



**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES CORANTES DE  
ANTOCIANINAS BASEADAS NA PRODUÇÃO DE EMULSÕES  
DUPLAS E APLICAÇÕES**

**Liandra Gracher Teixeira**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito do programa de Dupla  
Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientada por

**Prof. Doutora Maria Filomena F. Barreiro**

**Prof. Doutora Isabel C.F.R. Ferreira**

**Prof. Doutora Fernanda Vitória Leimann**

**Bragança**

**2019**



**Liandra Gracher Teixeira**

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES CORANTES DE  
ANTOCIANINAS BASEADAS NA PRODUÇÃO DE EMULSÕES  
DUPLAS E APLICAÇÕES

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito do programa de Dupla  
Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

**Orientada por**

Prof. Doutora Maria Filomena F. Barreiro

Prof. Doutora Isabel C.F.R. Ferreira

Prof. Doutora Fernanda Vitória Leimann

**Bragança**

**2019**

*“Great Works are performed not by strenght but by  
perseverance”*

*-Samuel Johnson*

## AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Primeiramente agradeço a Deus que me sustentou e me deu forças para a conclusão deste trabalho e na realização deste sonho.

As Professoras Dra. Filomena Barreiro, Dra. Isabel C.F.R Ferreira e Dra. Fernanda Vitória Leimann pela oportunidade, confiança, incansável dedicação, total colaboração no solucionar de dúvidas, por todas palavras de incentivo e zelo na orientação deste trabalho. Estou imensamente agradecida pela vossa dedicação e por todo o ensinamento proporcionado.

Agradeço a toda equipa LRSE-LCM em especial Isabel Fernandes, Stephany Rezende e Samara Cristina da Silva por todo apoio, amizade e pela disposição em esclarecer todas as dúvidas, também agradeço pela equipa BioChemCore, em especial Filipa Reis, Ângela Fernandes, Sandrina Heleno, João Barreira e Lillian Barros.

A minha gratidão aos meus amigos da UTFPR que estiveram comigo no IPB em especial Beatriz Paschoalinotto, Larissa Perinoto, Gabriela Possebon e Amarilis Carvalho pelos momentos vividos e pelo apoio durante o intercâmbio e aos demais amigos em especial Lucas Farinha Bósio e Cristhian Rafael Lopes.

Deixo registrado o amor incondicional e o reconhecimento à minha família, em especial aos meus pais: Mykhelle Gracher e Leandro Teixeira, e ao meu irmão Eduardo Gracher Teixeira que não mediram esforços para que este sonho se tornasse realidade, além da educação, confiança, carinho, incentivo e amor que gravaram em meu coração a inspiração em concluir esta etapa, sou eternamente grata.

A todos os Mestres Professores das duas instituições, que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional. Sou muito grata em estudar em instituições com alta qualidade de ensino.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente me acompanharam, aconselharam e auxiliaram a realizar este trabalho.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CIMO (UID/AGR/00690/2019) através do FEDER no âmbito do PT2020 e LA LSRE-LCM (UID/EQU/50020/2019) financiado pela FCT/MCTES (PIDDAC). Este trabalho é também financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto Norte-01-0247-FEDER-024479 projeto *Mobilizador ValorNatural*.



## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ADITIVOS ALIMENTARES.....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Corantes sintéticos.....	5
1.1.2. Corantes naturais: principais vantagens e problemas .....	6
<b>1.2. CORANTE NATURAL: ANTOCIANINAS.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Antocianinas .....	7
1.2.2. <i>Sambucus nigra</i> L. ....	9
<b>1.3. EMULSÕES SIMPLES E MÚLTIPLAS .....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Principais problemas: processo que conduzem à instabilidade de uma emulsão .	15
1.3.2. Principais soluções: método de estabilização .....	17
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. PADRÕES E REAGENTES.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>Sambucus nigra</i> L. ....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE <i>Sambucus nigra</i> L. ....</b>	<b>22</b>
2.3.1. Avaliação da cor em função do pH .....	22
2.3.2. Análise Termogravimétrica (TGA) .....	23
2.3.3. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	23
<b>2.4. PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES .....</b>	<b>23</b>
2.4.1. Preparação da emulsão primária A/O .....	23
2.4.2. Preparação da emulsão dupla A/O/A .....	24
<b>2.5. CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES .....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Microscopia de ótica (MOP) .....	25
2.5.2. Determinação do “ <i>creaming index</i> ” .....	25
<b>2.6. TESTES DE APLICAÇÃO .....</b>	<b>26</b>
2.6.1. Testes de aplicação utilizando tampões na gama 4-9 .....	26
2.6.2. Testes de aplicação em matriz alimentar .....	27
<b>2.7. CARACTERIZAÇÃO UTILIZADAS NOS TESTES DE APLICAÇÃO .....</b>	<b>27</b>
2.7.1. Determinação do pH.....	27

2.7.2. Determinação da cor.....	27
2.7.3. Análise Estatística .....	28
2.7.4. Avaliação Nutricional.....	29
2.7.5. Análise Estatística .....	31
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE <i>Sambucus nigra</i> L.</b> .....	<b>34</b>
3.1.1. Obtenção do extrato seco.....	34
3.1.2. Avaliação do comportamento corante com o pH .....	34
3.1.3. Análise Termogravimétrica (TGA) .....	36
3.1.4. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	37
<b>3.2. PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES .....</b>	<b>39</b>
3.2.1. Emulsão simples .....	39
3.2.2. Emulsão dupla .....	39
<b>3.3. ESTABILIDADE DAS EMULSÕES DUPLAS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. TESTES DE APLICAÇÃO UTILIZANDO TAMPÕES NA GAMA DE PH 4-9</b> .....	<b>45</b>
3.4.1. Análise Visual .....	45
3.4.2. Análise Estatística .....	47
<b>3.5. TESTES DE APLICAÇÃO EM MATRIZ ALIMENTAR .....</b>	<b>53</b>
3.5.1. Análise Visual .....	53
3.5.2. Análise Estatística .....	57
<b>3.6. IMPACTO DA SOLUÇÃO DESENVOLVIDA NO VALOR NUTRICIONAL</b> .....	<b>61</b>
<b>4. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>69</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>6. APÊNDICES .....</b>	<b>83</b>
<b>Apêndice A .....</b>	<b>83</b>
<b>Apêndice B .....</b>	<b>85</b>
<b>Apêndice C .....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral das antocianinas.....	7
Figura 2. Estruturas e nomes das principais antocianinas. ....	8
Figura 3. Transformação do catião flavílico.....	9
Figura 4. Frutos de <i>Sambucus nigra</i> L. ....	10
Figura 5. Estrutura do Span 80. ....	12
Figura 6. Estrutura do Tween 80. ....	12
Figura 7. Emulsões simples e múltiplas. ....	12
Figura 8. Processos que conduzem à instabilidade de uma emulsão.....	16
Figura 9. (A) Fruto de <i>Sambucus nigra</i> L.; (B) Juicer; (C) Centrifugadora; (D) Extrato sendo filtrado. ....	22
Figura 10. Avaliação da estabilidade das emulsões (altura da camada de s�rum (HS) e a altura total (HT)). ....	26
Figura 11. Colorímetro. Exemplificação da utilização com uma medição de calibra��em. ....	28
Figura 12. Extrato de <i>Sambucus nigra</i> L. após secagem por <i>spray drying</i> . ....	34
Figura 13. Observação visual do comportamento do corante para diferentes valores de pH. ....	35
Figura 14. Espectro UV-VIS do corante em diferentes pH. ....	35
Figura 15. Análise Termogravimétrica do extrato de sabugueiro estudado no presente trabalho: análise TG (gráfico da esquerda), análise DTG (gráfico da direita). ....	36
Figura 16. Leitura do espectro FTIR do extrato de <i>Sambucus nigra</i> L. ....	38
Figura 17. Aspeto da emulsão primária preparada: aspeto visual emulsão primária incorporando extrato de sabugueiro (A); Análise microscópica da emulsão primária (ampliação de 400X) (B). ....	39
Figura 18. Aspeto visual das emulsões duplas preparadas e respetiva análise por microscopia ótica (ampliação 400X). Adicionalmente apresenta-se uma representação esquemática da morfologia típica para as emulsões duplas. ....	40
Figura 19. Distribuição tridimensional de marcadores para os valores de pH de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos. ....	51

Figura 20. Distribuição tridimensional de marcadores para os tempos de armazenamento de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos. ....	52
Figura 21. Distribuição tridimensional de marcadores para as diferentes formulações de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos. ....	53
Figura 22. Valores de luminosidade para os diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de armazenamento. ext: extrato; SA: sem armazenamento; DE: emulsão dupla. ....	57
Figura 23. Valores de intensidade da cor vermelha para os diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de armazenamento. ext: extrato; SA: sem armazenamento; DE: emulsão dupla. ....	58
Figura 24. Valores de intensidade da cor amarela para os diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de armazenamento. ext: extrato; SA: sem armazenamento; DE: emulsão dupla. ....	59
Figura 25. Distribuição tridimensional de marcadores para os diferentes tempos de armazenamento dos alimentos de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos. ....	60
Figura 26. Distribuição tridimensional de marcadores para as diferentes formulações de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de corantes artificiais .....	6
Tabela 2. Aplicações industriais das emulsões.....	13
Tabela 3. Aplicações de dupla emulsão no encapsulamento de compostos bioativos. ...	15
Tabela 4. Aplicações industriais das emulsões.....	17
Tabela 5. Valores referentes a análise de TGA .....	37
Tabela 6. Registo simplificado das imagens por microscópio ótico das emulsões duplas (Ampliação 400x).....	43
Tabela 7. Imagens dos resultados do índice de estabilidade (CI %) .....	44
Tabela 8. Aplicação da emulsão dupla de razão 20/80; 30/70; 40/60 e 50/50 em tampões de pH 4-9 .....	46
Tabela 9. Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (20/80) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento .....	48
Tabela 10. Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (30/70) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento. ....	48
Tabela 11. Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (40/60) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento. ....	49
Tabela 12. Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (50/50) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento. ....	50
Tabela 13. Aplicação do corante livre e incorporado em emulsões duplas em matrizes alimentares na temperatura refrigerada (5°C) .....	55
Tabela 14. Aplicação do corante livre e incorporado em emulsões duplas em matrizes alimentares na temperatura ambiente (23°C). ....	56
Tabela 15. Composição proximal, valor energético e açúcares livres das diferentes matrizes alimentares (média ± DP, n=9).....	64
Tabela 16. Composição em ácidos gordos das matrizes alimentares estudadas (média ± DP, n=9).....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A/O</b>	Água-em-óleo
<b>A/O/A</b>	Água-em-óleo-em-água
<b>ATR</b>	Reflexão total atenuada
<b>TGA</b>	Análise termogravimétrica
<b>BHL</b>	Balanço hidrofílico-lipofílico
<b>CI</b>	<i>Cream index</i>
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa
<b>GC-FID</b>	Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>HPLC-RI</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração
<b>TG</b>	Curva termogravimétrica
<b>DDA</b>	Dose diária aceitável
<b>DE</b>	Emulsão dupla
<b>DTG</b>	Curva termogravimétrica derivada
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama

