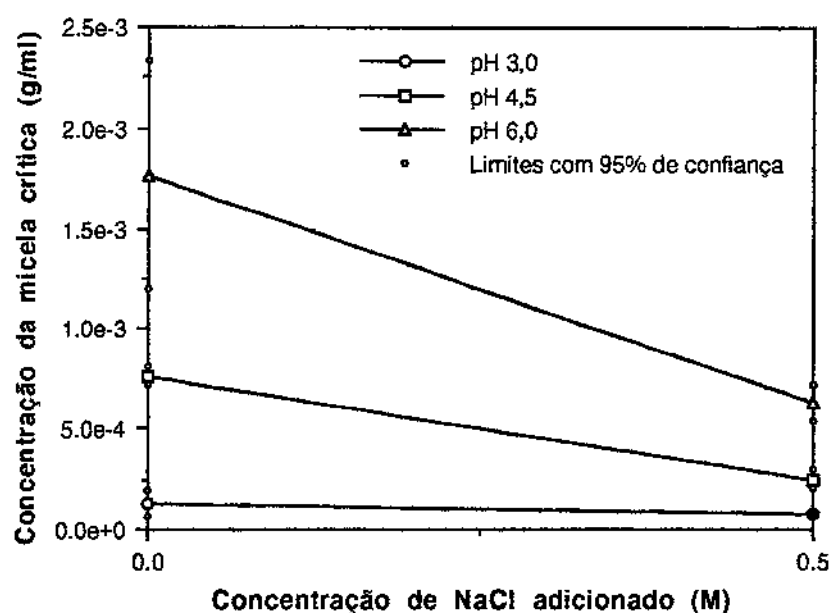


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|----------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 0,5 | 3 | 8,9 E-05 | 5,8 E-05 | 1,2 E-04 |
| | zero | 3 | 1,1 E-04 | 8,2 E-05 | 1,4 E-04 |
| 4,5 | 0,5 | 3 | 2,7 E-04 | 2,4 E-04 | 3,1 E-04 |
| | zero | 3 | 7,5 E-04 | 6,4 E-04 | 8,7 E-04 |
| 6,0 | 0,5 | 3 | 8,1 E-04 | 5,8 E-04 | 1,0 E-03 |
| | zero | 3 | 1,6 E-03 | 1,3 E-03 | 1,9 E-03 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.7. Efeito da adição de NaCl na CMC da quilaia SIGMA, a vários pH's, a 35 °C.



Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Concentração da micela crítica (g/ml) | | |
|------------|----------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 0,5 | 3 | 7,6 E-05 | 7,0 E-05 | 8,1 E-05 |
| | zero | 3 | 1,3 E-04 | 6,7 E-05 | 2,0 E-04 |
| 4,5 | 0,5 | 3 | 2,5 E-04 | 2,0 E-04 | 2,9 E-04 |
| | zero | 3 | 7,6 E-04 | 7,2 E-04 | 8,1 E-04 |
| 6,0 | 0,5 | 3 | 6,3 E-04 | 5,4 E-04 | 7,2 E-04 |
| | zero | 3 | 1,8 E-03 | 1,2 E-03 | 2,3 E-03 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA N.8. Efeito da adição de NaCl na CMC da quilaia SIGMA, a vários pH's, a 45 °C.

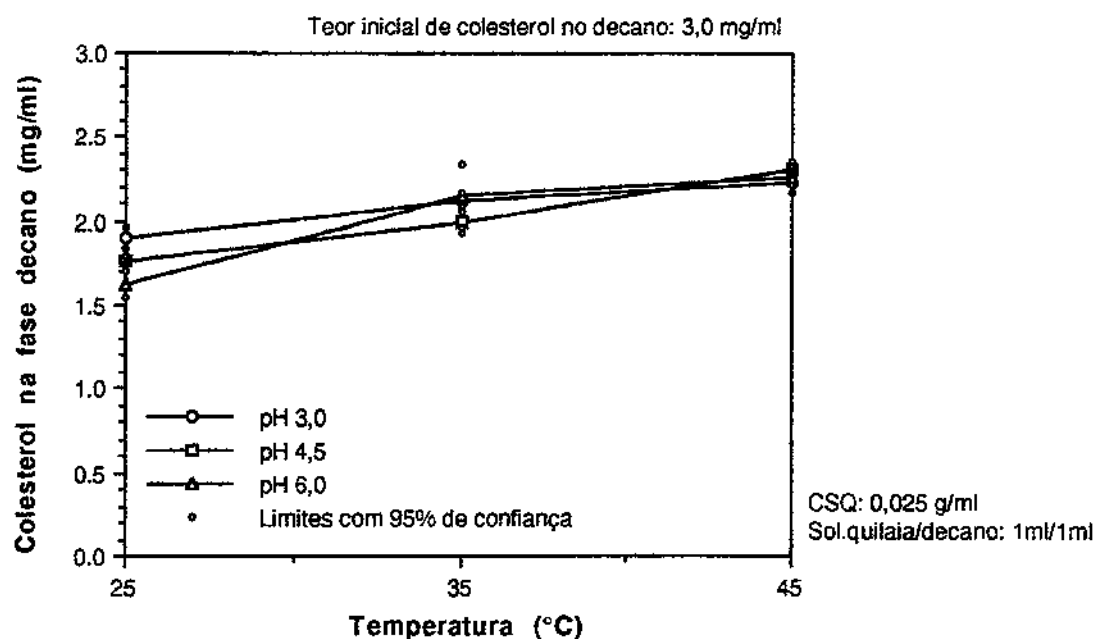
APÊNDICE O. Resultados detalhados dos estudos de solubilização de colesterol em soluções aquosas de quilaia

TABELA O.1. Análise de variância: efeitos da temperatura, pH e adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA.

| Análise de variância | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|-------------|
| Fonte | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F | Prob >F (P) |
| Temperatura | 2 | 4,72482 | 2,36241 | 348,54 | 0,0001 |
| pH | 2 | 0,06596 | 0,03298 | 4,866 | 0,0098 |
| NaCl | 1 | 0,14711 | 0,14711 | 21,704 | 0,0001 |
| Temp * pH | 4 | 0,77140 | 0,19285 | 28,452 | 0,0001 |
| Temp * NaCl | 2 | 0,02281 | 0,01140 | 1,683 | 0,1917 |
| pH * NaCl | 2 | 0,04740 | 0,02370 | 3,496 | 0,0345 |
| Temp * pH * NaCl | 4 | 0,05005 | 0,012512 | 1,846 | 0,1270 |
| Resíduo | 90 | 0,61002 | 0,00678 | | |

| Comparação das médias dos tratamentos | | | | | | |
|---------------------------------------|-----|----------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Tratamento | | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
| Temperatura (°C) | pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 25 | 3,0 | 0,5 | 6 | 1,82 | 1,77 | 1,87 |
| | | zero | 6 | 1,90 | 1,83 | 1,96 |
| | 4,5 | 0,5 | 6 | 1,74 | 1,71 | 1,76 |
| | | zero | 6 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | 6,0 | 0,5 | 6 | 1,54 | 1,50 | 1,58 |
| | | zero | 6 | 1,63 | 1,55 | 1,70 |
| 35 | 3,0 | 0,5 | 6 | 1,98 | 1,95 | 2,01 |
| | | zero | 6 | 2,12 | 2,08 | 2,16 |
| | 4,5 | 0,5 | 6 | 1,82 | 1,79 | 1,85 |
| | | zero | 6 | 2,00 | 1,94 | 2,06 |
| | 6,0 | 0,5 | 6 | 2,13 | 1,87 | 2,38 |
| | | zero | 6 | 2,14 | 1,96 | 2,33 |
| 45 | 3,0 | 0,5 | 6 | 2,15 | 2,10 | 2,20 |
| | | zero | 6 | 2,22 | 2,16 | 2,28 |
| | 4,5 | 0,5 | 6 | 2,19 | 2,17 | 2,21 |
| | | zero | 6 | 2,31 | 2,27 | 2,35 |
| | 6,0 | 0,5 | 6 | 2,32 | 2,28 | 2,35 |
| | | zero | 6 | 2,26 | 2,21 | 2,32 |

^a número de observações ; ^b limites do intervalo com 95% de confiança. Outros parâmetros experimentais: teor inicial de colesterol no decano: 3,0 mg/ml; proporção solução de quilaia/decano: 10ml/10ml.

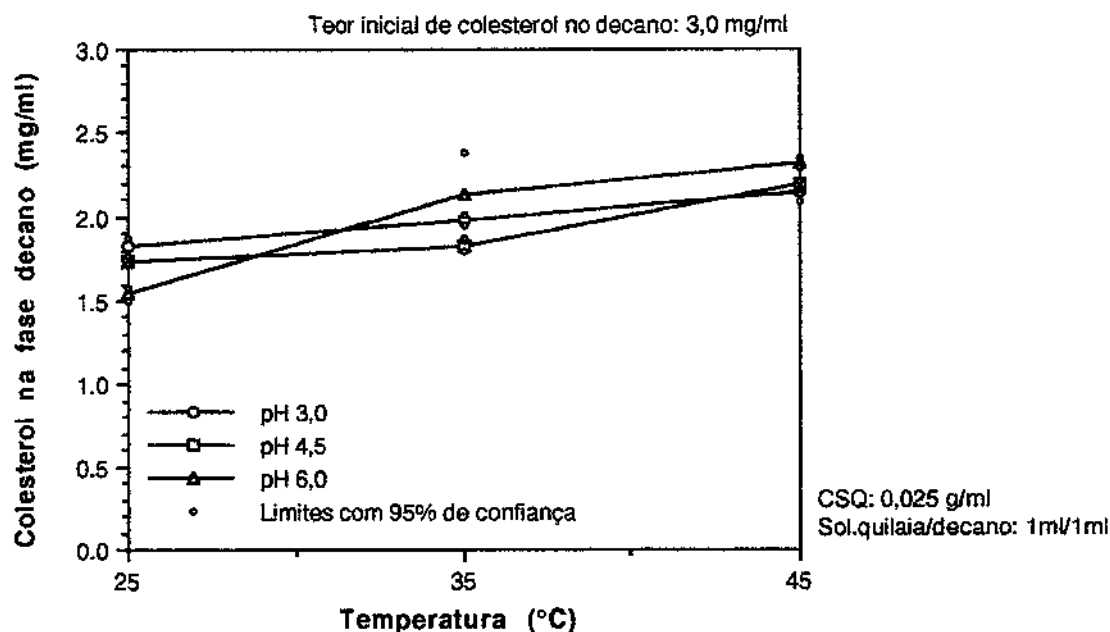


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|------------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | Temperatura (°C) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 25 | 6 | 1,90 | 1,83 | 1,96 |
| | 35 | 6 | 2,12 | 2,08 | 2,16 |
| | 45 | 6 | 2,22 | 2,16 | 2,28 |
| 4,5 | 25 | 6 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | 35 | 6 | 2,00 | 1,94 | 2,06 |
| | 45 | 6 | 2,31 | 2,27 | 2,35 |
| 6,0 | 25 | 6 | 1,63 | 1,55 | 1,70 |
| | 35 | 6 | 2,14 | 1,96 | 2,33 |
| | 45 | 6 | 2,26 | 2,21 | 2,32 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA O.1. Efeito da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, a vários pH's, sem a adição de NaCl.

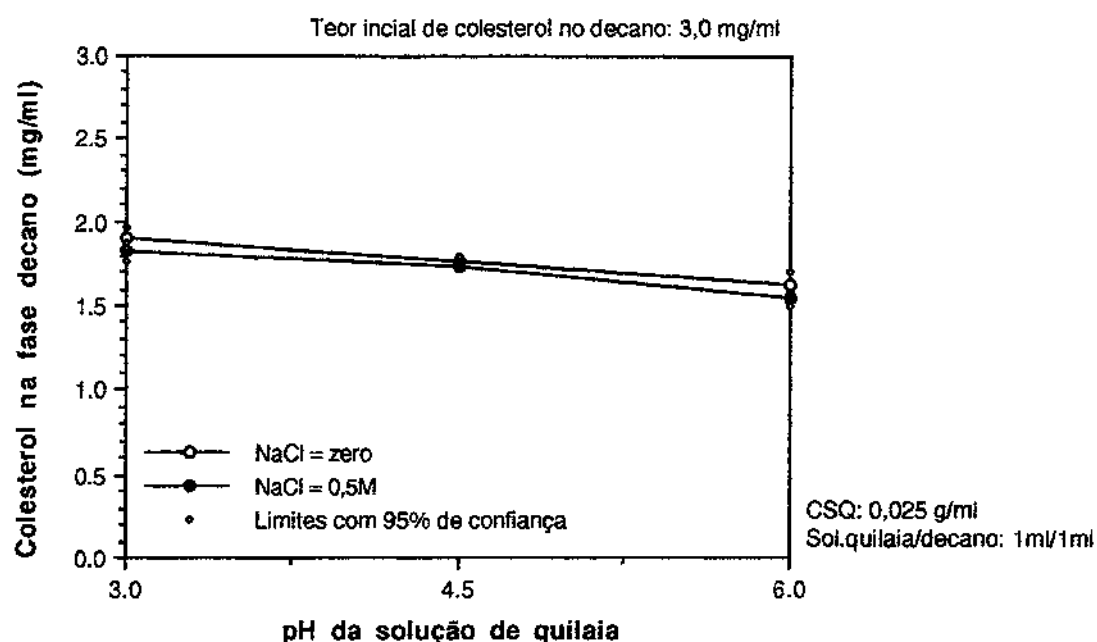


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|------------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | Temperatura (°C) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | 25 | 6 | 1,82 | 1,77 | 1,87 |
| | 35 | 6 | 1,98 | 1,95 | 2,01 |
| | 45 | 6 | 2,15 | 2,10 | 2,20 |
| 4,5 | 25 | 6 | 1,74 | 1,71 | 1,76 |
| | 35 | 6 | 1,82 | 1,79 | 1,85 |
| | 45 | 6 | 2,19 | 2,17 | 2,21 |
| 6,0 | 25 | 6 | 1,54 | 1,50 | 1,58 |
| | 35 | 6 | 2,13 | 1,87 | 2,38 |
| | 45 | 6 | 2,32 | 2,28 | 2,35 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA O.2. Efeito da temperatura na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, a vários pH's, com 0,5M de NaCl adicionado.