<b>FAME</b>	Ésteres metílicos de ácidos gordos
<b>HAP</b>	Homogeneizador de alta pressão
<b>FTIR</b>	Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>LDA</b>	Análise discriminante linear
<b>MO</b>	Microscopia ótica
<b>Tween 80</b>	Monooleato de polioxietileno sorbitano
<b>Span 80</b>	Monooleato de sorbitano
<b>O/A</b>	Óleo-em-água
<b>O/A/O</b>	Óleo-em-água-em-óleo
<b>PGPR</b>	Polirricinoleato de poliglicerol
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SD</b>	Desvio padrão
<b>TA</b>	Tempo de armazenamento
<b>TDAH</b>	Transtorno de déficit de hiperatividade
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta visível

## RESUMO

Os corantes são usados na indústria alimentar, química e farmacêutica, entre outras, para conferir cor, com o objetivo de tornar o produto mais atraente para os consumidores. Adicionalmente, nos últimos anos, a procura por produtos naturais seguros tem incrementado, devido à preocupação crescente dos consumidores pela adoção de um estilo de vida mais saudável. No caso concreto dos corantes, esta tendência resulta, principalmente, da imposição de doses máximas de utilização de alguns corantes sintéticos devido aos efeitos derivados do seu consumo excessivo. No entanto, do ponto de vista da aplicação, os corantes naturais apresentam algumas restrições, estando estas principalmente relacionadas com a instabilidade ao pH e temperatura. Uma das estratégias possíveis para aumentar a estabilidade e viabilizar o seu uso mais generalizado consiste na utilização de técnicas de microencapsulação ou emulsificação. Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo estabilizar um corante natural hidrofílico baseado em antocianinas (*Sambucus nigra* L.) através da preparação de emulsões duplas (água/óleo/água). Com este tipo de estratégia pretendeu-se conseguir uma maior estabilidade do corante a variações de pH. Primeiramente fez-se a caracterização do extrato quanto à estabilidade da cor ao pH, temperatura (análise termogravimétrica (TGA/DTG)) e análise estrutural (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)). Posteriormente, procedeu-se à otimização da preparação da emulsão dupla, afim de obter uma formulação estável, testando diferentes variáveis como a razão água/óleo da emulsão primária, razão emulsão primária/água, sistemas emulsionantes e energia mecânica aplicada. As emulsões duplas obtidas foram avaliadas quanto à estabilidade e morfologia e capacidade corante ao longo do tempo (teste efetuado com soluções tampão na gama de pH 4-9). Face aos resultados obtidos escolheu-se a emulsão mais promissora (50/50) que foi testada em matrizes alimentares de diferentes pHs como o iogurte (pH 4,65), bebida de arroz (pH 6,01), leite (pH 6,47) e bebida de soja (pH 7,92). Estas foram observadas visualmente e caracterizadas por análise colorimétrica e comparadas com a incorporação direta do extrato livre ao longo do armazenamento (0, 3 e 7 dias). Em síntese, a dupla emulsão incorporando extrato de *Sambucus nigra* L. e produzida com uma razão 50/50 (emulsão primária/ fase aquosa externa) mostrou-se capaz de proteger o corante em meios ácidos e básicos, confirmando o interesse da abordagem proposta neste trabalho no campo do desenvolvimento de

formulações corantes baseadas em corantes naturais. Adicionalmente, foi obtida uma coloração mais uniforme em função do pH.

**Palavras-chave:** Corantes naturais, *Sambucus nigra* L., estabilização ao pH, emulsões duplas, aplicações alimentares.

## ABSTRACT

Colorants are used in the food, chemical and pharmaceutical industries, among others, to impart color and increase product's attractiveness to consumers. Moreover, in recent years the demand for safe natural products has increased partly due to the growing concern to adopt a healthier lifestyle. In the case of colorants, this trend derives mainly from the imposition of the maximum intake doses allowed for some synthetic colorants, due to the effects resulting from their excessive consumption. However, from the point of view of the application, the natural colorants present some constraints, these being mainly related with the instability under certain pH and temperature conditions. One of the possible strategies to increase the stability of these colorants, and ensure their generalized application, is the use of microencapsulation or emulsion techniques. Thus, the main objective of the present work is to stabilize a natural hydrophilic colorant based on anthocyanins (*Sambucus nigra* L.) through the preparation of double emulsions (water/oil/water). This strategy is intended to ensure protection against pH modifications. Firstly, the extract was characterized regarding pH stability, temperature (thermogravimetric analysis (TG/DTA)) and structural analysis (Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR)). Subsequently, the preparation of the double emulsion was optimized in order to obtain a stable formulation, testing different variables such as the water/oil ratio of the primary emulsion, primary emulsion/water ratio, emulsification systems and applied mechanical energy were tested. The obtained double emulsions were evaluated regarding stability, morphology and coloring power through time (test done with buffer solution in the pH range of 4-9). Following these tests, the most promising emulsion (50/50) was chosen and tested in multiple food matrices with different pHs, such as yogurt (pH 4.65), rice drink (pH 6.01), milk (pH 6.47) and soy drink (pH 7.92). These food matrices were observed visually and characterized by colorimetric analysis, then compared with the direct incorporation of the extract during storage (0, 3 and 7 days). Summarizing, the double emulsion incorporating the extract of *Sambucus nigra* L. and produced with the 50/50 ratio (primary emulsion/extern aqueous phase) showed to be capable of protecting the colorant in acid and basic media, confirming the interest of the proposed approach in the field of natural formulation colorants. Moreover an increased color uniformity as a function of pH was achieved.

**Keywords:** Natural colorants, *Sambucus nigra* L., stabilization to pH, double emulsions, food applications

---

## **MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS**

Os aditivos alimentares são importantes na melhoria das características organolépticas e na conservação do produto final, destacando-se a sua utilização na atratividade sensorial, visual e aroma. Porém, os consumidores estão cada vez mais exigentes em relação à alimentação. Desta forma, a indústria de alimentos está tendencialmente a adotar a utilização de aditivos de origem natural que sejam mais seguros, tornando prioritária a utilização de tecnologias que possibilitem a utilização de compostos bioativos nos alimentos.

A utilização destas tecnologias requer a realização de estudos do processo de proteção dos compostos de interesse, de forma a aumentar a sua estabilidade, tendo em vista a sua adição em matrizes alimentares. De entre os diversos corantes naturais existentes, os corantes baseados em antocianinas podem constituir uma alternativa viável, apresentando uma extensa gama de benefícios, nomeadamente associados às suas propriedades antioxidantes. No entanto, a sua incorporação em alimentos apresenta algumas limitações devido à sua sensibilidade ao pH, à luz e a temperaturas elevadas.

Neste contexto, o presente trabalho tem como o objetivo encapsular antocianinas em emulsões duplas de forma a aumentar a sua estabilidade possibilitando assim a incorporação em matrizes alimentares. Esta estratégia permite utilizar as antocianinas como corantes naturais que, para além de conferirem cor, apresentam também propriedades bioativas, nomeadamente antiinflamatórias e quimioprotetoras.

### **Objetivo Geral:**

O presente trabalho visa desenvolver um sistema de estabilização de um corante natural baseado em antocianinas através da preparação de emulsões duplas, com o objetivo de incrementar estabilidade deste em diferentes condições de pH. A solução desenvolvida será validada através da aplicação e testes numa matriz alimentar.

### **Objetivos Específicos:**

Tendo em vista o objetivo geral de aumentar a estabilidade de um corante natural baseado em antocianinas para aplicação numa matriz alimentar, o presente trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

---

Seleção de uma matriz vegetal para obtenção de um extrato natural rico em antocianinas com propriedades corantes;

- (i) Caracterização do extrato natural quanto à sua estabilidade ao pH;
- (ii) Definição do sistema químico para produção das emulsões e das condições de produção;
- (iii) Caracterização das emulsões produzidas;
- (iv) Testes de aplicação numa matriz alimentar. Adicionalmente, e tendo em vista a obtenção de um produto mais atrativo para as indústrias utilizadoras.

No presente trabalho, tanto a seleção da fonte do extrato corante, como o da matriz alimentar a testar é realizada de acordo com os objetivos do projeto Valor Natural, projeto no qual este trabalho se integra.

### **Estrutura da Dissertação**

O capítulo 1 refere-se à revisão bibliográfica abordando definições de interesse para o trabalho desenvolvido e análise da bibliografia relevante para o enquadramento dos temas necessários ao presente estudo.

O capítulo 2 refere-se à descrição das metodologias utilizadas para a produção das duplas emulsões, sua caracterização e posterior incorporação em matrizes alimentares.

O capítulo 3 centra-se na apresentação e discussão dos resultados obtidos.

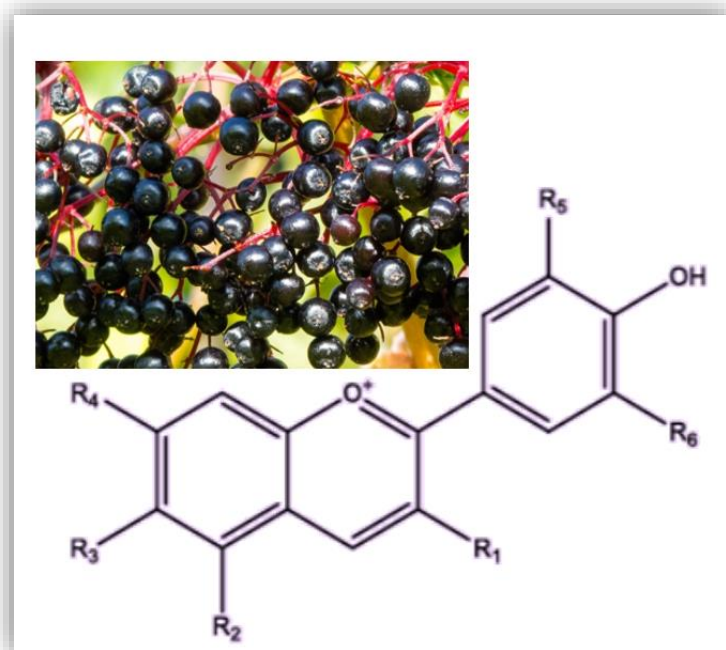
No capítulo 4 são apresentadas as considerações finais do presente trabalho, com o intuito de destacar as principais conclusões obtidas, desafios e trabalhos futuros.

O capítulo 5 reúne as referências bibliográficas utilizadas neste estudo.

O capítulo 6 refere-se aos apêndices.