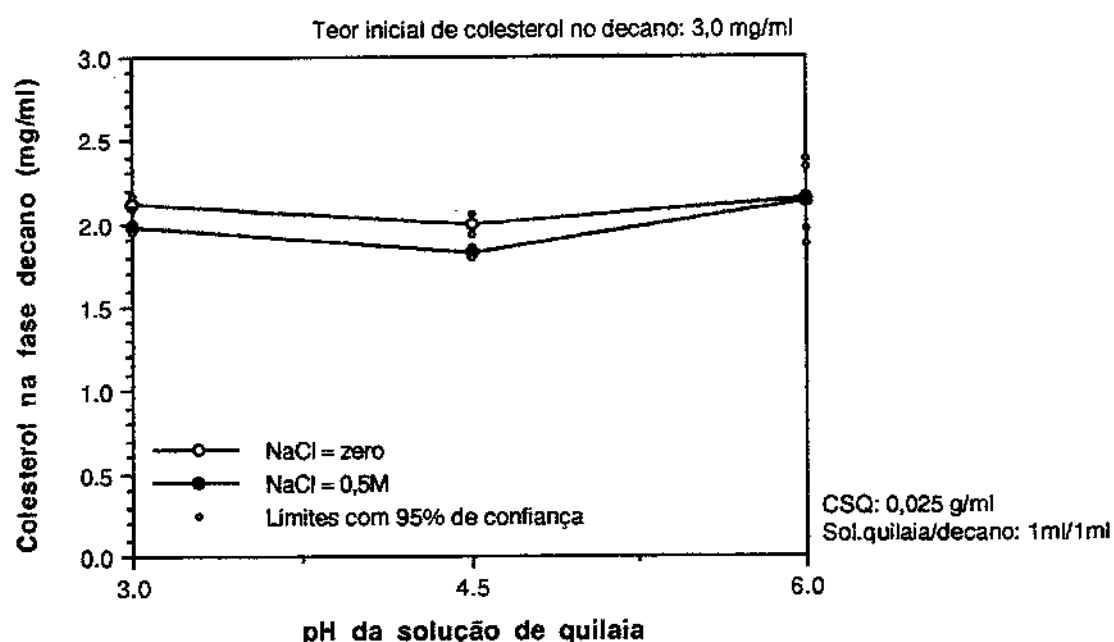


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|-----|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 3,0 | 6 | 1,90 | 1,83 | 1,96 |
| | 4,5 | 6 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | 6,0 | 6 | 1,63 | 1,55 | 1,70 |
| 0,5 | 3,0 | 6 | 1,82 | 1,77 | 1,87 |
| | 4,5 | 6 | 1,74 | 1,71 | 1,76 |
| | 6,0 | 6 | 1,54 | 1,50 | 1,58 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA O.3. Efeito do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, sem a adição e com 0,5M de NaCl adicionado, a 25 °C.

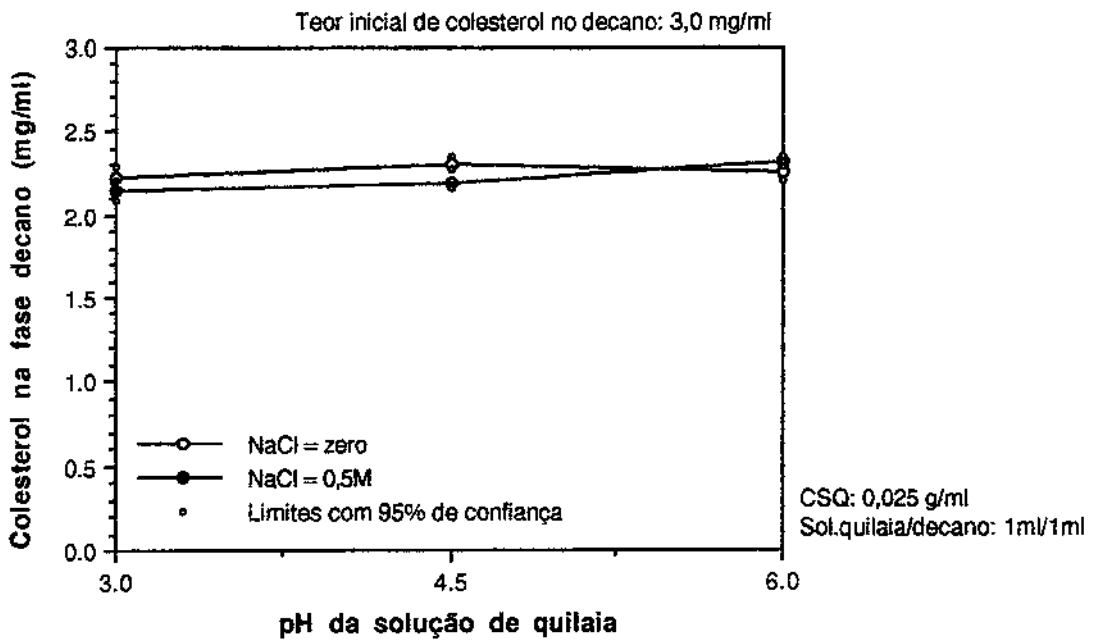


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|-----|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^c |
| zero | 3,0 | 6 | 2,12 | 2,08 | 2,16 |
| | 4,5 | 6 | 2,00 | 1,94 | 2,06 |
| | 6,0 | 6 | 2,14 | 1,96 | 2,33 |
| 0,5 | 3,0 | 6 | 1,98 | 1,95 | 2,01 |
| | 4,5 | 6 | 1,82 | 1,79 | 1,85 |
| | 6,0 | 6 | 2,13 | 1,87 | 2,38 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA 0.4. Efeito do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, sem a adição e com 0,5M de NaCl adicionado, a 35 °C.

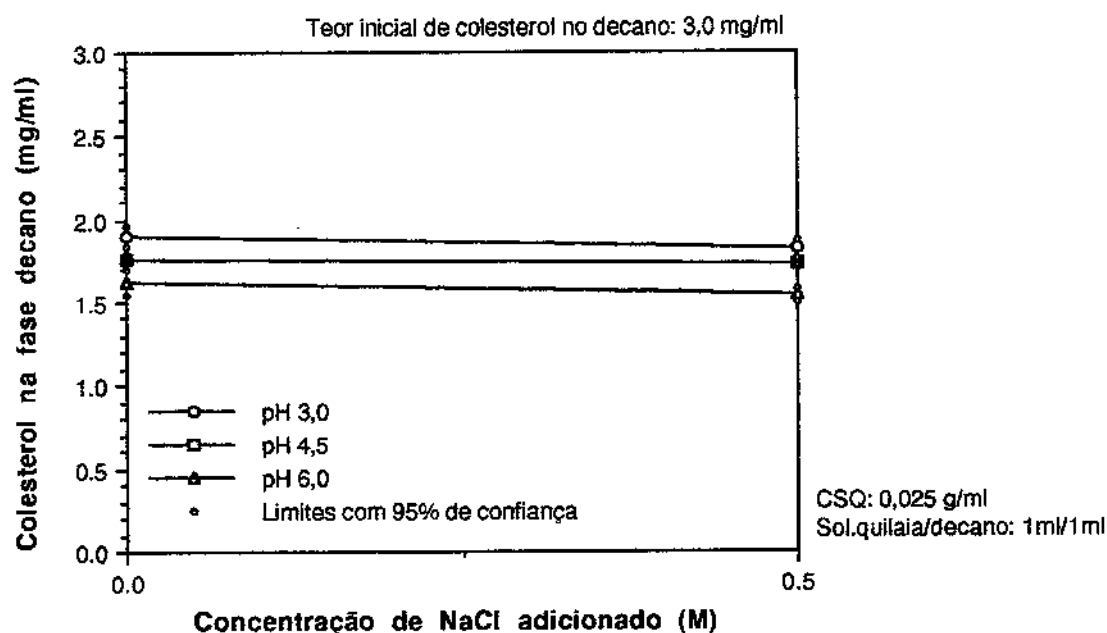


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Coolesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|-----|----------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NaCl (M) | pH | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| zero | 3,0 | 6 | 2,22 | 2,16 | 2,28 |
| | 4,5 | 6 | 2,31 | 2,27 | 2,35 |
| | 6,0 | 6 | 2,26 | 2,21 | 2,32 |
| 0,5 | 3,0 | 6 | 2,15 | 2,10 | 2,20 |
| | 4,5 | 6 | 2,19 | 2,17 | 2,21 |
| | 6,0 | 6 | 2,32 | 2,28 | 2,35 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA O.5. Efeito do pH na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, sem a adição e com 0,5M de NaCl adicionado, a 45 °C.

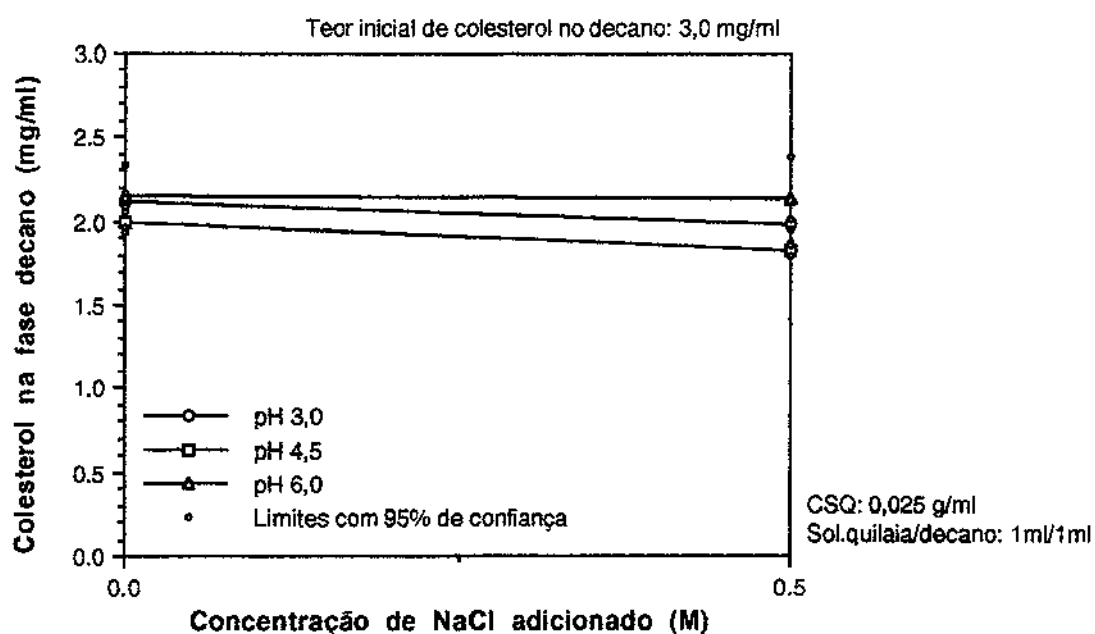


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|----------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | zero | 6 | 1,90 | 1,83 | 1,96 |
| | 0,5 | 6 | 1,82 | 1,77 | 1,87 |
| 4,5 | zero | 6 | 1,77 | 1,74 | 1,80 |
| | 0,5 | 6 | 1,74 | 1,71 | 1,76 |
| 6,0 | zero | 6 | 1,63 | 1,55 | 1,70 |
| | 0,5 | 6 | 1,54 | 1,50 | 1,58 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA O.6. Efeito da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, a vários pH's, a 25 °C.

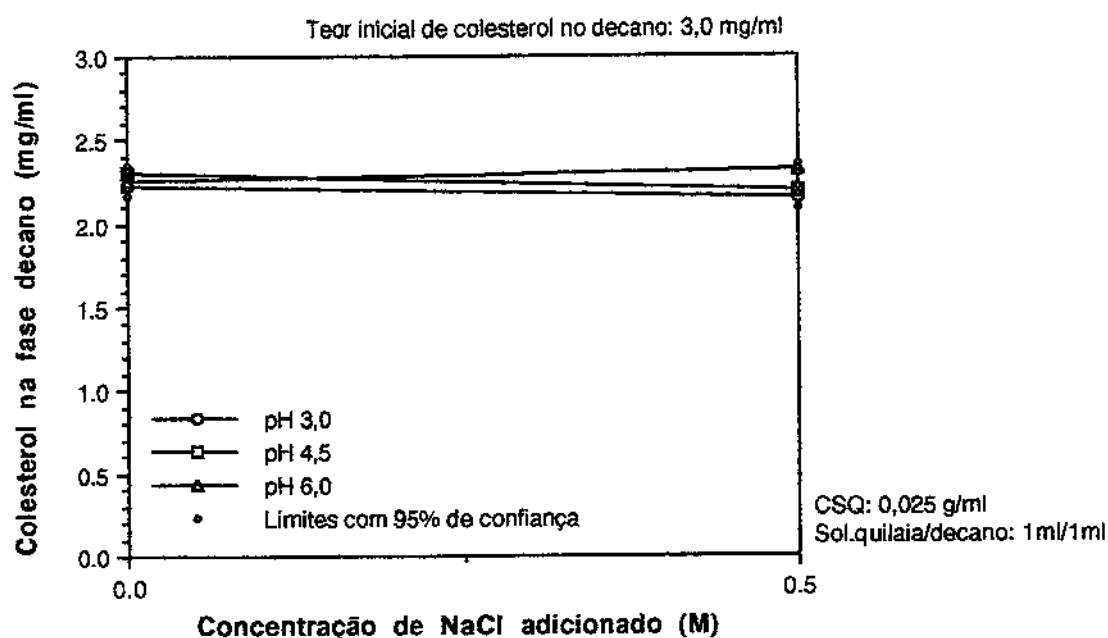


Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|----------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | zero | 6 | 2,12 | 2,08 | 2,16 |
| | 0,5 | 6 | 1,98 | 1,95 | 2,01 |
| 4,5 | zero | 6 | 2,00 | 1,94 | 2,06 |
| | 0,5 | 6 | 1,82 | 1,79 | 1,85 |
| 6,0 | zero | 6 | 2,14 | 1,96 | 2,33 |
| | 0,5 | 6 | 2,13 | 1,87 | 2,38 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA O.7. Efeito da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, a vários pH's, a 35 °C.



Comparação das médias dos tratamentos

| Tratamento | | N ^a | Colesterol na fase decano (mg/ml) | | |
|------------|----------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| pH | NaCl (M) | | Média | Limite inferior ^b | Limite superior ^b |
| 3,0 | zero | 6 | 2,22 | 2,16 | 2,28 |
| | 0,5 | 6 | 2,15 | 2,10 | 2,20 |
| 4,5 | zero | 6 | 2,31 | 2,27 | 2,35 |
| | 0,5 | 6 | 2,19 | 2,17 | 2,21 |
| 6,0 | zero | 6 | 2,26 | 2,21 | 2,32 |
| | 0,5 | 6 | 2,32 | 2,28 | 2,35 |

^a número de observações; ^b limites do intervalo com 95% de confiança.

FIGURA O.8. Efeito da adição de NaCl na concentração de equilíbrio de colesterol na fase decano em contato com soluções aquosas de quilaia SIGMA, a vários pH's, a 45 °C.

APÊNDICE P. Obtenção gráfica da concentração de micela crítica (CMC) da quilaia SIGMA em várias condições de temperatura, pH e adição de NaCl

O exame das curvas que descrevem a evolução da tensão superficial com a variação da concentração das soluções de quilaia e indica três regiões distintas. Primeiramente, na região que corresponde às menores concentrações, tipicamente entre $2,0 \times 10^{-7}$ e $2,0 \times 10^{-6}$ g/ml, observa-se uma invariância da tensão superficial, cujos valores permanecem próximos aos da água desionizada (72,1 mN/m a 25 °C). Em seguida, na região de concentrações intermediárias, a tensão superficial diminui linearmente com o aumento da concentração da solução. Por último, na região de concentrações mais elevadas, observa-se que a tensão superficial é constante, independente da concentração da solução.

A invariância da tensão superficial com a concentração nas soluções mais diluídas contraria as expectativas (Gibbs) de uma variação linear e, uma vez que os valores de tensão superficial medidos nestas concentrações correspondem ao da água desionizada, sugerem a ausência de tensoativo na interface ar - solução. Hipoteticamente, tais desvios poderiam resultar de : 1) adsorção preferencial do tensoativo na interface sólido - líquido (recipiente - solução) relativamente à gás - líquido (ar - solução), ou 2) difusão lenta do tensoativo em direção à interface gás - líquido, fazendo-se as medidas de tensão antes do tempo necessário ao alcance do equilíbrio.

O exame dos tempos de contato empregados nas medidas indica que, na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ g/ml, valores de tensão constantes foram obtidos ao redor de 5 (cinco) minutos. Entretanto, entre $6,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-2}$ g/ml, observou-se que os tempos de contato necessários para obtenção de valores de tensão constantes variaram, demandando maior tempo quanto menor era a concentração. Assim, foram empregados tipicamente ao redor de 30 (trinta) minutos na concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ g/ml, tempo que se reduziu continuamente para até 5 (cinco) minutos na concentração de $2,0 \times 10^{-2}$ g/ml.

Esta avaliação sugere que os valores de tensão obtidos na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ g/ml não representam situações de equilíbrio e, portanto, não foram considerados para fins de determinação da CMC. Por outro lado, excluídos os pontos correspondentes a tais concentrações, cumpriram-se as expectativas (Gibbs) de uma variação linear da tensão com o logaritmo da concentração da solução, antes da descontinuidade associada à CMC. Acima da

CMC, a tensão superficial permaneceu constante, indicando saturação da interface pelo tensoativo.

O modelo linear revelou-se estatisticamente significativo em todos os tratamentos empregados, com coeficiente de determinação (R^2) das retas ajustadas aos pontos experimentais antes da CMC apresentando valor médio de 0,987 (faixa de variação de 0,935 a 0,998) e número médio de pontos experimentais considerados de quatro (mínimo de três e máximo de cinco).

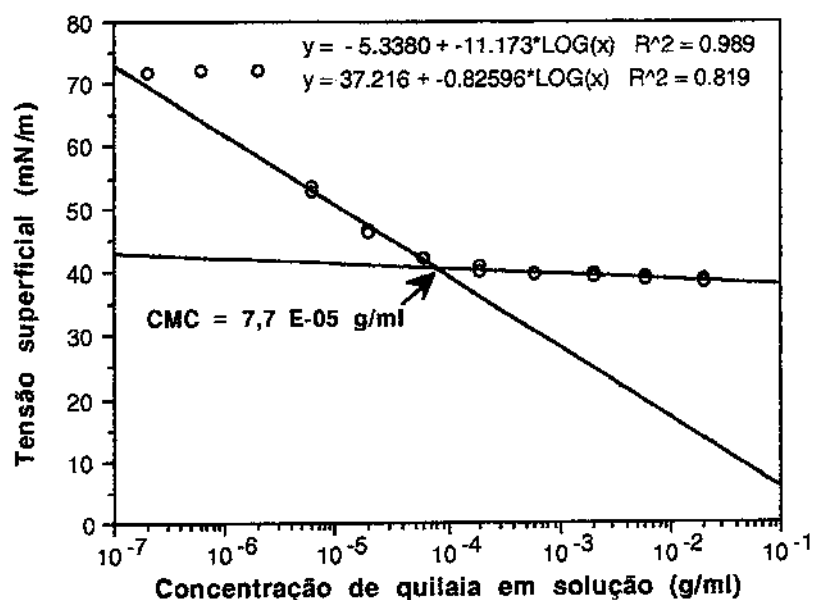


FIGURA P.1. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica A.

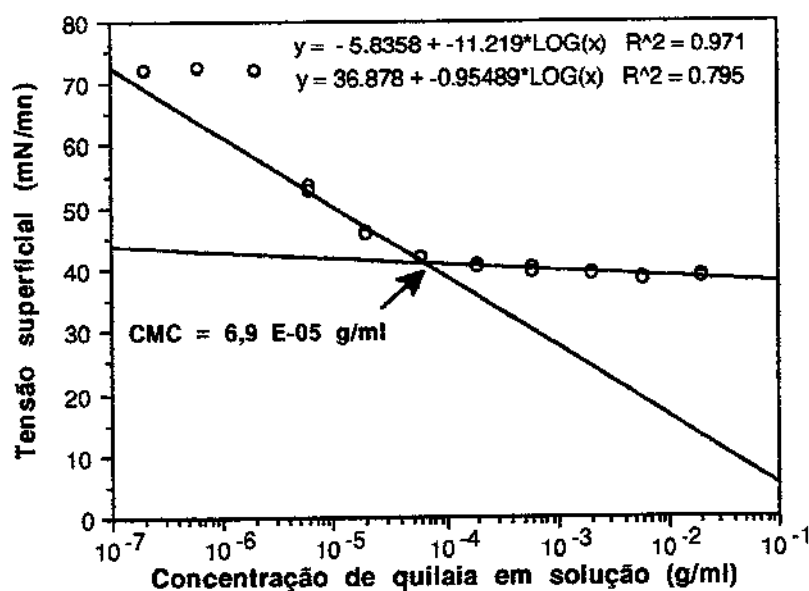


FIGURA P.2. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica B.

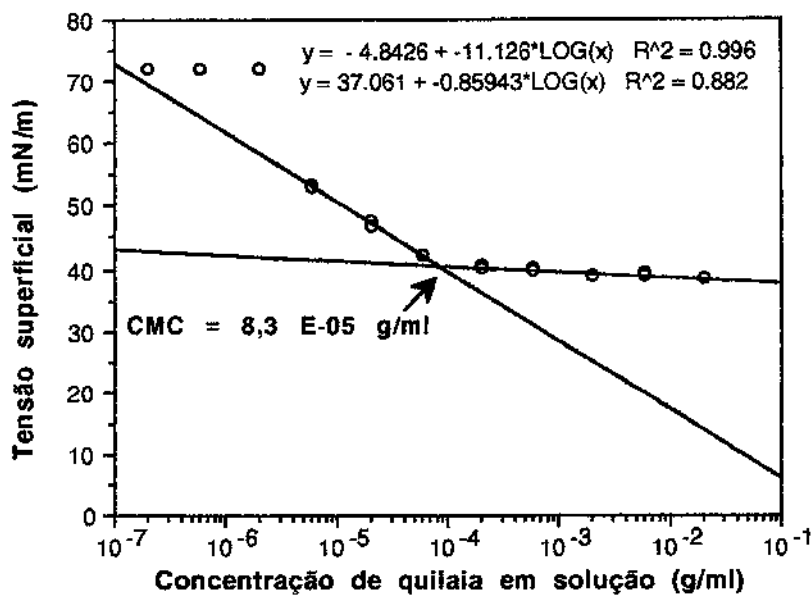


FIGURA P.3. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica C.

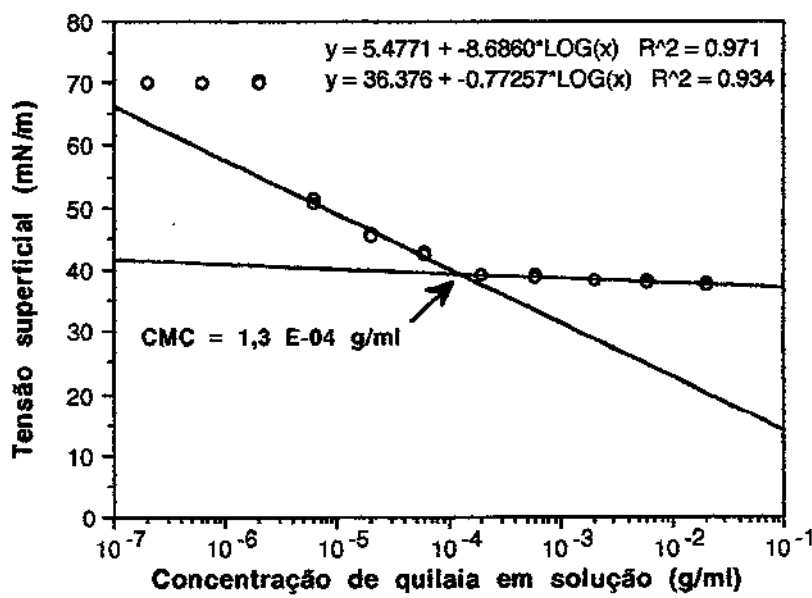


FIGURA P.4. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica A.

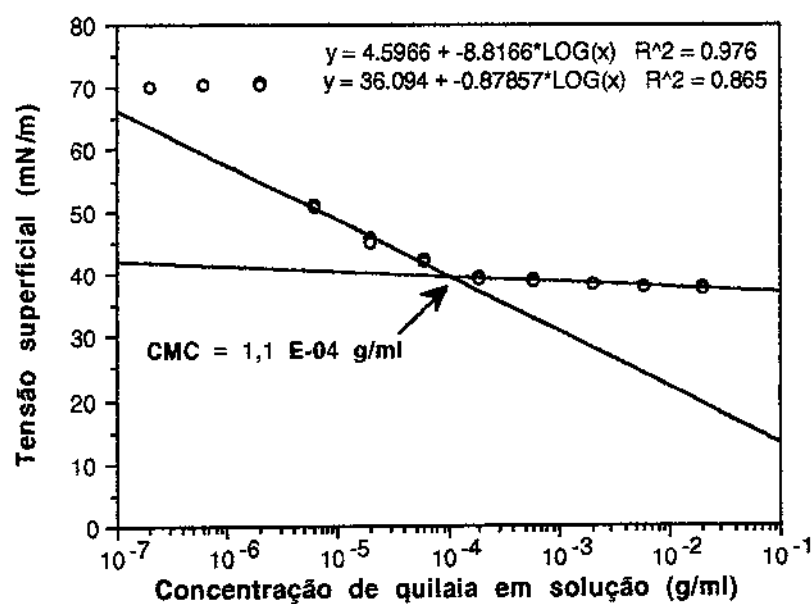


FIGURA P.5. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica B.

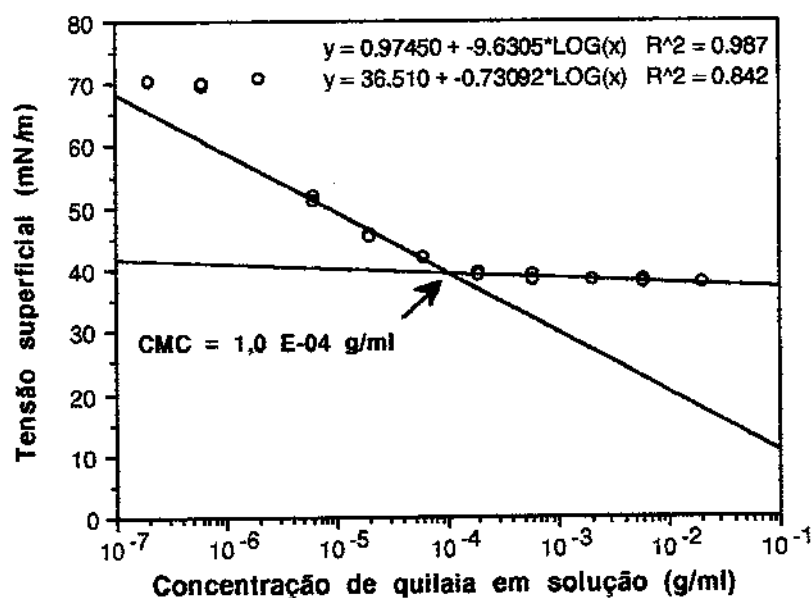


FIGURA P.6. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica C.

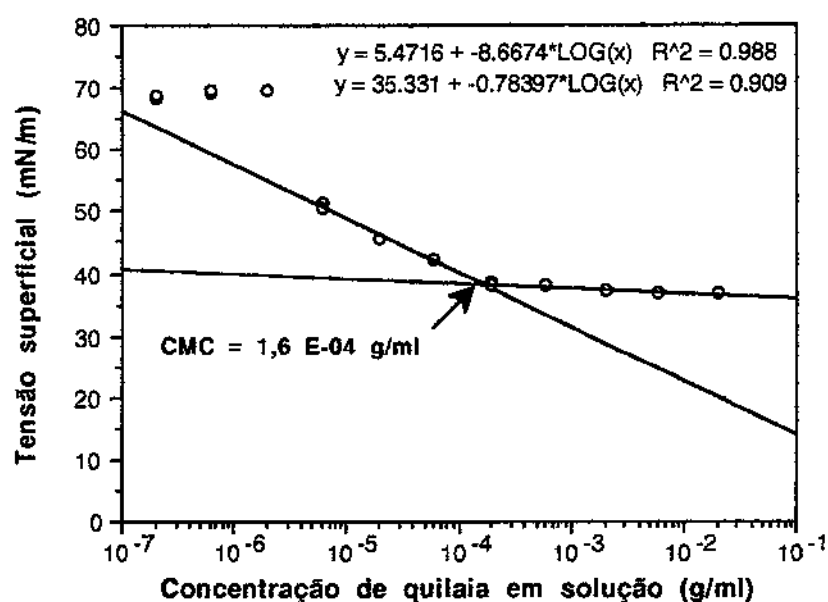


FIGURA P.7. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica A.

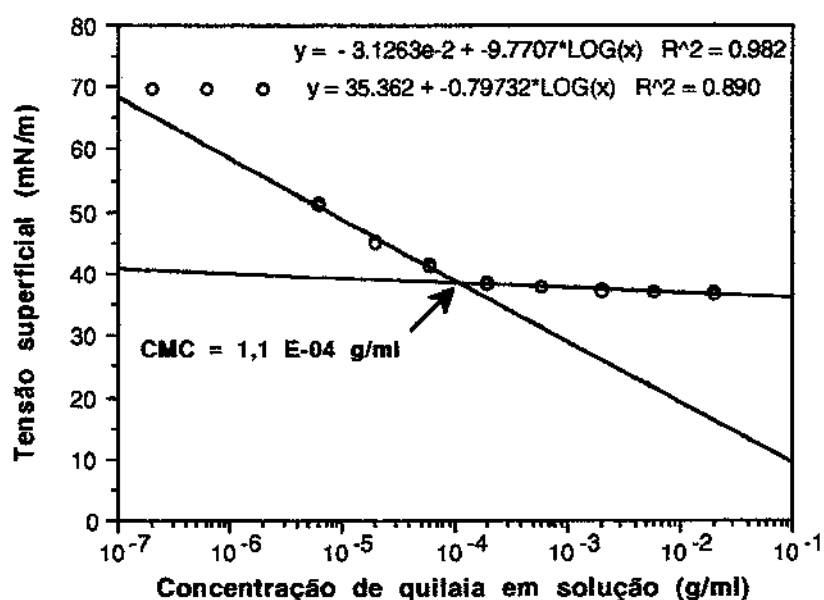


FIGURA P.8. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica B.