*Capítulo 1*

# Revisão Bibliográfica





## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. ADITIVOS ALIMENTARES

Nas últimas décadas houve um grande aumento de consumidores que procuram um estilo de vida mais saudável, levando a transformações nos hábitos e nas indústrias alimentares. Esta alteração envolve a minimização do consumo de alimentos altamente processados e da consequente utilização de aditivos alimentares, o que tem estimulado o recurso a alternativas naturais seguras. A *Codex Alimentarius* define aditivo alimentar como qualquer substância adicionada para promover possíveis alterações, direta ou indiretamente, no alimento com um propósito tecnológico; porém, não é adicionada com o intuito de aumentar o valor nutritivo e sim a melhoria das características do produto final ou a sua manutenção ao longo do tempo, sem representar qualquer perigo para a saúde do consumidor. Os aditivos são utilizados na produção, transformação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento de alimentos, podendo ser classificados como antioxidantes, corantes, estabilizantes, aromatizantes, edulcorantes e conservantes (CODEX, 2018).

Os aditivos alimentares devem compreender uma função útil e aceitável ou um atributo para justificar seu uso, sendo expressamente proibida a sua utilização para adulterar os alimentos de forma a esconder os danos, deteriorações ou até mesmo as más práticas de manipulação no processamento do alimento (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2010).

#### 1.1.1. Corantes sintéticos

Os corantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria alimentar com o objetivo de melhorar a atratividade do produto final para consumidor. Este tipo de corantes apresenta muitas vantagens comparativamente com corantes naturais, pois possuem uma alta estabilidade em relação à luz, oxigênio e pH, apresentam uniformidade de coloração, pouca contaminação de microrganismos e a sua utilização apresenta um custo baixo para as indústrias (Sorita, 2018; Tang et al., 2014).

No entanto, a sua utilização tem que respeitar doses máximas, pois dependendo da quantidade consumida, alguns destes corantes podem ser convertidos em compostos nocivos para o corpo humano, como é o caso de alguns corantes do grupo azo. Um dos

efeitos mais conhecidos relaciona-se com a hiperatividade, distrações, desordens no sono e irritabilidade em crianças. O transtorno de déficit de hiperatividade (TDAH) é o mais comum, estando associado aos seguintes corantes alimentares sintéticos: tartazina (E102), amarelo crepúsculo (E110), amarelo de quinoleína (E104), carmosina (E122), escarlete brilhante 3R (E124) e vermelho 40 (E129) (Bento, Lima, & Paim, 2015; Martins et. al., 2016; Masone & Chanforan, 2015; Tang et al., 2014). Em relação à estrutura química, os corantes sintéticos apresentam ligações duplas alternando com ligações simples, estruturas de anéis aromáticos conjugados e/ou grupos funcionais azo (N=N) (Andrade et al., 2014; Bento, Lima, & Paim, 2015).

Na **Tabela 1** encontra-se alguns exemplos de corantes artificiais aplicados em alimentos, o seu respectivo código de classificação e a dose diária aceitável (DDA).

**Tabela 1.** Exemplos de corantes artificiais

Corantes Sintéticos			
Corante	Código E	DDA (mg/kg massa corporal)	Aplicações
Vermelho 40	E129	7.0	Refrigerante e carnes processadas
Carmosina	E122	4.0	Iogurtes, manjar branco, rolos suíços e geleias
Escarlete Brilhante 3R	E124	4.0	Bebidas não alcoólicas, doces e geleias
Amarelo Quinoleína	E104	10.0	Sumos de frutas e vegetais
Amarelo Crepúsculo	E110	2.5	Bebidas não alcoólicas, geleias e doces
Tartazina	E102	7.5	Bebidas não alcoólicas, doces e geleias

**FONTE:** Adaptado de Martins et al., (2016).

### 1.1.2. Corantes naturais: principais vantagens e problemas

Com base nos efeitos indesejáveis que alguns corantes sintéticos apresentam, há uma crescente procura dos consumidores em alternativas naturais que sejam seguras. Com base nesta procura, a indústria de alimentos procura cada vez mais utilizar também alternativas naturais como forma de resposta a essa exigência dos consumidores (Carocho, Morales, & Ferreira, 2015).

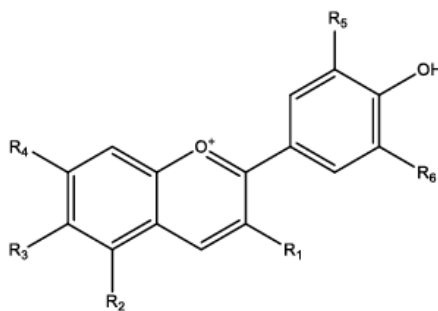
Os corantes naturais são extraídos de plantas, algas e insetos, representando um amplo espectro de cores disponíveis para aplicação na indústria alimentar. Como exemplo surgem os carotenoides que são aplicados em molhos, marinadas, misturas de especiarias, revestimentos, bebidas e leite. No caso das antocianinas, que são responsáveis pela coloração vermelha, roxa, azul e violeta, são aplicadas geralmente em refrigerantes, produtos de confeitaria e preparação de frutas (Carocho et al., 2015).

Os corantes naturais apresentam diversos benefícios. Além da coloração, possuem importantes bioatividades e efeitos benéficos para a saúde relacionados com a sua atividade antioxidante, efeitos anti-inflamatórios e prevenção de doenças crônicas (Vargas et al., 2017). Porém, apesar das vantagens apresentadas, a aplicação generalizada de corantes naturais é um grande desafio para a indústria alimentar. Alguns pigmentos naturais apresentam instabilidade, são mais caros devido ao baixo rendimento de produção comparativamente com os sintéticos e, além disso, a sua aplicação em alimentos pode requerer etapas adicionais de estabilização e/ou compatibilização (Rodríguez-Amaya, 2016).

## 1.2. CORANTE NATURAL: ANTOCIANINAS

### 1.2.1. Antocianinas

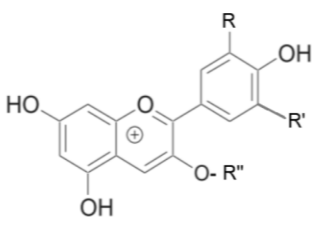
O termo antocianina tem origem grega (*anthos*, uma flor e *kyanos*, azul escuro). As antocianinas são flavonoides e, conseqüentemente, fazem parte de um dos maiores grupos de pigmentos vegetais solúveis em água. A estrutura química básica das antocianinas consiste numa estrutura policíclica de quinze carbonos, tal como é representado na **Figura 1** (Smeriglio et al., 2016).



**Figura 1.** Estrutura geral das antocianinas.

**FONTE:** Delgado-Vargas et al., (2000).

As antocianinas são solúveis em água, formadas nos tecidos das plantas e dissolvidas no fluido da célula vegetal, que comumente apresenta pH levemente ácido. As antocianinas frequentemente encontradas em frutos são: pelargonidina (morangos), cianidina (morangos, amoras, ameixas e jambolão), delphinidina (berinjelas), peonidina (cerejas, jabuticabas, uvas e ameixas), petunidina (cebola roxa) e malvidina (uvas) todas na forma glicosíadas (**Figura 2**). A diferença entre as várias antocianinas está no número de grupos hidroxilo da molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações (Brotto, Terci, & Rossi, 2002; Henrique & Jesus, 2008; Santin, 2006).

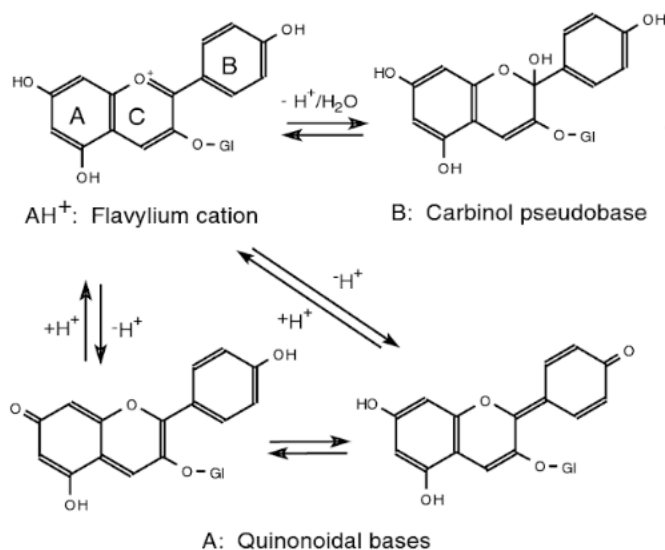
	Antocianina	Grupo R	Grupo R'	Grupo R''
	Cianidina 3-glicosídeo	OH	H	Glicose
	Delfinidina 3-glicosídeo	OH	OH	Glicose
	Pelargonidina 3-glicosídeo	H	H	Glicose
	Malvidina 3-glicosídeo	OCH3	OCH3	Glicose
	Peonidina 3-glicosídeo	OCH3	H	Glicose

**Figura 2.** Estruturas e nomes das principais antocianinas.

**FONTE:** Rossi & Shimamoto (2010).

As antocianinas são caracterizadas por proporcionar diferentes cores, porém, devido à sua natureza reativa, a sua estabilidade é comprometida principalmente devido à variação das condições de pH, temperatura, humidade relativa, concentração, luminosidade, presença de compostos químicos e enzimas, dióxido de enxofre ou sulfitos e iões metálicos. Estes fatores aceleram o seu processo de degradação, principalmente a temperaturas elevadas (Smeriglio et al., 2016).

No caso do pH, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam uma coloração intensamente avermelhada correspondendo ao predomínio do catião flavílico ( $AH^+$ ). A partir do momento em que o pH aumenta, o catião flavílico pode transformar-se em duas outras formas químicas, conhecidas como base quinoidal (A), de cor azul ou vermelha, e pseudobase carbinol (B). Conforme o pH aumenta, a concentração de B aumenta também, tornando a solução incolor (Sikorski, 2006). O conjunto de reações envolvidas é exemplificado na **Figura 3**.



**Figura 3.** Transformação do cátion flavílico.  
**FONTE:** Adaptade de Z. E. Sikorski (2006).

As antocianinas apresentam propriedades edulcorantes e bioativas. A sua estrutura apresenta grupos responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes associadas à capacidade de eliminação de radicais livres, o que tem sido relacionado com a prevenção de doenças crónicas, nomeadamente Doença de Parkison (Flanigan & Niemeyer, 2014). As antocianinas são encontradas por exemplo em morangos, bagas de sabugueiro, mirtilos, uvas, framboesas, cerejas e groselhas (Henrique & Jesus, 2008).

### 1.2.2. *Sambucus nigra* L.

*Sambucus nigra* L. (Sabugueiro niger) é uma espécie encontrada na Europa e em regiões de clima moderado, como África e Ásia Ocidental e Central. É uma planta ramificada, apresentando uma copa globulosa que pode alcançar sete metros de altura. A sua floração ocorre no início do verão, com pequenas flores brancas, e do final do verão ao início do outono forma-se o fruto, que se expõe em forma de bagas pretas brilhantes (**Figura 4**). Entre as 25 espécies do género *Sambucus*, *S. nigra* é a única considerada comestível (R. F. R. Silva, 2017).



**Figura 4.** Frutos de *Sambucus nigra* L.

**FONTE:** Flickr (2018).

O poder corante das bagas de sabugueiro e a sua atividade antioxidante já estão cientificamente validadas, tendo sido identificada a viabilidade da utilização do sumo para fins de industrialização. A sua produção é de baixo custo, além de que o bagaço obtido após a extração do sumo apresenta compostos bioativos que podem ser extraídos para diversas aplicações (R. F. R. Silva, 2017). As bagas de sabugueiro apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antivirais e pró-imunológicas (Pliszka, 2017). Apresentam a capacidade de melhorar a resposta do sistema imunológico através da produção elevada de citocinas e têm sido usadas na medicina popular europeia para evitar constipações, asma e artrite (David et al., 2014). Além disso, a farinha de sabugueiro é uma fonte de  $\alpha$ -tocoferol ( $0,49 \mu\text{g/g}$  de óleo), assim como  $\gamma$ -tocoferol ( $2,63 \mu\text{g/g}$ ), responsáveis pelo seu potencial antioxidante (Młynarczyk, Walkowiak-Tomczak, & Łysiak, 2018).

O sabugueiro niger contém substâncias de um glucósido cianogénico, a sambunigrina, que é considerada altamente tóxica devido à sua decomposição em cianeto de hidrogénio que é quimicamente reativo. A ingestão dos frutos verdes e de outras partes da planta (folhas, casca e sementes) pode causar distúrbios gastrointestinais, como náuseas, vômitos, fraqueza e tonturas. Porém, o processamento térmico diminui significativamente os níveis desses compostos, dado que estes se decompõem quando submetidos ao calor (Mladěnka et al., 2016; Senica et al., 2016).

As antocianinas são o grupo predominante nas bagas de sabugueiro. São uma boa opção para a coloração de alimentos, dado que têm boa estabilidade a pH baixo, permite equacionar a sua aplicação em bebidas, conservas, gelados, compotas e geleias, molhos e produtos de confeitaria (R. F. R. Silva, 2017). Devido ao seu potencial corante, é possível desta forma promover a substituição de corantes sintéticos pelo extrato do sabugueiro niger, tendo como vantagem adicional o aumento da segurança alimentar do consumidor, levando em consideração o potencial de toxicidade de alguns dos compostos artificiais (Młynarczyk et al., 2018).

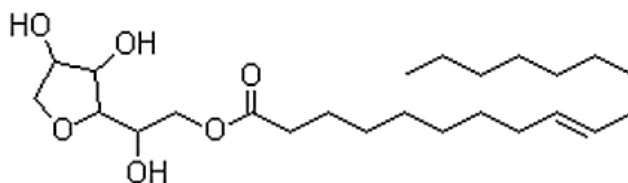
### 1.3. EMULSÕES SIMPLES E MÚLTIPLAS

Uma emulsão é uma dispersão coloidal de gotículas de um líquido num segundo líquido imiscível, geralmente óleo e água. Normalmente o diâmetro médio das gotículas nos sistemas alimentares varia entre 100 nm e 100 µm, dependendo do sistema químico e do processo de preparação utilizados estes valores podem ser superiores ou inferiores. Um sistema que consiste em gotículas de água dispersas em uma fase de óleo é chamado de emulsão água-em-óleo (A/O) enquanto que e um sistema de gotículas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado de óleo-em-água (O/A). A substância que compõe as gotículas de uma emulsão é chamada de fase dispersa, enquanto a substância que compõe o líquido circundante é chamada de fase contínua (D.J. McClements, Decker, & Weiss, 2007). A estabilidade da emulsão é incrementada através da adição de agentes emulsionantes. Estes agentes atuam na interface das gotículas formadas reduzindo a tensão interfacial resultando na estabilização da fase dispersa. As emulsões são consideradas como sistemas termodinamicamente instáveis, o que indica ser necessário fornecer energia externa, normalmente na forma de agitação mecânica para a sua produção (D.J. McClements et al., 2007).

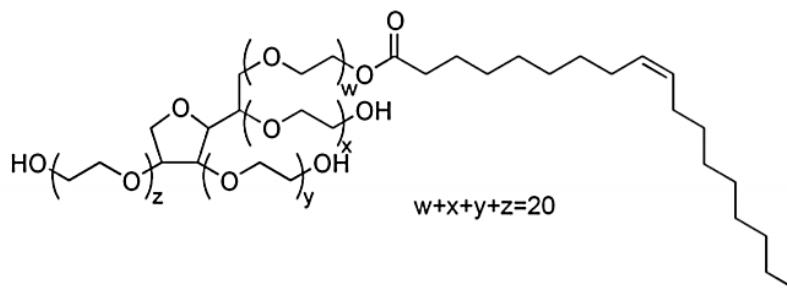
Os emulsionantes são moléculas ativas adsorvidas na interface das gotículas recém-formadas durante a homogeneização, formando uma camada protetora que impede a agregação destas. A escolha do emulsionante mais apropriado é um dos fatores mais importantes dado que determina o tempo de prateleira e as propriedades físico-químicas de sistemas baseados em emulsões (D.J. McClements et al., 2007).

De entre os vários emulsionantes existentes, o Span 80 (Monooleato de sorbitano) (**Figura 5**) e o Tween 80 (Monooleato de polioxietileno sorbitano) (**Figura 6**) são amplamente utilizados em alimentos e na indústria farmacêutica devido à sua baixa

toxicidade (Kopanichuk et al., 2018). O Span 80 é um tensoativo hidrofóbico, ou seja, possui afinidade principalmente com o óleo, sendo adequado para estabilizar emulsões A/O. O Tween 80 é um emulsionante hidrofílico, adequado para produzir emulsões O/A (Zuge, 2012). Os emulsionantes não iônicos são caracterizados através do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL).

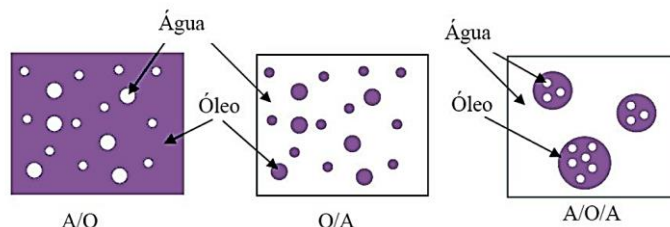


**Figura 5.** Estrutura do Span 80.  
**FONTE:** Zuge (2012).



**Figura 6.** Estrutura do Tween 80.  
**FONTE:** Zuge (2012).

Além das emulsões simples, é possível preparar emulsões duplas do tipo A/O/A ou O/A/O (**Figura 7**) (Santos, 2011). A emulsão dupla é chamada também de emulsão múltipla, e consiste num sistema de dispersão complexo, em que a primeira emulsão é dispersa novamente numa fase imiscível (Zhang & Reineccius, 2016).



**Figura 7.** Emulsões simples e múltiplas.  
**FONTE:** Santos (2011).

As emulsões múltiplas possuem alto potencial para aplicação em alimentos, dado que a aplicação frequentemente de corantes, minerais, probióticos, antioxidantes, vitaminas, torna o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada interessantes.

Estes permitem a modulação de aromas e sabores indesejáveis, produção de alimentos com baixo conteúdo calórico-lipídico, transporte e liberação de componentes, garantindo a proteção dos componentes da oxidação e da ação de certas enzimas (J. B. Pereira & Garcia-Rojas, 2015). Na **Tabela 2** descrevem-se resumidamente algumas das aplicações industriais das emulsões.

**Tabela 2.** Aplicações industriais das emulsões.

<b>Indústria</b>	<b>Aplicações</b>
Alimentos	Maionese, sorvetes, bebidas, molhos, encapsulamento de corantes e aromas.
Cosméticos	Creme hidratante, <i>spray</i> para cabelos, protetor solar.
Farmacêuticos	Preparação de microcápsulas, associação de fármacos incompatíveis, imobilização de enzimas.
Tintas	Emulsões de resinas e emulsão de látex
Dispersantes para Manchas de óleo	Controle de poluição

**FONTE:** Zanatta. (2014).

O objetivo principal das emulsões múltiplas é o de garantir a estabilidade dos compostos instáveis. Os problemas de estabilização em emulsões para aplicação alimentar não podem ser melhorados através do aumento da concentração do agente emulsionante, como nas emulsões farmacêuticas e cosméticas, pelo fato de que há limitações em relação à ingestão diária destes (Nikolovski et al., 2016).

Na **Tabela 3** referem-se alguns estudos que utilizaram o processo de dupla emulsão na encapsulação de compostos bioativos. Herzi et. al. (2014) prepararam uma dupla emulsão A/O/A utilizando um procedimento de emulsificação em duas etapas, onde o tamanho final da gota resultante depende da taxa de cisalhamento aplicada, da tensão superficial e da razão de viscosidade entre as fases dispersa e contínua. Na primeira etapa foi utilizada uma célula de Couette de espaçamento de 200  $\mu\text{m}$  e uma taxa de cisalhamento de 2600  $\text{s}^{-1}$ . A primeira emulsão foi dispersa em Miglyol e quando necessário adicionou-se PGPR - polirricinoleato de poliglicerol (emulsionante). Para a dupla emulsão A/O/A utilizou-se novamente a célula de Couette com espaçamento de 100  $\mu\text{m}$  e uma taxa de cisalhamento de 6300 e 14500  $\text{s}^{-1}$ . Como resultado obtiveram-se

diâmetros aproximados de 1,5  $\mu\text{m}$  na primeira emulsão e inferiores a 10  $\mu\text{m}$  na segunda emulsão.

No trabalho de Hosseini et al. (2013), verificou –se que a concentração de óleo essencial tem influência significativa na eficiência de encapsulação e no tamanho das micropartículas. Na primeira etapa da emulsificação foi utilizado óleo essencial, alginato de sódio (contendo 1% de Tween 80 (m/v)), tendo-se homogeneizado com uma velocidade de 13500 rpm por 5 min com Ultra Turrax. Na segunda etapa, para a formação da emulsão A/O/A, foram utilizados 20 ml da primeira que foram dispersos em 30 mL óleo de girassol contendo 1% (v/v) de Span 80. Utilizou-se um ultra Turrax a 10000 rpm por 3 minutos. Foram obtidos resultados de liberação de óleo essencial das micropartículas aceitável, de acordo com a difusão Fickiana, e as gotículas produzidas tinham diâmetros entre 47-117  $\mu\text{m}$ .

Akhtar, Afeisume, & Khew (2014) utilizaram a tecnologia de emulsão dupla com um reator de disco giratório, visando obter flavonoides com um tempo de prateleira superior, aumentando assim sua disponibilidade para absorção pelo organismo. Verificaram que utilizando a tecnologia baseada no reator de disco giratório, no segundo estágio da emulsificação as gotas da emulsão primária não se agregavam. Na primeira etapa foram combinados 195mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a (0,2M) com 305mL de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (0,2M) em óleo de girassol (20 v/v) a 50°C, utilizando um homogeneizador de alta pressão a 300 bar. Para produzir a emulsão A/O/A utilizou-se o disco giratório por 5 min a 2000 rpm/7 mL.s<sup>-1</sup> obtendo-se gotículas de aproximadamente 21-26  $\mu\text{m}$ . Após 10 dias foram feitas análises da eficiência de encapsulação tendo-se verificado valores de 80±2 e 72±4%, relativamente aos valores originais. Tal pode ter sido motivado pela perda de algum flavonoide para a fase aquosa da emulsão primária durante o segundo passo de emulsificação. Akhtar et al. (2014), relatam a utilização do reator de disco giratório origina perdas baixas em comparação com outros métodos de homogeneização.