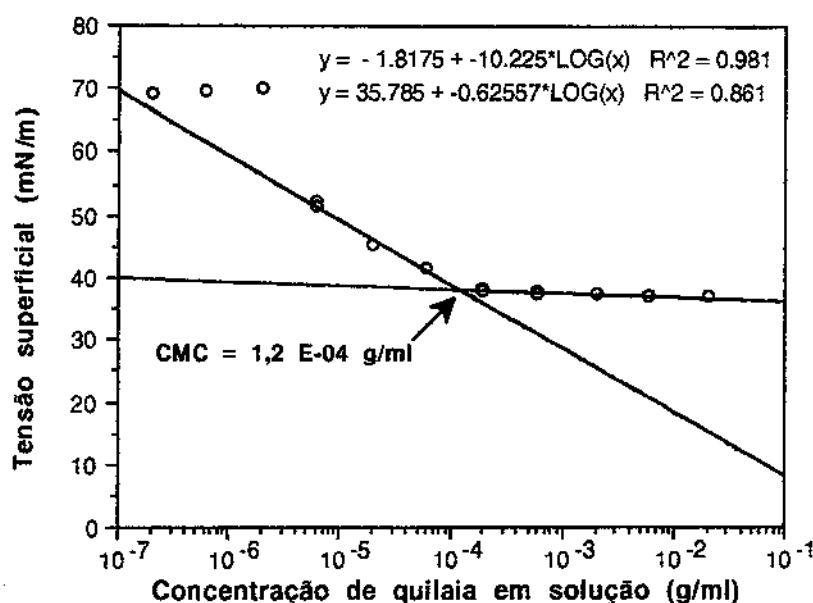


FIGURA P.9. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 3,0 e sem adição de NaCl: réplica C.

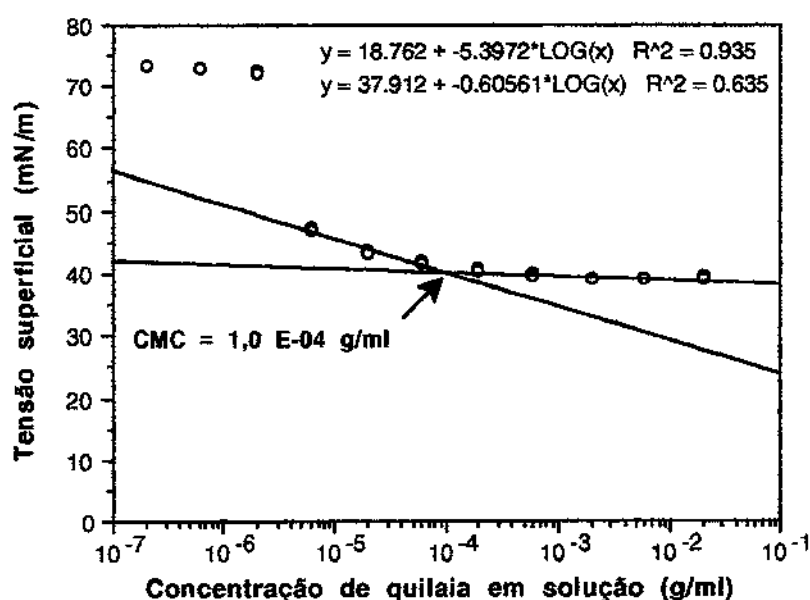


FIGURA P.10. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

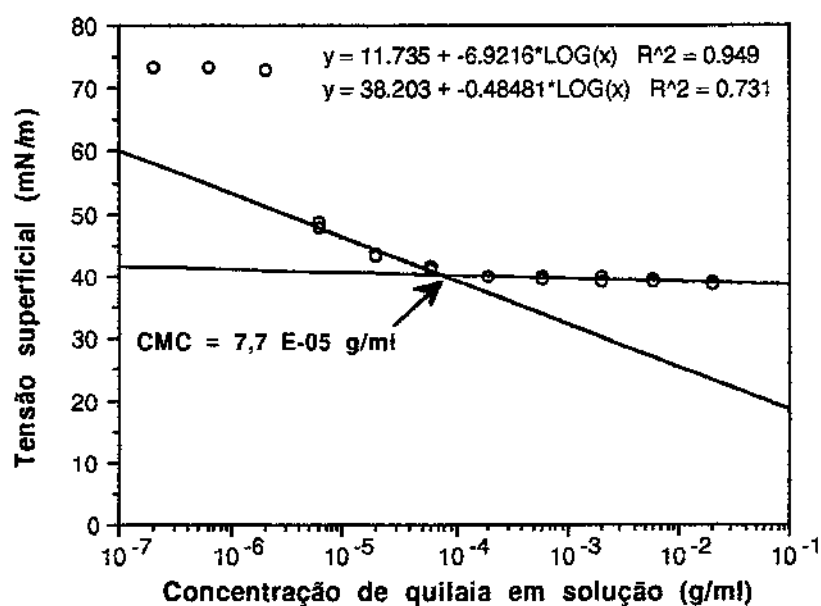


FIGURA P.11. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

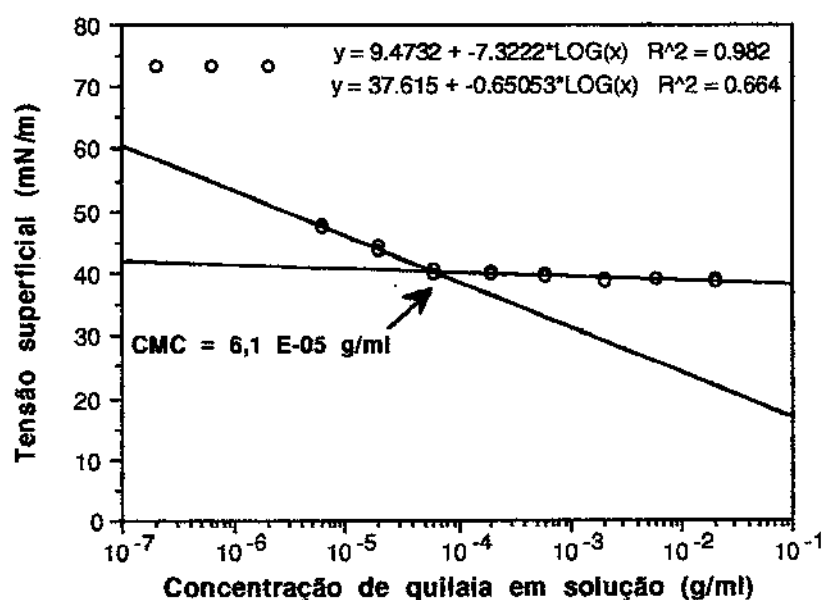


FIGURA P.12. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

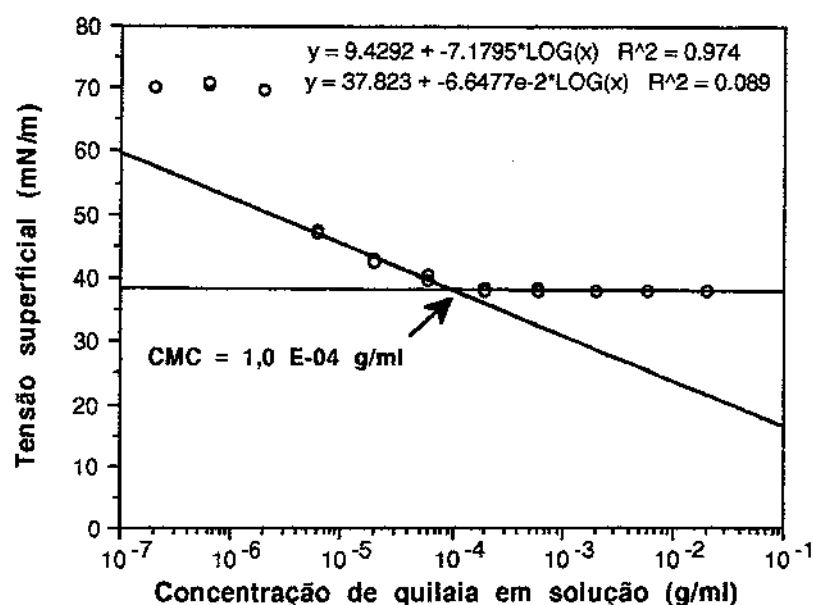


FIGURA P.13. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

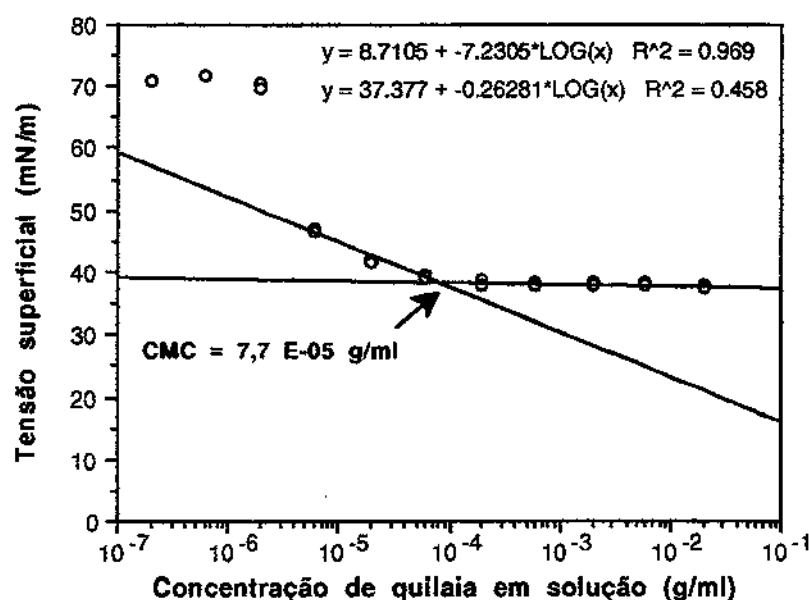


FIGURA P.14. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

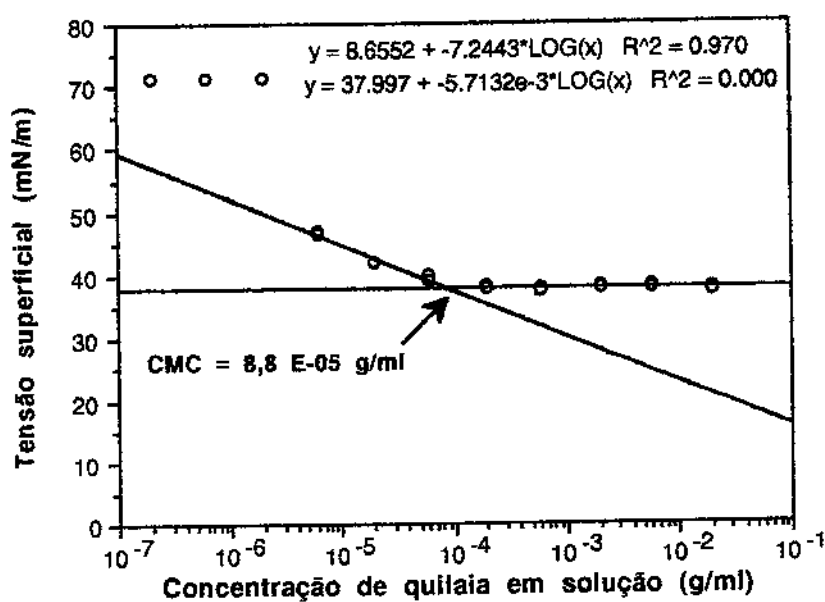


FIGURA P.15. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

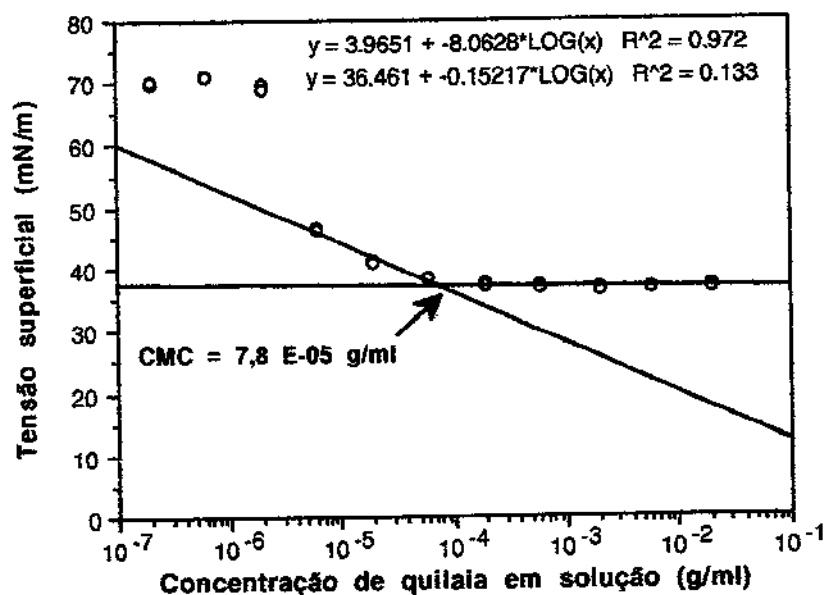


FIGURA P.16. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

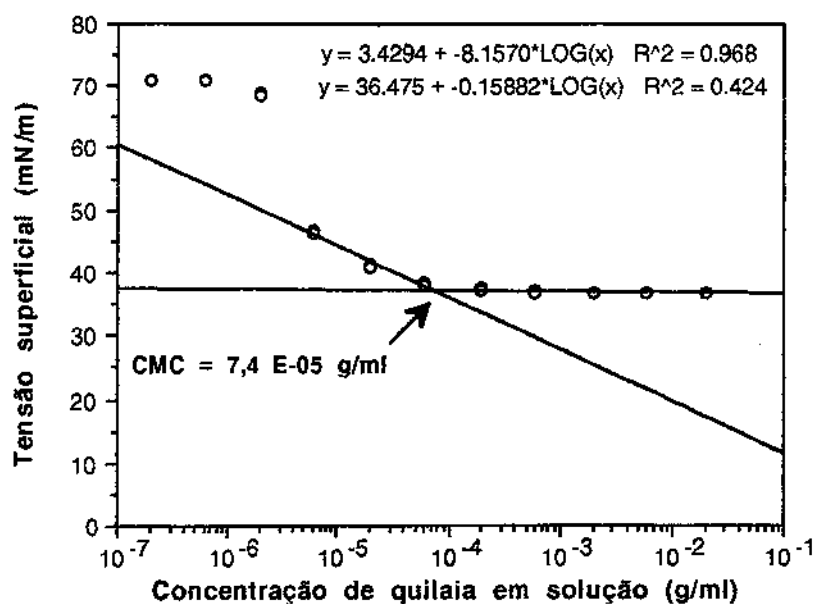


FIGURA P.17. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

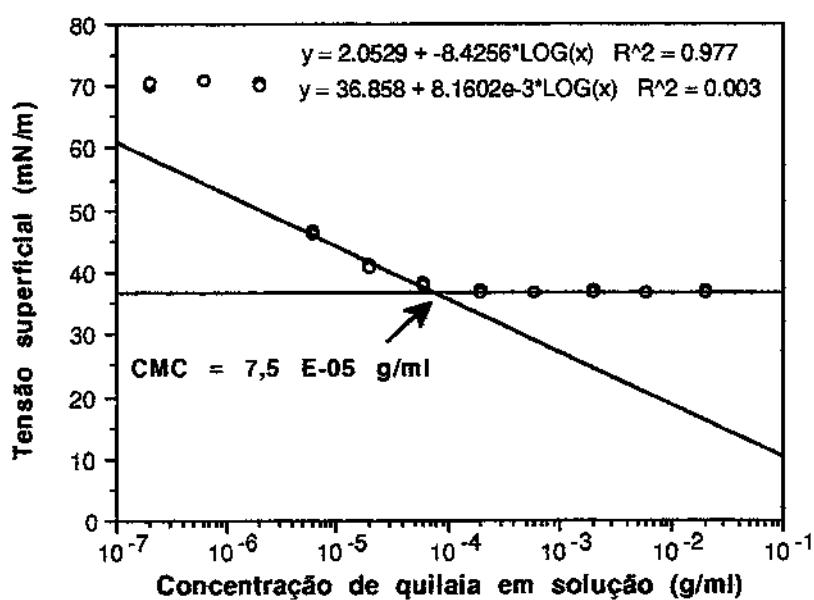


FIGURA P.18. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 3,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