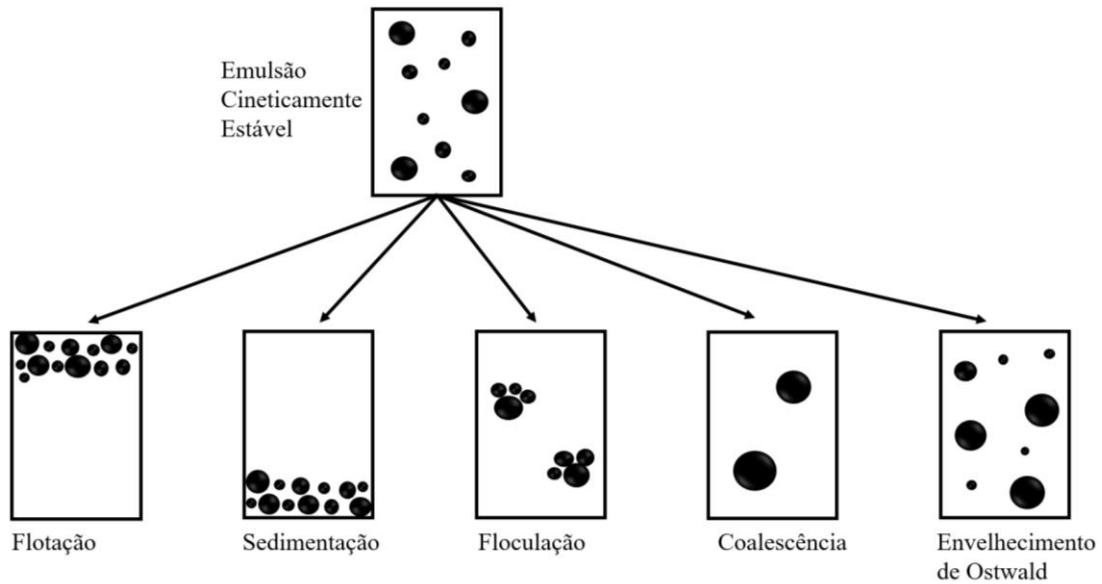
**Tabela 3.** Aplicações de dupla emulsão no encapsulamento de compostos bioativos.

Tipo	Encapsulado	Emulsionantes	Fase óleo	Equipamento e condição operacional	Referência
A/O/ A	Mg <sup>+2</sup>	PGPR (lipofílico) Caseinato de sódio (hidrofílico)	Miglyol	Etapa 1 (Emulsão primária (A/O): Célula de Couette - gap: 200 µm taxa de agitação: 2600 s <sup>-1</sup> .  Etapa 2 (Emulsão múltipla A/O/A) Célula de Couette - gap: 100 µm taxa de agitação: 6300 s <sup>-1</sup> a 14500 s <sup>-1</sup> .	Herzi et al., (2014).
A/O/ A	Óleo essencial de <i>Satureja hortensis</i>	Tween 80 (hidrofílico) Span 80 (lipofílico)	Óleo essencial de <i>Satureja hortensis</i> Óleo de girassol	Etapa 1 (Emulsão primária O/A) Homogeneizador Ultra Turrax taxa de agitação: 13500 rpm/5 min.  Etapa 2 (Emulsão múltipla O/A/O) Homogeneizador Ultra Turrax taxa de agitação: 10000 rpm/3 min.	Hosseini et al., (2013).
A/O/ A	Flavonoides (Quercetina e Antocianina)	Arlacel P135 Citrol PGPR* (lipofílicos) Sinperonic PE/F127 Brij 78 (hidrofílicos)	Óleo de Girassol	Etapa 1 (Emulsão primária A/O) Homogeneizador de alta pressão (300 bar).  Etapa 2 (Emulsão múltipla A/O/A) Agitação suave por 5 min; Reator de disco giratório taxa de agitação: 2000 rpm/7 mL.s <sup>-1</sup> .	Akhtar et al., (2014).

\*polirricinolato de poliglicerol (emulsificante extraído do óleo de mamona)

### 1.3.1. Principais problemas: processo que conduzem à instabilidade de uma emulsão

Os processos que conduzem a instabilidade de uma emulsão são os seguintes (**Figura 8**): coalescência, cremação/flotação, sedimentação, floculação e envelhecimento de Ostwald.



**Figura 8.** Processos que conduzem à instabilidade de uma emulsão.  
**FONTE:** Adaptado de McClements et al. (2007).

A coalescência ocorre quando uma gota da fase dispersa entra em contato com a interface A/O externa. A coalescência é a ruptura dos filmes de emulsão entre pelo menos duas gotas vizinhas o que possibilita a união entre elas, resultando em uma gota maior. Para concentrações elevadas de emulsionante, esta região de óleo/surfactante é composta de múltiplas camadas de moléculas de surfactante; o que significa que a sua espessura está relacionada com a concentração de surfactante (Lawson & Papadopoulos, 2004).

A cremação/flotação corresponde à separação gravitacional das gotas, que se movem para “cima” dado terem uma densidade inferior à da fase contínua. Este fenómeno é dependente das características do sistema, como por exemplo, da viscosidade da fase contínua (Almeida, 2012). A sedimentação corresponde ao processo oposto da cremação, havendo também separação gravitacional, porém as gotas depositam-se na base do reservatório dado que possuem uma densidade superior à da fase contínua (Almeida, 2012). A floculação ocorre quando duas ou mais gotas se aproximam e formam um agregado, mantendo a sua integridade individual. Esse processo ocorre quando as forças de atração de van der Waals excedem as forças repulsivas do sistema. Este é um processo reversível, podendo ser revertido mediante fornecimento de energia (Almeida, 2012; McClements, 2007a). O envelhecimento de Ostwald ocorre quando as gotículas menores se solubilizam e aderem-se as gotículas maiores durante o armazenamento, esse fenómeno é associado quando a solubilidade do óleo é abundante (Almeida, 2012; McClements, 2007a).

## 1.3.2. Principais soluções: método de estabilização

Com o objetivo de estabilidade cinética das emulsões duplas, a elaboração é realizada em duas etapas. Sendo necessário a utilização de dois emulsificantes, um hidrofílico e outro lipofílico. Essas etapas contribuem para a obtenção de sistemas com distribuição de tamanho de partículas mais homogênea, dessa forma, mais estável. No caso da elaboração de emulsão múltipla A/O/A, forma-se, na primeira etapa, uma emulsão primária, do tipo A/O, sobre homogeneização intensa (alta pressão ou alta velocidade de agitação) e utilização de um emulsificante lipofílico. Na segunda etapa, resulta a homogeneização da emulsão primária A/O com outra fase aquosa, por meio de homogeneização com menor velocidade de agitação e utilização de um emulsificante hidrofílico. A aplicação de processos de homogeneização mais suaves, na segunda etapa, evita o cisalhamento das gotículas (J. B. Pereira & Garcia-Rojas, 2015).

A estabilização dos corantes naturais requer a aplicação de processos específicos, sendo estes desenvolvidos de acordo com as propriedades das substâncias a estabilizar, mas também de acordo com as características da aplicação a que se destinam. Na **Tabela 4** são descritos alguns métodos de estabilização já estudados e documentados na literatura.

**Tabela 4.** Aplicações industriais das emulsões.

Técnica utilizada	Matéria- prima	Agente de encapsulamento	Referências
<i>Spray drying</i>	Extrato de frutos de baga de andes	Maltodextrina, goma arábica, amido de milho, amido de mandioca	Villacrez et al. (2014)
Fase dispersa de óleo – <i>spray drying</i>	Extrato de frutas de faia-da-terra	Etil celulose	Zheng et al. (2011).
<i>Spray drying</i>	Suco de fruta de faia-da-terra	Maltodextrina	Fang & Bhandari (2011).
<i>Spray drying</i>	Suco de fruta de faia-da-terra	Isolado de proteína de soro de leite ou maltodextrina	Fang & Bhandari (2012).
Emulsão	Extrato de frutas de mirtilo	Isolado de proteína de soro de leite	Betz et al. (2012).
Emulsão dupla (A/O/A)	Extrato de frutas de mirtilo	Pectina (cloreto de cálcio), PGPR	Frank et al. (2012).
(a) Extrusão; (b) emulsificação/geleificação por calor;	Extrato de bagaço de mirtilo	(a) Pectina amidada, (b) isado de proteína de soro de leite;	Baum et al. (2014).

(c) <i>spray drying</i>		(c) Maltodextrina + pectina	
(a) Emulsificação/geleificação por calor; (b) extrusão	Extrato de bagaço de mirtilo	(a) Pectina amidada, (b) isado de proteína de soro de leite;	Kropat et al. (2013).
Liofilização	Suco de uva	Maltodextrina + goma arábica	Gurak et al. (2013).
<i>Spray drying</i>	Extrato de casca de jabuticaba	Maltodextrina, goma arábica + maltodextrina ou Capsul™ +maltodextrina	Silva et al. (2013).

De acordo com Sorita (2018), a escolha da técnica adequada depende das características do material ativo, da aplicação pretendida e do tipo de liberação desejada para a sua ação, sendo necessário a análise de como o material é formado/colocado para proteger o princípio ativo. Por exemplo, a técnica de homogeneização a alta pressão é uma técnica de dispersão eficaz, porém pode envolver consumos de energia elevados. Em contrapartida a técnica de inversão de fases é uma técnica de baixo consumo de energia, no entanto as incorporações de moléculas adicionais influenciam o fenômeno de inversão e podem causar a instabilidade da emulsão.

Mahdavi et al. (2014) relataram que a técnica de encapsulação por *spray drying* possui algumas vantagens como o baixo custo de processo, eficiência no encapsulamento, boa estabilidade do produto final e possibilidade de produção em larga escala e em um modo contínuo. A liofilização é vantajosa para substâncias sensíveis à temperatura e que são instáveis em soluções aquosas, podendo aumentar a sua eficiência se forem encapsuladas por esta técnica. Porém requer um tempo longo de processo e o custo é geralmente elevado.

*Capítulo 2*  
**Materiais e Métodos**





## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. PADRÕES E REAGENTES

Utilizou-se os frutos de *Sambucus nigra* L. cedidos pelo Centro de Investigação de Montanha (CIMO). Para a realização da emulsão múltipla, selecionou-se como fase óleo o óleo de milho adquirido no mercado do comércio local de Bragança - Portugal.

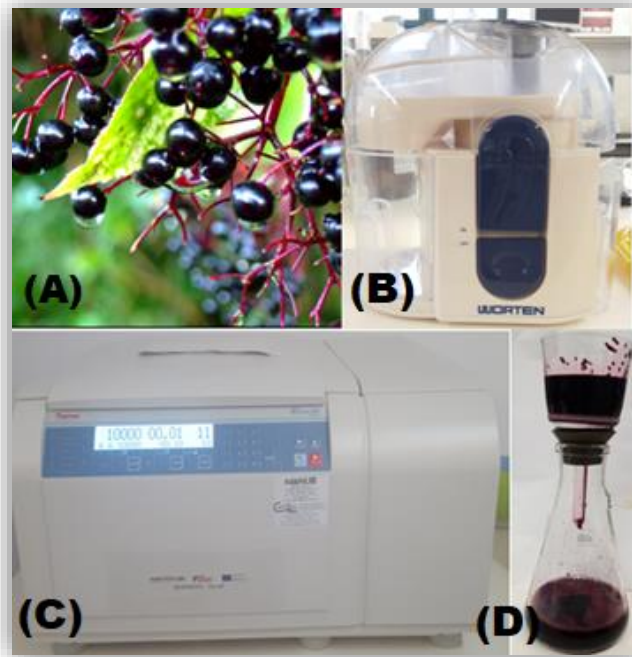
No estudo de definição do processo base de produção das emulsões foram utilizados vários emulsionantes, incluindo o Tween 80 (100% de pureza, Panreac Química S.L.U, Darmstadt, Alemanha ) com BHL de 15; o Span 80 (100% de pureza, Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemanha) com BHL de 1,8. Adicionalmente, o polirricinoleato de poliglicerol (PGPR, BHL de 1,5) (Palsgaard, Juelsminde, Dinamarca) foi utilizado na formação da emulsão primária (A/O). Para aumentar a viscosidade da fase externa da dupla emulsão (A/O/A), utilizou-se como coloide protetor a Goma Arábica (Fisher Scientific UK, Loughborough, Inglaterra).

Para os testes preliminares de avaliação de cor utilizaram-se tampões utilizando para o pH 4: Hidrogenoftalato de potássio (100% de pureza, EMSURE®, Darmstadt, Alemanha) e ácido clorídrico (100% de pureza, Sigma – Aldrich, Steinheim, Alemanha); pH 5: Hidrogenoftalato de potássio e hidróxido de potássio (85% de pureza, Panreac Química S.L.U, Darmstadt, Alemanha); pH 6, 7 e 8: Dihidrogenofosfato de potássio (99% de pureza, Panreac Química S.L.U, Barcelona, Espanha) e hidróxido de potássio e para o pH 9: tetraborato de sódio (100% de pureza, Scharlab, S.L., Barcelona, Espanha) e ácido clorídrico. Como matrizes alimentares de teste foram selecionadas bebidas lácteas e vegetais com diferentes pHs: leite (pH 6,47), bebida de soja (pH 7,92) e arroz (pH 6,01) e iogurte natural com 0% de matéria gorda (pH 4,65), estes adquiridos no comércio local de Bragança – Portugal.

O acetonitrilo, com pureza 99,9% e grau HPLC, foi adquirido na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). O ácido sulfúrico, tolueno, metanol, etanol, éter etílico, éter de petróleo e os restantes reagentes químicos de grau analítico foram obtidos a partir de fontes comuns. A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (referência 47885-U) e os padrões de açúcares foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA).

## 2.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Sambucus nigra* L.

As etapas para a obtenção do extrato *Sambucus nigra* L. encontram-se representadas na **Figura 9**. O procedimento compreendeu a trituração do fruto (A) para a obtenção do sumo a partir de um juicer da marca Worten (B). Posteriormente, este foi centrifugado (C) a 10000 rpm, durante 10 minutos a 10°C e filtrado sob vácuo (D), sendo posteriormente seco por *spray dryer* (Mini Spray Dryer B-290 Büchi, Flawil, Suíça) e guardado em recipientes fechados em temperatura de refrigeração para posterior utilização. As condições de secagem foram as seguintes: temperatura de entrada: 130°C; aspiração: 90%, fluxo de ar (667 L/h); fluxo da bomba: 12 ml/min.



**Figura 9.** (A) Fruto de *Sambucus nigra* L.; (B) Juicer; (C) Centrifugadora; (D) Extrato sendo filtrado.

## 2.3. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE *Sambucus nigra* L.

### 2.3.1. Avaliação da cor em função do pH

Para avaliação da cor em função do pH, o corante foi dissolvido na concentração de 2g/L em soluções tampão de diferentes pH (pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) e analisado por espectroscopia de ultravioleta- visível (UV-VIS) na gama de 400 a 800 nm. O

equipamento utilizado foi um espectrómetro modelo Jasco V-730 UV- Visible Spectrophotometer (Tokyo, Japan).

### 2.3.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada num equipamento NETZSCH modelo TG 209 F3 Tarsus (Selb, Alemanha) sob atmosfera inerte (azoto). Para o efeito, o extrato de *Sambucus nigra* L. foi colocado num cadinho de alumina e sujeito a um aquecimento na gama de temperaturas de 30 a 700°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. O termograma foi obtido com o *software* Netzsch Proteus – Thermal Analysis, versão 5.2.1.

### 2.3.3. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O extrato de *Sambucus nigra* L. foi analisado por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um equipamento MB300 (ABB, Zurique, Suíça) em transmissão usando pastilhas de KBr. Utilizaram-se os seguintes parâmetros: 32 scans/min, resolução de 16 cm<sup>-1</sup> e uma gama de leitura de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram obtidos com o *software* Horizon MB versão 3.4.

## 2.4. PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES

Neste trabalho foram produzidas emulsões duplas do tipo água/óleo/água (A/O/A) como novos sistemas corantes baseados no extrato de *Sambucus nigra* L. O procedimento geral consistiu em duas etapas: (i) preparação da emulsão primária A/O seguida da dispersão desta em água para formar a emulsão dupla A/O/A. Seguidamente será apresentado o procedimento adotado em cada uma das etapas.

### 2.4.1. Preparação da emulsão primária A/O

Para a preparação da emulsão primária A/O, o extrato de *Sambucus nigra* L. foi dissolvido em água numa concentração de 55 g/L (concentração máxima, baseada em testes de dissolução preliminares). Seguidamente, esta fase foi dispersa na fase óleo (óleo de milho) sob agitação constante por um período de tempo determinado. Para o efeito foram testados diferentes sistemas de agitação, nomeadamente o sistema de Ultra-Turrax

(modelo Unidrive X1000 Homogeneizer Drive da CAT Scientific, Staufen, Germany) e o homogeneizador de alta pressão (HAP) (modelo High- Pressure Homogenizer EmulsiFlex- C3, Ottawa, Canada). Numa primeira etapa o Ultra-Turrax foi utilizado para preparar uma pré-emulsão, seguida de redução de tamanho no sistema de HAP (6 ciclos). Numa segunda fase, e de forma a simplificar o processo, testou-se a preparação utilizando apenas o sistema Ultra-Turrax. No primeiro caso utilizou-se como emulsionante o Span 80 e no segundo comparou-se o Span 80 com uma mistura de Span 80/Tween 80 e com o PGPR. O **Apêndice A** lista as condições testadas para a preparação da emulsão primária cuja conformidade foi validada por teste preliminar na produção da emulsão dupla e o **Apêndice B** mostra visualmente alguns destes testes. As condições de preparação definidas e que foram utilizadas para o estudo da definição das condições de preparação da emulsão dupla, consistiram na utilização de uma razão A/O de 40/60, PGPR como emulsionante (colocado numa concentração de 5% (m/m; base óleo)). As condições de agitação compreenderam a utilização do Ultra-Turrax a 20000 rpm durante 5 minutos.

#### 2.4.2. Preparação da emulsão dupla A/O/A

Uma vez selecionadas as condições de preparação da emulsão primária passou-se à definição das condições da preparação da emulsão dupla. Para o efeito iniciou-se o estudo com o teste da utilização de Tween 80 seguido de Tween 80 combinado com Goma Arábica. A Goma Arábica funciona como coloide protetor, isto é, atua na estabilização das emulsões por aumento da viscosidade da fase externa. No primeiro caso foram testadas diferentes velocidades e tempos de agitação e no segundo caso a fixou-se a agitação em 6000 rpm durante 2 min. O sistema de agitação utilizado foi o Ultra-Turrax. As condições utilizadas neste estudo podem ser consultadas no **Apêndice A**.

Uma vez estabelecidas as condições de preparação, foi realizado um estudo sistemático compreendendo as seguintes razões emulsão primária/água: 20/80, 30/70; 40/60 e 50/50. A preparação destas emulsões compreendeu a preparação da emulsão primária conforme descrito no ponto anterior, seguida da sua dispersão em água utilizando 6000 rpm durante 2 min. O sistema emulsionante utilizado compreendeu 3% de Tween 80 (base emulsão total) e 15% Goma Arábica (base fase aquosa externa).

## 2.5. CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

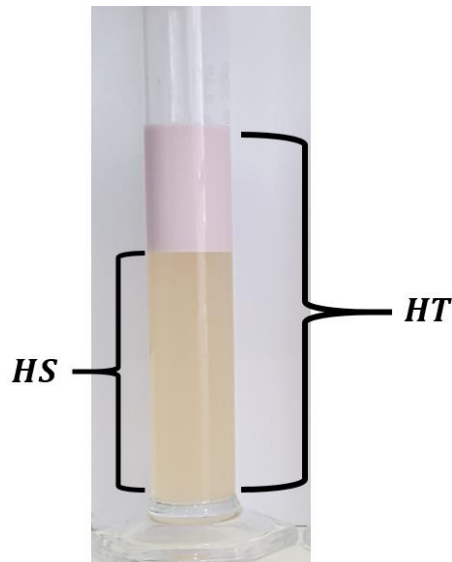
### 2.5.1. Microscopia de ótica (MOP)

As emulsões preparadas foram analisadas por microscopia ótica utilizando um microscópio Nikon Eclipse 50i (Kawasaki, Japan), equipado com uma câmara Nikon Digital Sighth (software: NIS-Elements Documentation) para aquisição de imagem e tratamento de resultados. Esta técnica foi posteriormente utilizada para monitorizar a evolução da morfologia e tamanho de gotícula das emulsões ao longo do tempo de forma a visualizar fenómenos de desestabilização (por exemplo, coalescência e floculação). Esta análise foi feita utilizando a fase “*creaming*” da emulsão, conforme descrito no ponto seguinte.