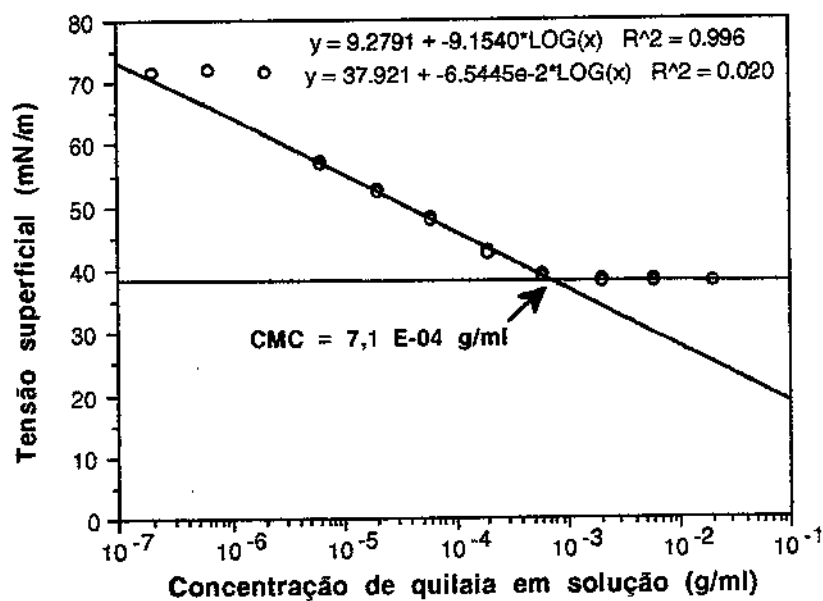


FIGURA P.19. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica A.

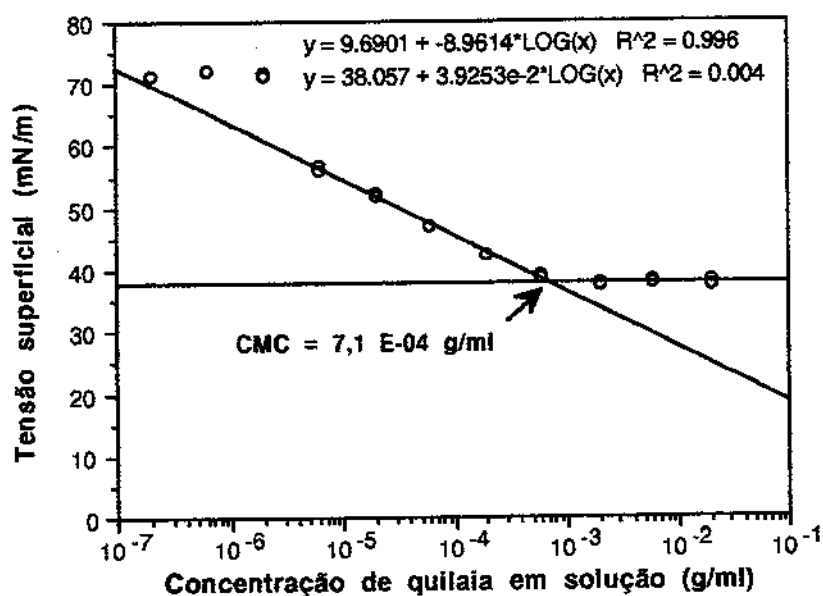


FIGURA P.20. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica B.

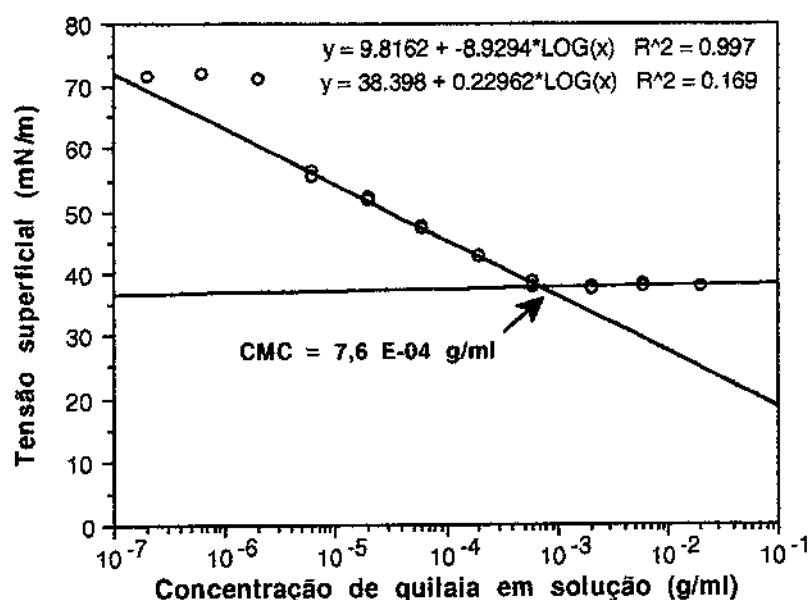


FIGURA P.21. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica C.

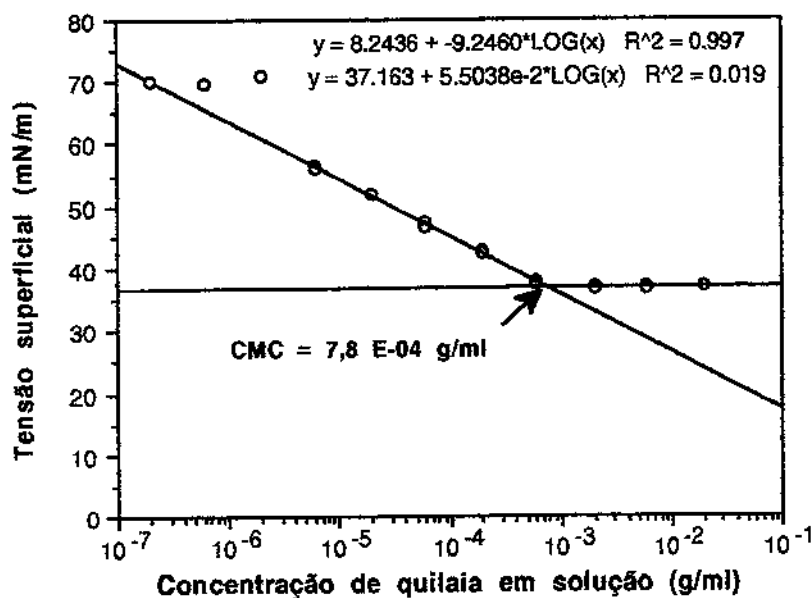


FIGURA P.22. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica A.

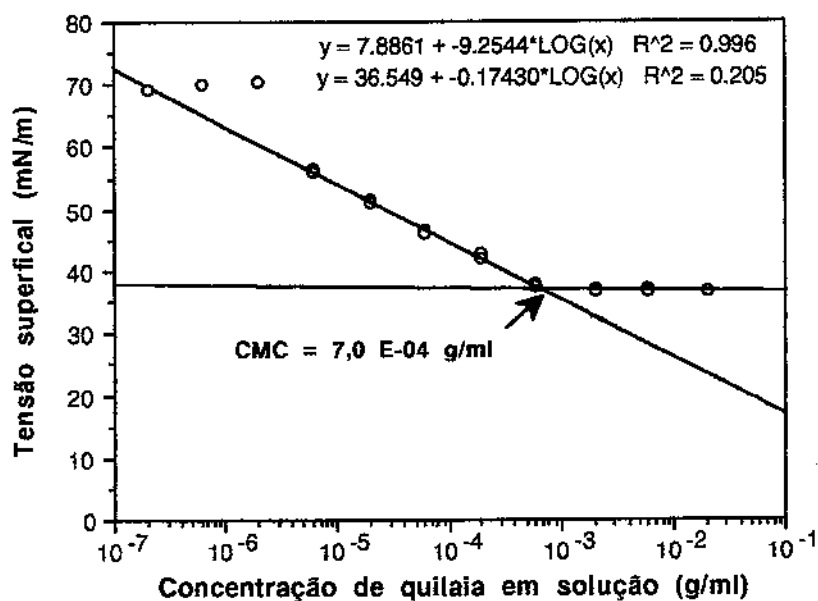


FIGURA P.23. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica B.

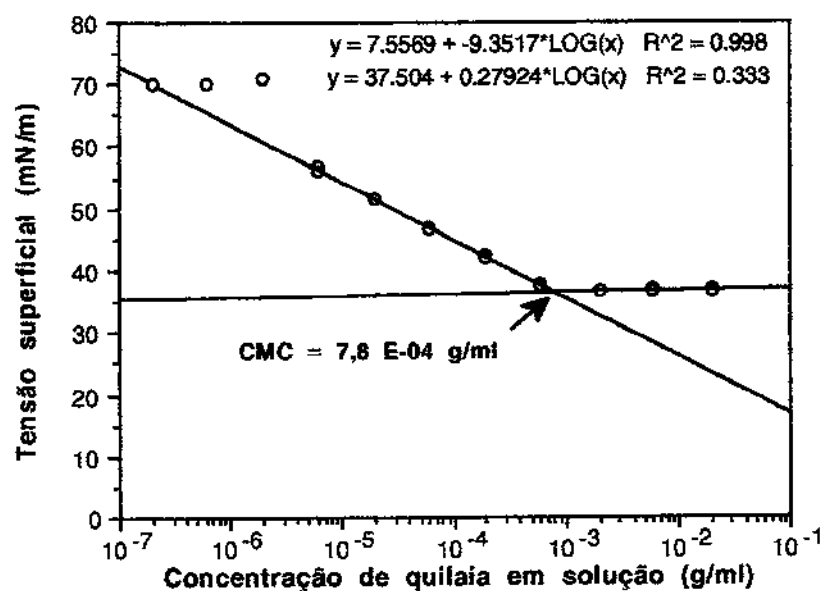


FIGURA P.24. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica C.

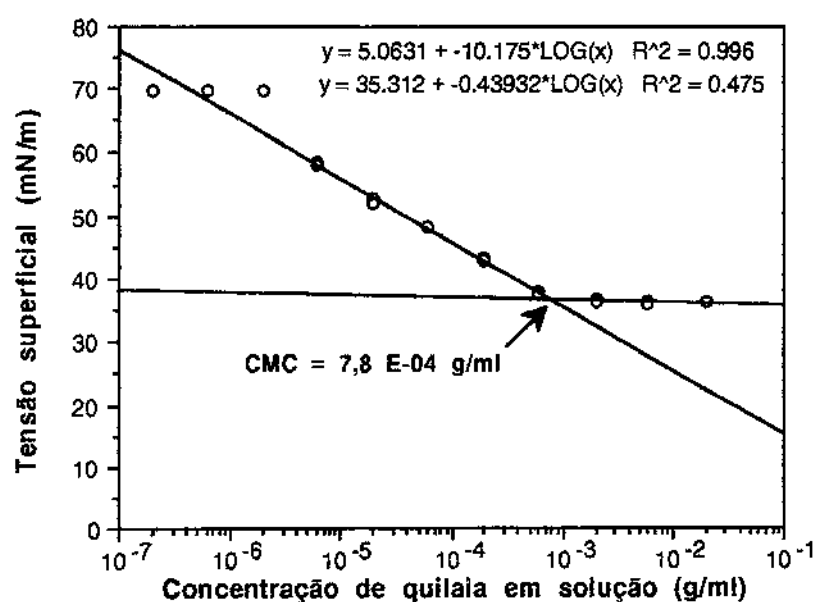


FIGURA P.25. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica A.

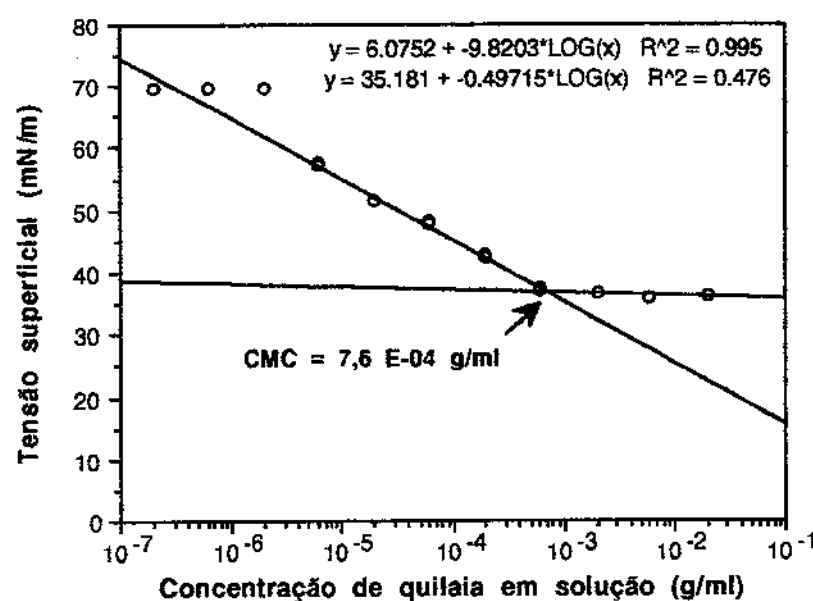


FIGURA P.26. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica B.