### 2.5.2. Determinação do “*creaming index*”

Adicionalmente à avaliação microscópica das emulsões, a avaliação da estabilidade das emulsões preparadas seguiu a metodologia descrita por Nikolovski et al. (2016) com adaptações. Resumindo, as emulsões após preparação foram transferidas para provetas graduadas de 50 mL que foram vedadas para evitar a evaporação e armazenadas à temperatura ambiente. Durante o armazenamento as emulsões que apresentaram instabilidade mostraram o surgimento de uma fase designada por sérum (fase aquosa no fundo das provetas), tal como mostrado na **Figura 10**. O “*creaming index*” (CI), que pode ser usado para quantificar a instabilidade das emulsões é definido como a razão, expressa em percentagem, entre a altura da camada de sérum (HS) e a altura total (HT), tal como descrito na **Equação (1)**. Esta avaliação foi realizada por determinação do CI para tempos determinados (tempo 0, 6, 11, 19 e 26 dias).

$$CI (\%) = \frac{HS}{HT} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$



**Figura 10.** Avaliação da estabilidade das emulsões (altura da camada de s rum (HS) e a altura total (HT)).

## 2.6. TESTES DE APLICA O

Os testes de aplica o tiveram dois níveis de desenvolvimento. Numa primeira fase testaram-se todas as emulsões duplas preparadas (razões emulsão primária/água (v/v) de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50) definindo como meio de teste tampões numa gama de pH compreendida entre 4 e 9. Posteriormente realizaram-se testes de aplica o em matrizes alimentares reais de diferente pH, apenas utilizando a emulsão dupla mais promissora (50/50). Os testes realizados compreenderam a avalia o da cor (nos dois casos estudados) e a avalia o do impacto no valor nutricional apenas no caso da utiliza o em matrizes alimentares.

### 2.6.1. Testes de aplica o utilizando tampões na gama 4-9

De forma a avaliar a estabilidade da cor das emulsões produzidas em fun o do pH, estas foram testadas utilizando tampões com pH compreendido entre 4-9. Para o efeito 1,4 mL da emulsão dupla foram adicionados a 18,6 mL do tampão, afim de incorporar 7% da soluço corante desenvolvida. Após mistura, a soluço foi homogeneizada com ajuda de um Vortex (Biosan, modelo V-1 plus, Riga, Latvia). A colora o foi avaliada para tempos determinados (t0, t1, t6, t13, t20 e t26). Como branco foi utilizada a soluço tampão respetiva.

### 2.6.2. Testes de aplicação em matriz alimentar

Para os testes de aplicação numa matriz alimentar selecionou-se a emulsão dupla que revelou maior estabilidade e maior poder corante (50/50). Para o efeito selecionaram-se diferentes bebidas lácteas e vegetais de forma a cobrir uma gama de pHs diferentes. Os alimentos (Bebida biológica de arroz (pH 6,01); Bebida biológica soja (pH 7,92); leite (pH 6,47); iogurte líquido natural (pH 4,65)) foram adquiridos num mercado local da cidade de Bragança – Portugal.

As matrizes alimentares foram adicionadas com a emulsão dupla selecionada (50/50) e diretamente com o extrato de *Sambucus nigra* L., para efeitos de controlo. Como branco utilizou-se o alimento sem qualquer adição. A concentração de corante de *Sambucus nigra* L. foi de 4g/L para ambos os testes realizados (adição direta de corante ou emulsão corante). A cor foi medida com o colorímetro no tempo 0, 3 e 7 dias após preparação de acordo com a metodologia descrita em 2.7.2. Utilizaram-se duas temperaturas de teste (temperatura 23°C (ambiente) e 5°C (refrigeração)). Previamente à adição do agente corante foi determinado o pH dos alimentos. O impacto da utilização da emulsão dupla produzida como agente corante no valor nutricional dos alimentos testados foi avaliada quanto a sua alteração no perfil nutricional do produto final de acordo com as metodologias descritas na secção 2.7.4.

## 2.7. CARACTERIZAÇÃO UTILIZADAS NOS TESTES DE APLICAÇÃO

### 2.7.1. Determinação do pH

O pH dos tampões e alimentos foi aferido utilizando um medidor de pH ( modelo: pH Meter InoLab pH 720, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim, Germany), com introdução da sonda diretamente no alimento. Para a realização da medição a sonda foi introduzida diretamente no tampão ou alimento.

### 2.7.2. Determinação da cor

A avaliação da cor foi realizada através de um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Japão) (**Figura 11**), equipamento projetado para medir e avaliar a cor. Utilizou-se 8 mm de abertura do diafragma para obter os valores de L\*, a\*

e  $b^*$ , onde, valores de  $L^*$  indicam a luminosidade e variam de 100 a 400; a coordenada  $a^*$  indica variação do verde ( $-a^*$ ) a vermelho ( $+a^*$ ) e a coordenada  $b^*$  indica a variação do azul ( $-b^*$ ) a amarelo ( $+b^*$ ). A partir destes dados determinou-se os valores de  $\Delta E$ , que foram calculados pela **Equação 2**, onde  $\Delta L^2$ ,  $\Delta a^2$  e  $\Delta b^2$  representam a diferença entre a coloração do primeiro dia em que foi adicionado as emulsões em diferentes tampões e nos dias seguintes, com 4, 5, 6, 11, 19 e 26 dias (Velmurugan et al., 2010).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad \text{Equação (2)}$$



**Figura 11.** Colorímetro. Exemplificação da utilização com uma medição de calibragem.

### 2.7.3. Análise Estatística

Para cada formulação de emulsão primária:água foram obtidas três leituras dos três parâmetros colorimétricos avaliados:  $L^*$ (luminosidade),  $a^*$ (tonalidade vermelha) e  $b^*$ (tonalidade amarela).

De forma similar, para cada um dos alimentos testados (leite, iogurte e bebidas de soja e arroz), foram consideradas três amostras independentes, em cada uma das quais foram também feitas três leituras sequenciais de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . Os dados foram expressos como média±desvio padrão. Os testes estatísticos foram aplicados considerando um valor de  $\alpha = 0,05$  (95% de confiança), utilizando o *software* IBM SPSS Statistics for Windows, versão 25.0. (IBM Corp., USA).

Efetou-se uma análise de variância (ANOVA) com soma de quadrados tipo III, utilizando o procedimento GLM (Modelo Linear Generalizado). Todas as variáveis dependentes foram analisadas utilizando uma ANOVA a 2 fatores, especificamente o valor de pH e o tempo de armazenamento (TA). Uma vez que se verificou a existência de uma interação significativa entre os dois fatores em todos os casos, os resultados foram comparados através dos gráficos das médias marginais estimadas. O cumprimento dos requisitos da ANOVA, especificamente a normalidade da distribuição dos resultados e a homogeneidade das variâncias, foi verificado através do teste de Shapiro Wilk e de Levene, respetivamente.

Foi também feita uma análise discriminante linear (LDA) com o objetivo de caracterizar globalmente o efeito das diferentes emulsões (ou produtos alimentares) e dos diferentes valores de pH e tempos de armazenamento. As variáveis foram selecionadas sequencialmente (*stepwise*), considerando o teste de  $\lambda$  de Wilks com as probabilidades usuais de  $F$  (3,84 para entrar e 2,71 para remover). Este procedimento é baseado na verificação simultânea da significância de todas as variáveis previamente selecionadas antes da inclusão de uma nova. O objetivo principal foi estimar a relação entre as variáveis categóricas dependentes (diferentes emulsões, valores de pH, produtos alimentares ou tempos de armazenamento) com as variáveis independentes quantitativas (resultados obtidos para os parâmetros colorimétricos). Para avaliar o desempenho e adequação do modelo discriminante, foi aplicado um procedimento de validação cruzada interna.

#### 2.7.4. Avaliação Nutricional

**Macronutrientes:** A composição em macronutrientes (humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas) e valor energético da matriz alimentar incorporada diretamente com o extrato e incorporada com a solução corante desenvolvida (emulsão dupla) foram avaliados segundo métodos oficiais de análise de alimentos descritos pela AOAC (2016). O teor de humidade foi medido utilizando uma balança de humidade electrónica (PMB series, AE Adam GmbH), as proteínas foram estimadas pelo método macro-Kjeldahl pela conversão do azoto total, utilizando como fator de correção para as amostras de iogurte e leite de  $N \times 6,38$ , para bebida de arroz  $N \times 5,17$  e para bebida de soja  $N \times 5,52$ . Os lípidos foram determinados utilizando o método Rose Gottlieb (MAPA, 2013). As cinzas foram determinadas por incineração em mufla a  $550 \pm 15^\circ\text{C}$ . Os hidratos de carbono foram

calculados por diferença e a energia total calculada de acordo com as equações (3) e (4), respectivamente.

$$\text{Glúcidos (g/100g massa seca)} = (100 - (\text{g lípidos} + \text{g proteínas} + \text{g cinzas})) \quad \text{Equação (3)}$$

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos}) \quad \text{Equação (4)}$$

**Determinação de Açúcares Livres:** A composição dos açúcares livres foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme a metodologia descrita por Barros et al. (2013). As amostras com apenas extrato e extrato submetido a dupla emulsão (1g) foram enriquecidas com melezitose (1 mL) como padrão interno (PI, 25 mg/mL) e foram extraídas com 40 mL de etanol aquoso 80%, a 80°C, durante 1h 30 min. A suspensão obtida foi centrifugada (10 min, 15000 g) e o sobrenadante foi recolhido e concentrado a pressão reduzida, a 40°C. Foram efetuadas lavagens sucessivas com éter dietílico para remoção de vestígios de gordura. Após nova concentração a 40°C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água até um volume final de 5 mL e filtrados para *vials*. Os açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), com um sistema de bomba quaternária integrado (Knauer, sistema Smartline 1000), detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna cromatográfica 100-5 NH2 Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer) operando a 35°C. A fase móvel foi acetonitrilo: água desionizada, 7:3 (v/v) a um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. Os resultados foram expressos em g/100 mL, calculados pela normalização interna da área do pico cromatográfico utilizando o software Software Clarity 2.4 (DataApex).