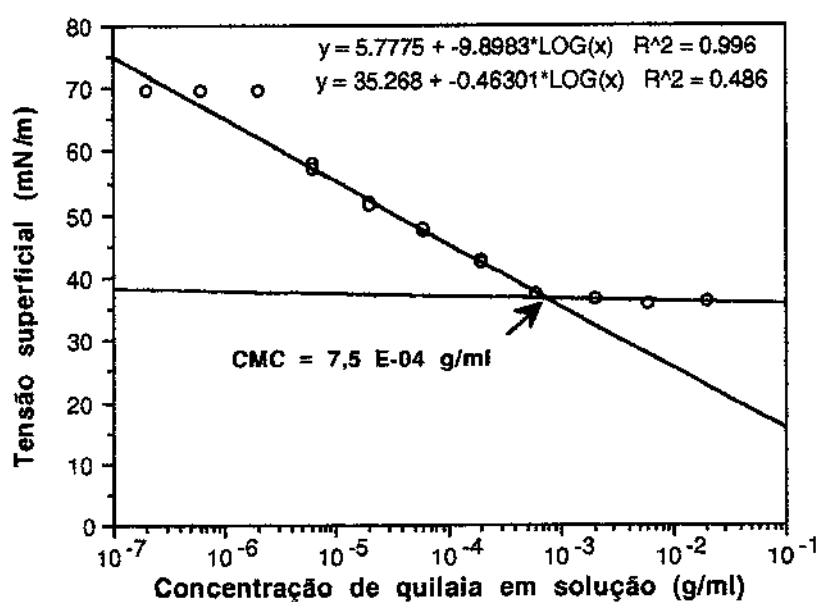


FIGURA P.27. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 4,5 e sem adição de NaCl: réplica C.

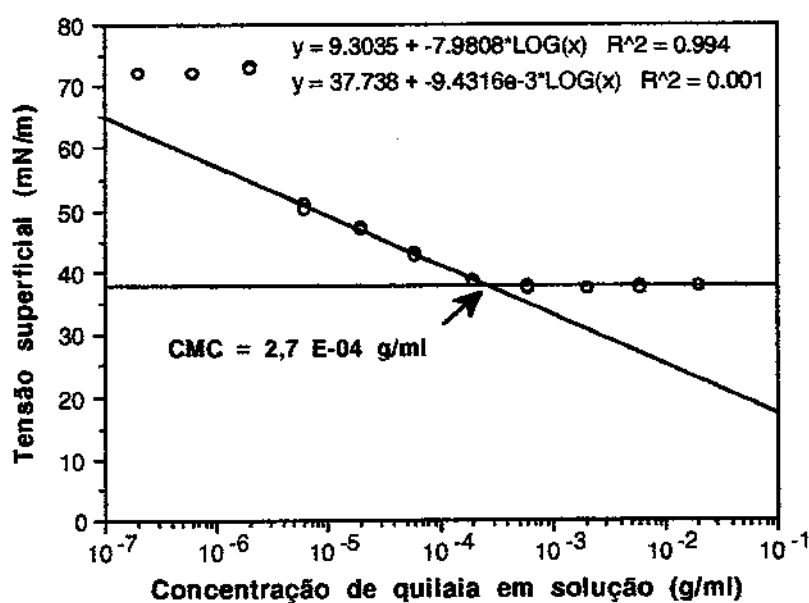


FIGURA P.28. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

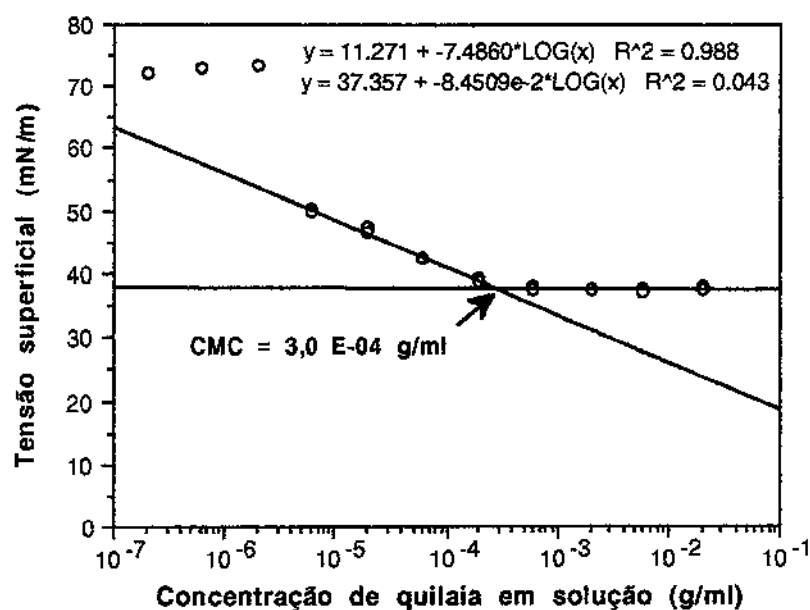


FIGURA P.29. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

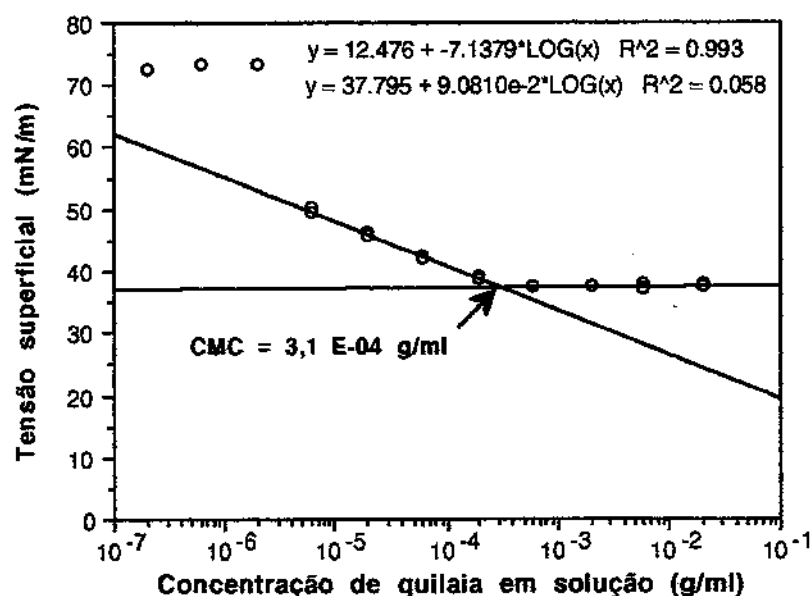


FIGURA P.30. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

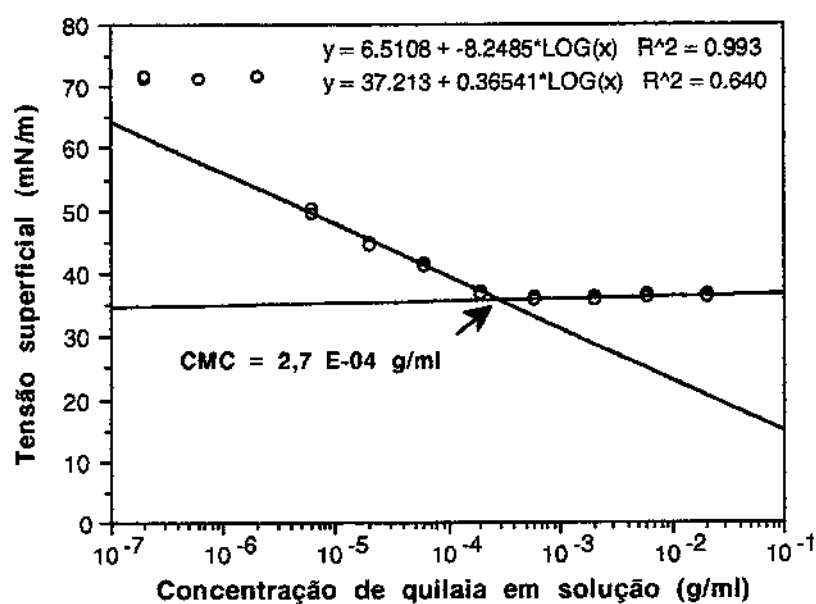


FIGURA P.31. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

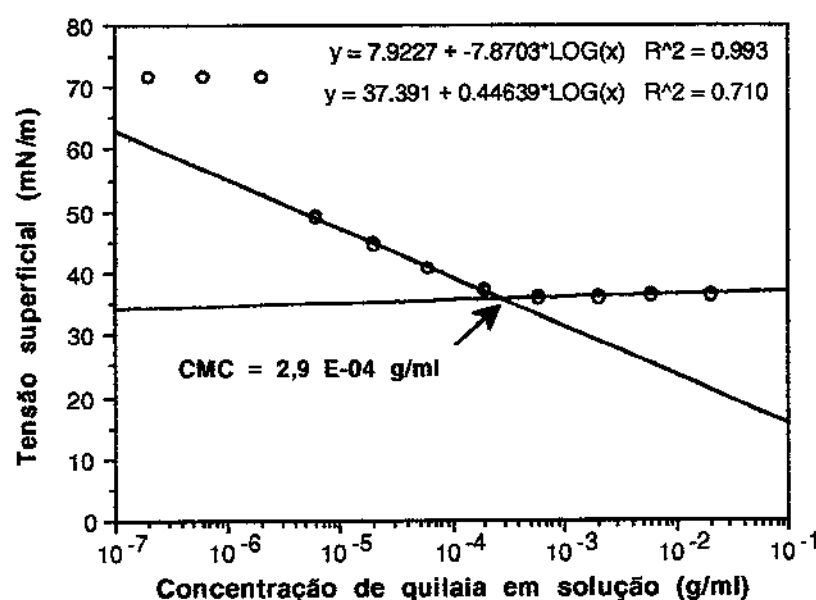


FIGURA P.32. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

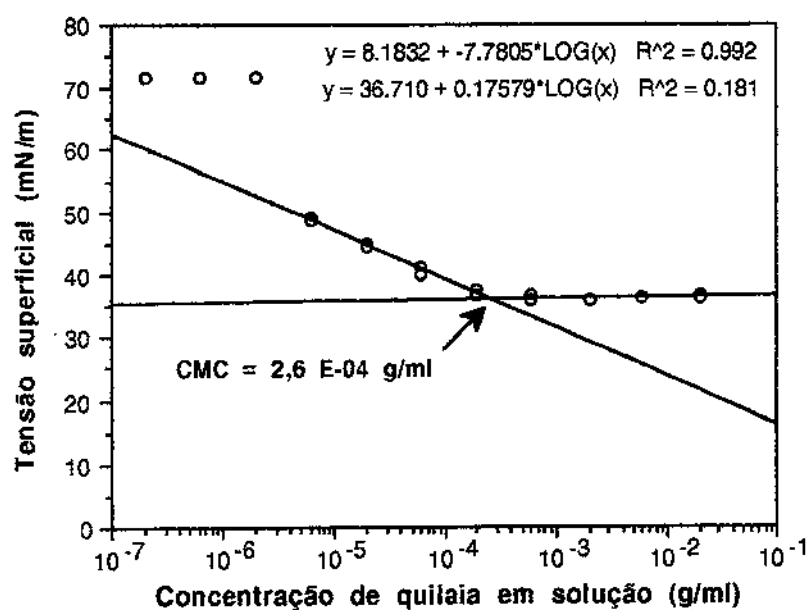


FIGURA P.33. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

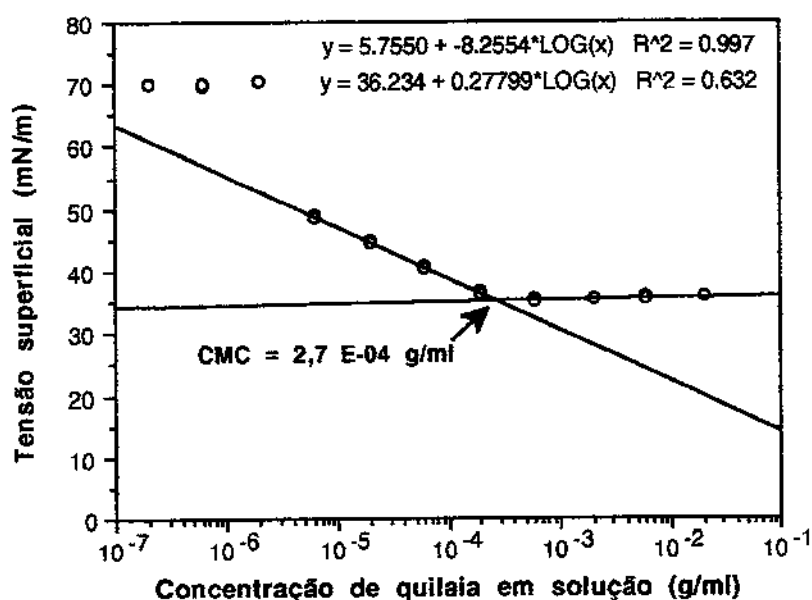


FIGURA P.34. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

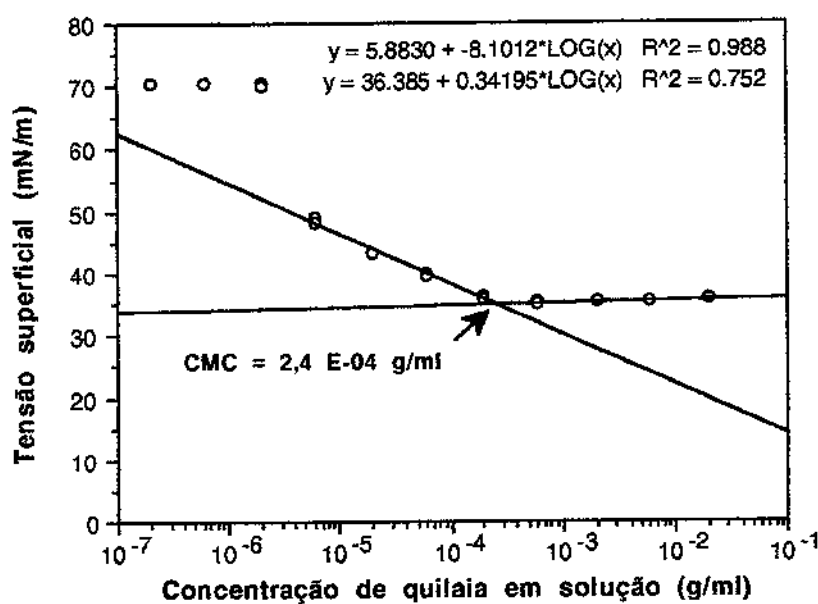


FIGURA P.35. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

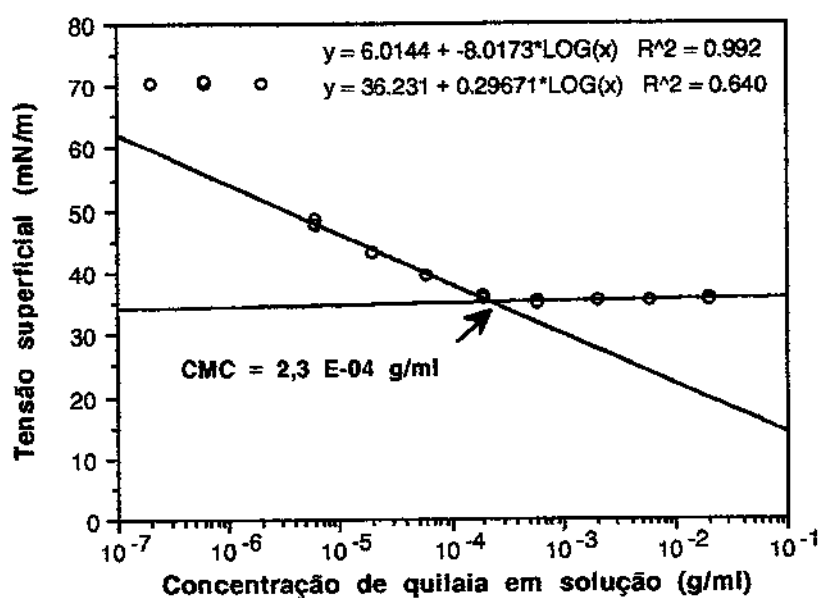


FIGURA P.36. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 4,5 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

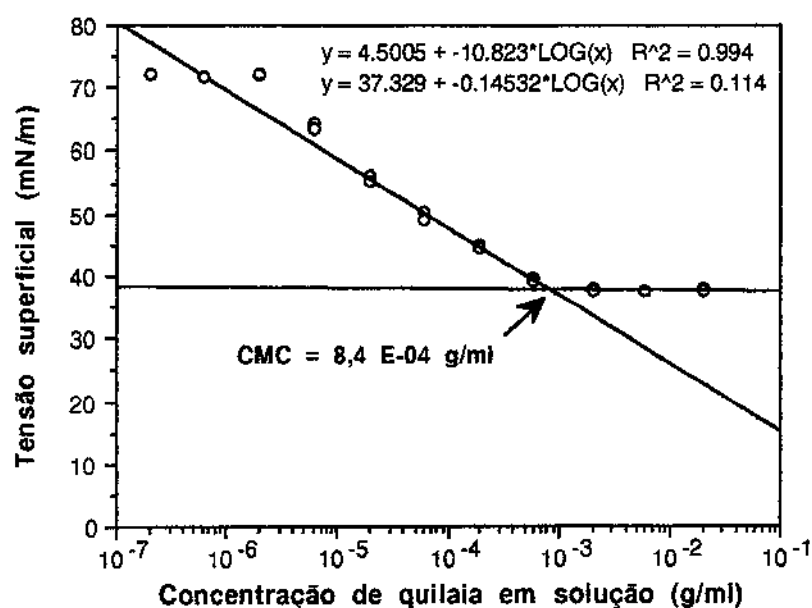


FIGURA P.37. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica A.

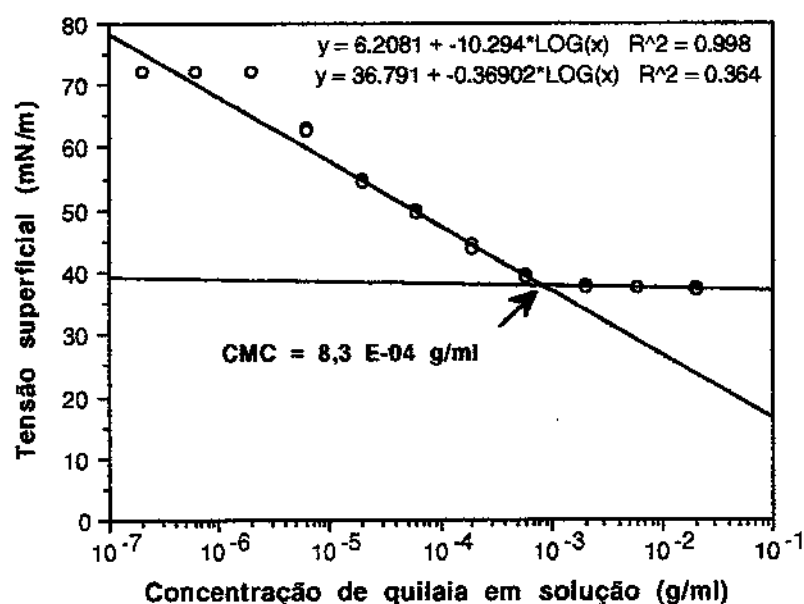


FIGURA P.38. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica B.

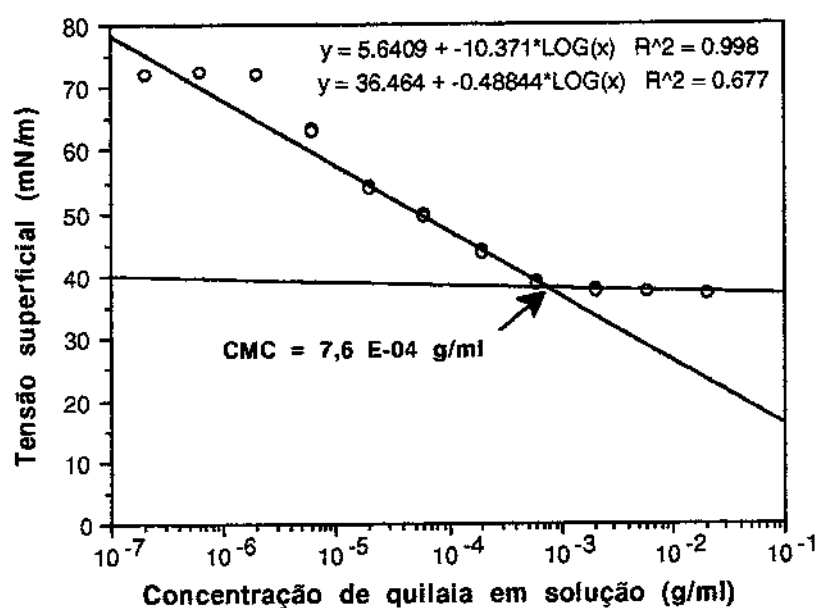


FIGURA P.39. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica C.

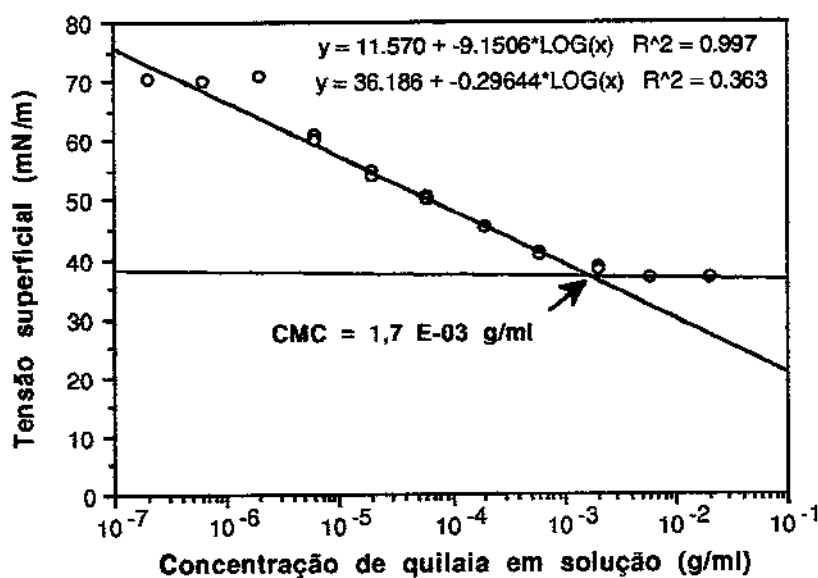


FIGURA P.40. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica A.

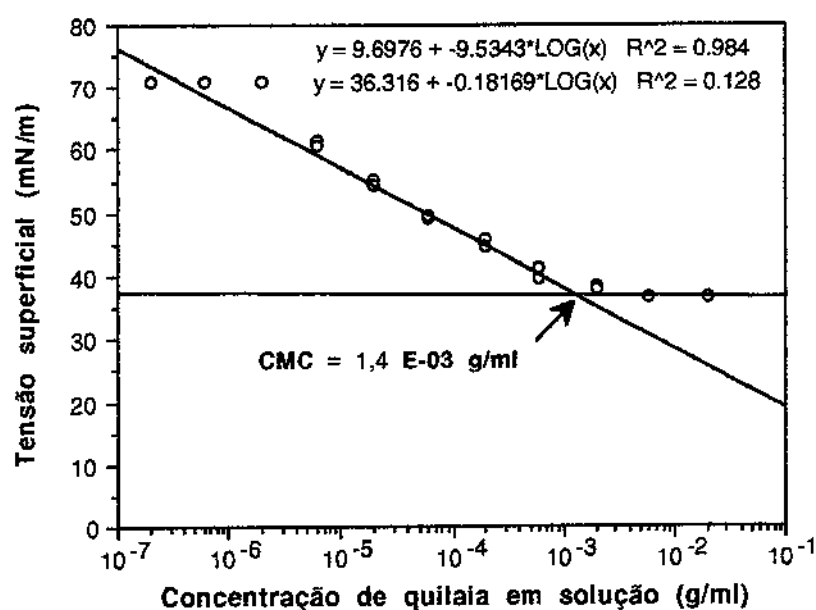


FIGURA P.41. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica B.

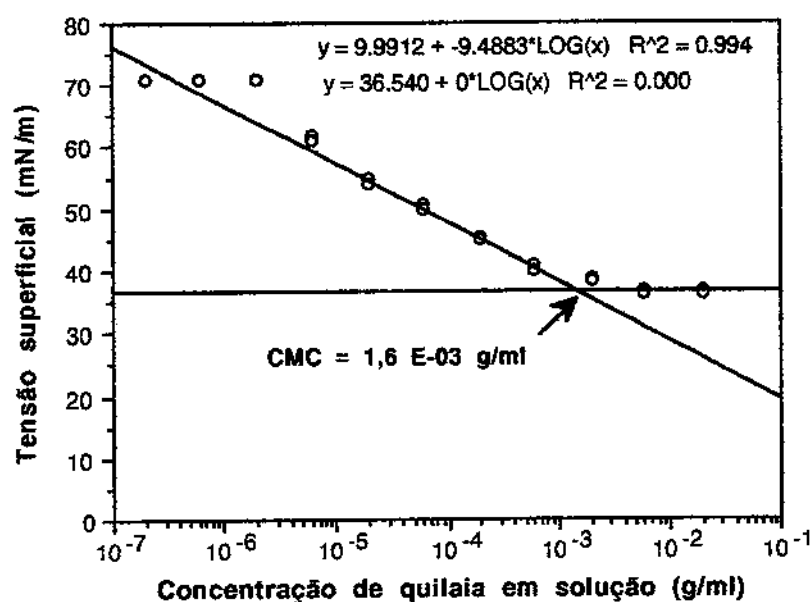


FIGURA P.42. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica C.

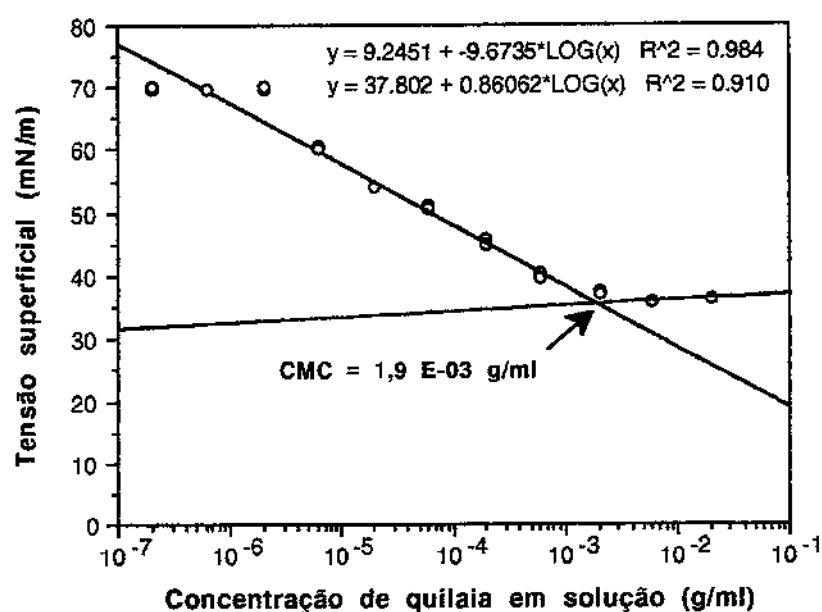


FIGURA P.43. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica A.

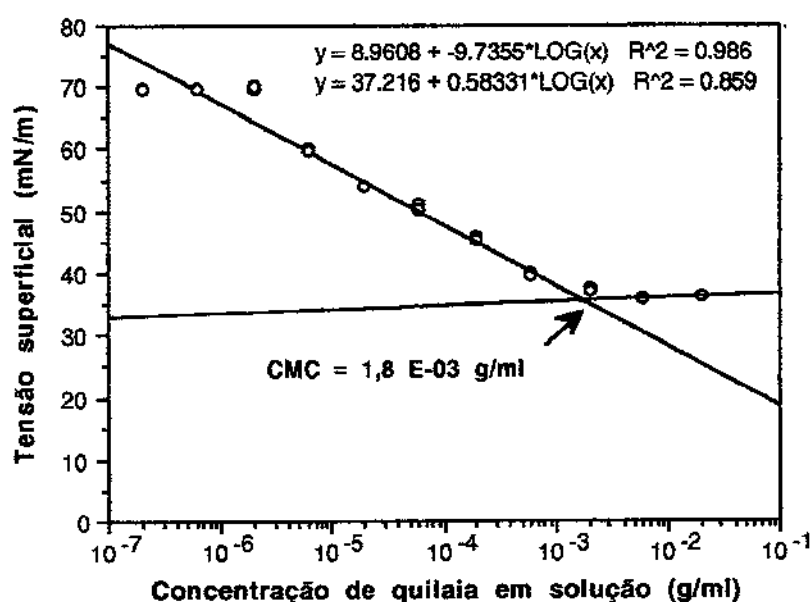


FIGURA P.44. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica B.

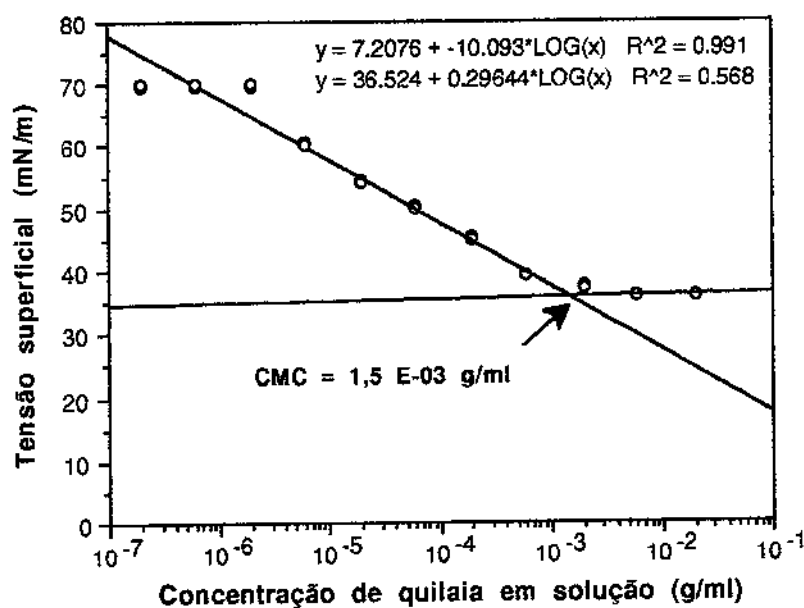


FIGURA P.45. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 6,0 e sem adição de NaCl: réplica C.

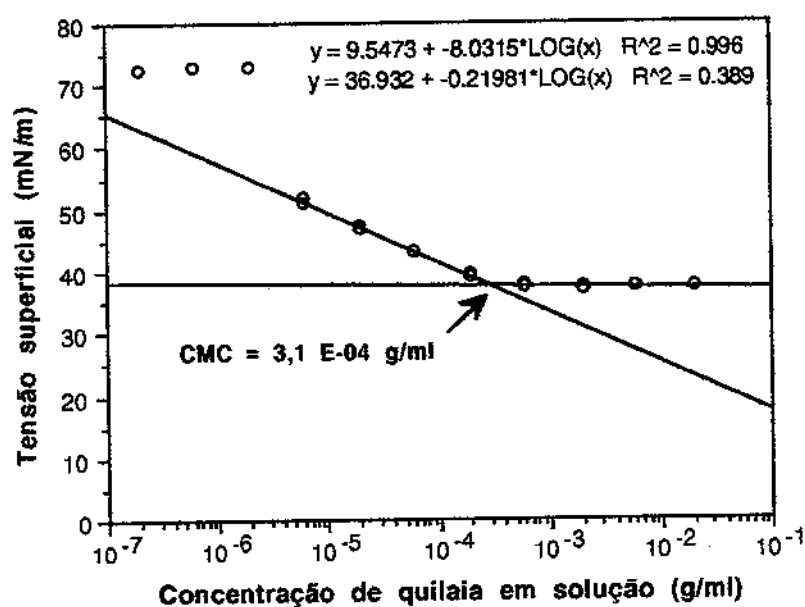


FIGURA P.46. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

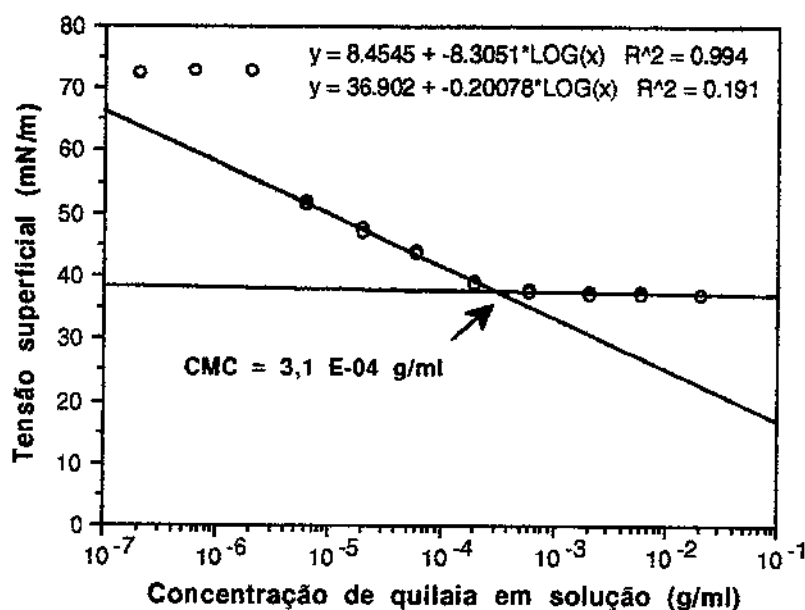


FIGURA P.47. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

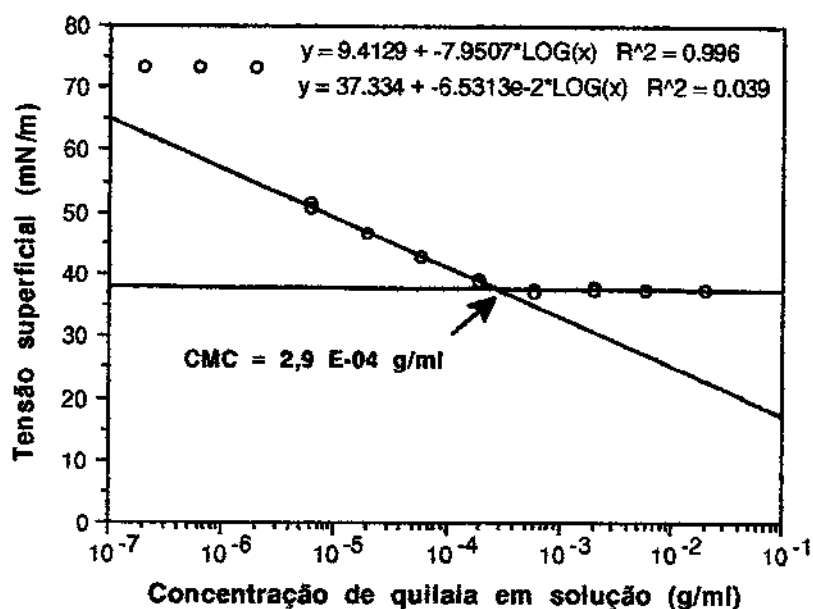


FIGURA P.48. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 25 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

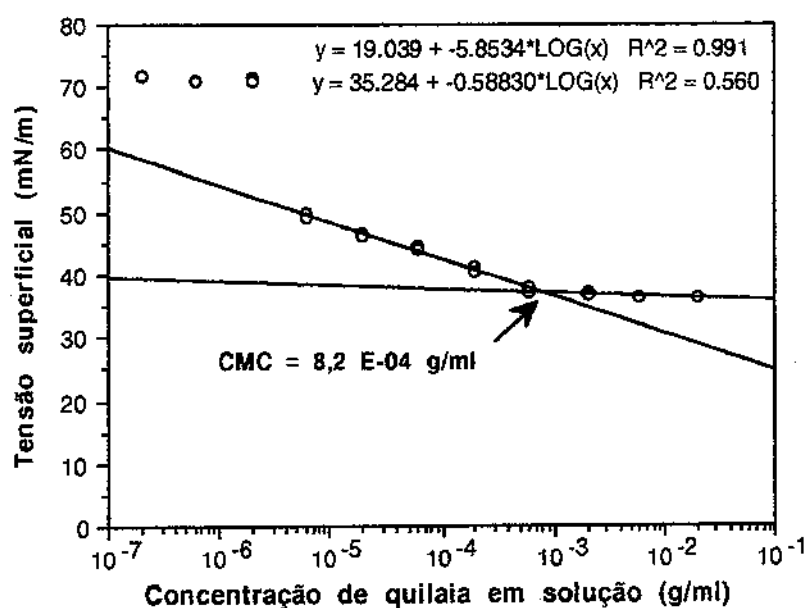


FIGURA P.49. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

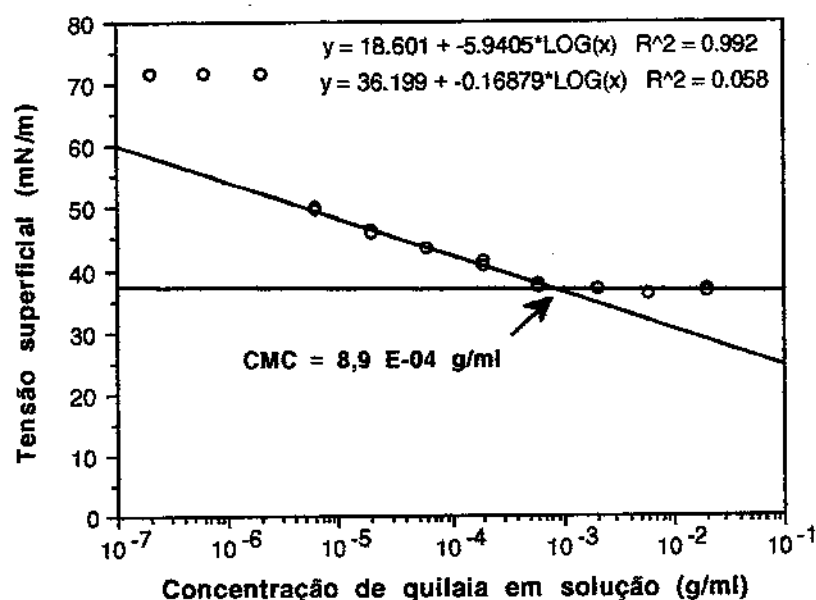


FIGURA P.50. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

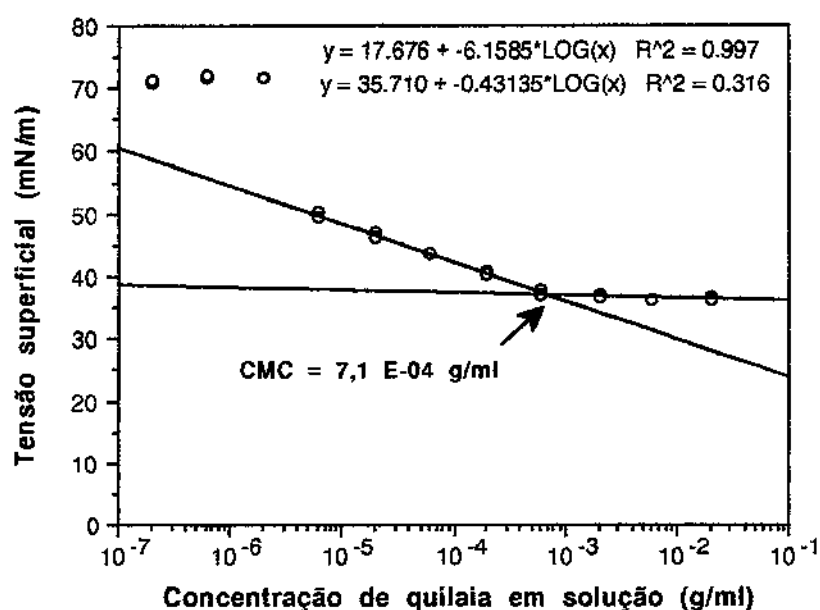


FIGURA P.51. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 35 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.

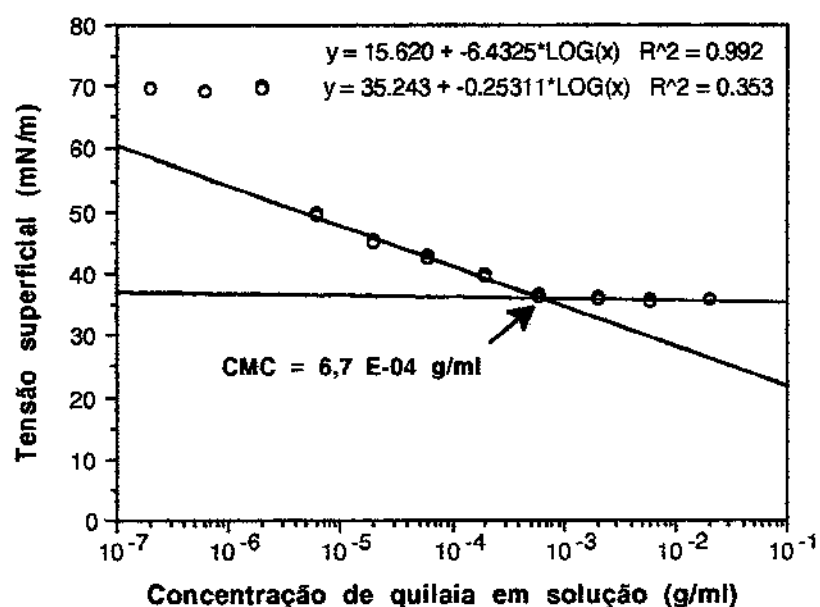


FIGURA P.52. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica A.

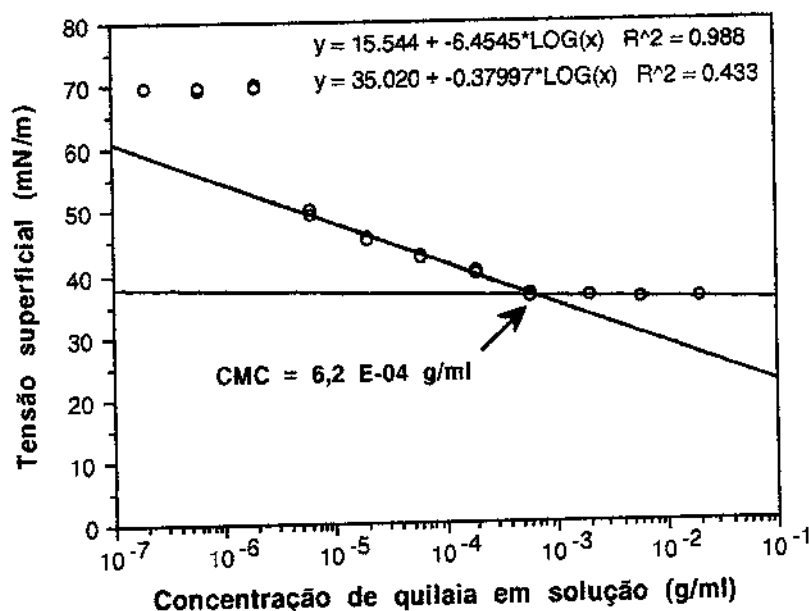


FIGURA P.53. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica B.

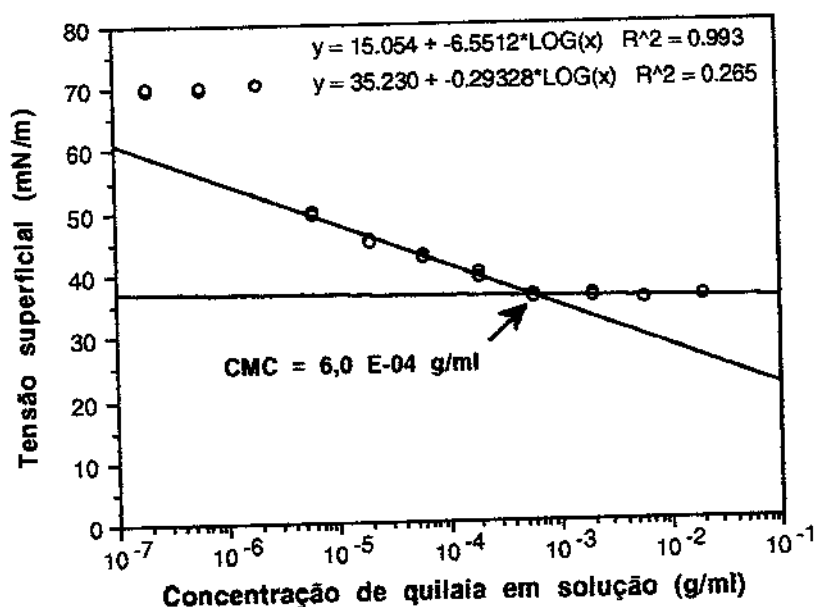


FIGURA P.54. Obtenção da CMC da quilaia Sigma a 45 °C, pH 6,0 e 0,5M de NaCl adicionado: réplica C.