**Determinação de Ácidos Gordos:** Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID) segundo a metodologia descrita por Barros et al. (2013), e após o processo de trans-esterificação. Os ácidos gordos foram metilados num meio metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante 12 h, num banho a 50 °C e agitação de 160 rpm. De seguida, foi adicionada água desionizada para promover a separação de fases e os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foram recuperados com éter etílico após agitação no *vortex*. O sobrenadante foi

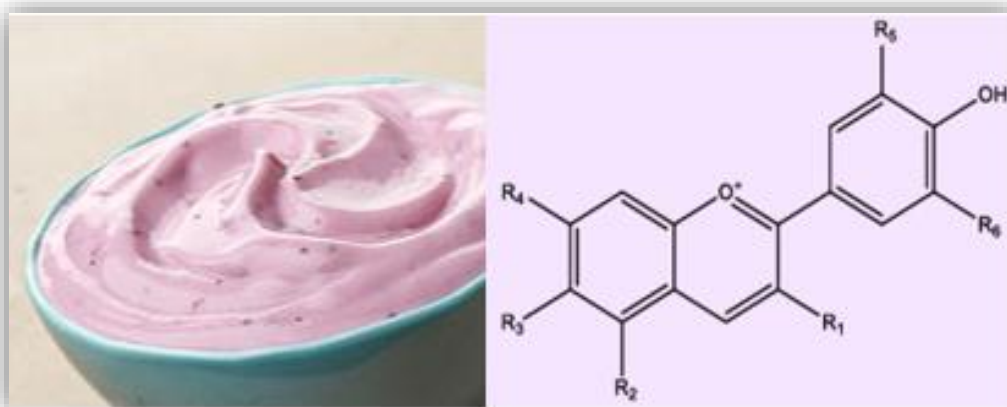
desidratado com sulfato de sódio anidro e filtrado através de filtros de nylon 0,2 µm para posterior análise. O perfil de ácidos gordos foi obtido num sistema de cromatografia gasosa (GC) modelo DANI 1000, equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID, 260°C) e uma coluna Zebron-Kame (30 m × 0,25 mm × 0,20 µm df). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 100 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 10 °C/min até 140 °C, 3 °C/min até 190 °C, 30 °C/min até 260 °C que foi mantida por 2 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 1,1 mL/min (0,61 bar), medido a 100 °C. A injeção *split* (1:50) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software Clarity 4.0.1.7 (DataApex) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

#### 2.7.5. Análise Estatística

Os ensaios descritos foram realizados utilizando três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios ± desvio padrão (SD). Os dados foram analisados através do teste ANOVA, com o intuito de determinar as diferenças significativas entre as amostras, com p-value = 0.05. Este tratamentos estatísticos foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 23.0.

*Capítulo 3*

# Resultados e Discussão





### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE *Sambucus nigra* L.

##### 3.1.1. Obtenção do extrato seco

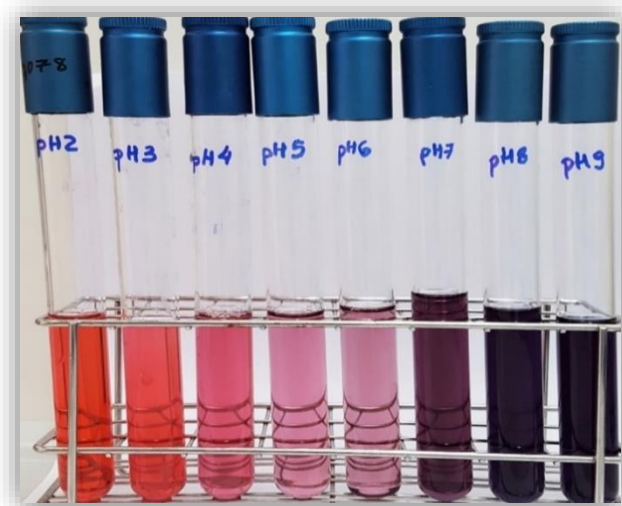
Para a produção do extrato de *Sambucus nigra* L. o peso bruto de frutos utilizados foi de 1405,7 g. Após procedimentos de obtenção e secagem obteve-se uma massa de 56,61g, correspondendo a um rendimento após secagem de 4,03% (m/m). A **Figura 12** mostra o aspecto do produto seco obtido que foi posteriormente caracterizado quanto à variação da cor com o pH, análise termogravimétrica (TGA) e estrutura química por FTIR.



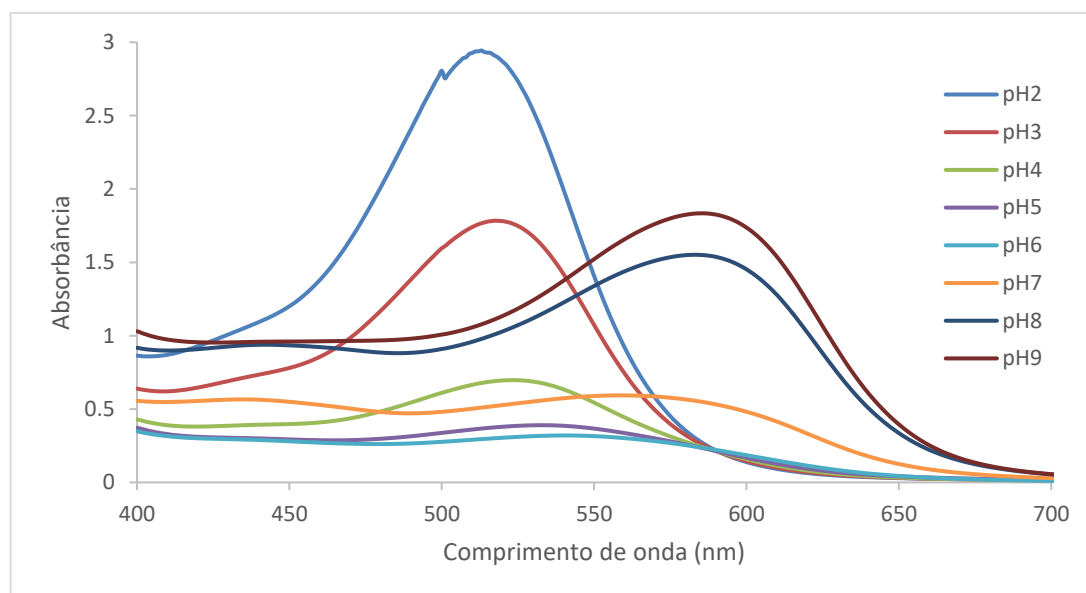
**Figura 12.** Extrato de *Sambucus nigra* L. após secagem por *spray drying*.

##### 3.1.2. Avaliação do comportamento corante com o pH

O aspecto visual da cor do extrato de *Sambucus nigra* L. com o pH (gama de 2 a 9) pode ser observado na **Figura 13**, confirmando a grande variabilidade da cor com este parâmetro processual. Esta variabilidade foi também confirmada pela análise UV-Vis efectuada (**Figura 14**) onde se observam tanto modificações no máximo de absorção como na sua intensidade. Para pH 2,0 o valor máximo da absorvância foi registado a 513 nm, região caracterizada pela cor avermelhada, tal como para pH 3,0 (máximo de absorvância a 518 nm). De acordo com Sikorski (2006), em meio extremamente ácido as antocianinas apresentam uma coloração intensamente avermelhada devida ao catião flavílico ( $AH^+$ ). A partir de pH 4,0 o extrato apresenta também uma coloração vermelha mas menos intensa, compatível com a fraca absorção para 523 nm, 533 nm e 540 nm, respetivamente para pH 4,0; 5,0 e 6,0. Em meio neutro (pH 7,0) obteve-se um máximo de absorvância a 559 nm, valor semelhante ao encontrado por Bordignon Jr. et al. (2009).



**Figura 13.** Observação visual do comportamento do corante para diferentes valores de pH.



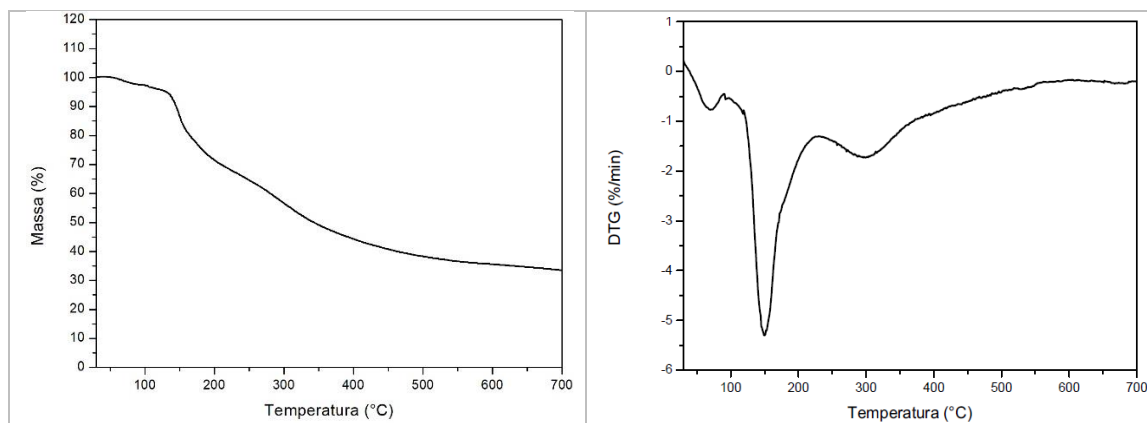
**Figura 14.** Espectro UV-VIS do corante em diferentes pH.

Para pH 8,0 e 9,0, obtiveram-se máximos a 583 e 586 nm, respectivamente, correspondendo à coloração violeta escuro. Bordignon Jr. et al., (2009) afirmam que a mudança nos máximos de absorção se deve às reações de equilíbrio que ocorrem com o cátion *flavilium* quando se altera o pH do meio. Essas reações influenciam a configuração estrutural das antocianinas que, à medida que se aumenta o pH, sofrem diminuição do número de ligações duplas conjugadas, ligações estas responsáveis pelo aumento dos valores do máximo de absorção, derivado da protonação do cátion *flavilium*. Dessa forma, ao diminuir as ligações duplas conjugadas, os máximos de absorção das antocianinas tendem a diminuir, o que é acompanhado pela perda de coloração.

Da observação direta da cor e análise efetuada pode-se concluir que um dos principais problemas de utilização das antocianinas está relacionado com a variabilidade da cor. De facto, a nível industrial é interessante ter soluções corantes cuja cor se mantenha constante (ou sofra apenas pequenas variações) com o pH. Tal é justificado pela necessidade de aplicação numa grande diversidade de alimentos, podendo estes ter diferentes pHs. Adicionalmente, também não ser desejável que a cor varie durante o processamento quando este é acompanhado por etapas a diferente pH.

### 3.1.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

Tanto os pigmentos como os corantes alimentares de origem natural podem ser extremamente susceptíveis a degradações térmicas, sendo importante fazer a sua avaliação. Para fazer esta avaliação, a análise termogravimétrica (TG/DTG) é uma excelente ferramenta, permitindo analisar as perdas de massas com a temperatura. No caso do extrato em análise, as curvas de TG/DTG obtidas estão documentadas na **Figura 15**. Adicionalmente, na **Tabela 5** descrevem-se as temperaturas correspondentes ao início da degradação, degradação máxima e termino de degradação para cada etapa identificada, assim como as respetivas perdas de massa.



**Figura 15.** Análise Termogravimétrica do extrato de sabugueiro estudado no presente trabalho: análise TG (gráfico da esquerda), análise DTG (gráfico da direita).

Analisando os resultados obtidos observa-se que a degradação térmica do extrato de sabugueiro ocorre em três estágios principais. O primeiro estágio ocorre na gama 30-100 °C, com uma perda de massa de 2.64%. O segundo estágio decorre no intervalo de 100-224°C (perda de massa de 29.3%) e o terceiro estágio ocorre entre 297 e 554°C (perda de massa de 31.6%). A primeira etapa corresponde à perda de água, ocorrência comum

dados que estes extratos possuem sempre alguma humidade associada. Na segunda etapa ocorre a decomposição da fase orgânica que, segundo Wang, Ma, Zhang, & Zhao (2014) entre 100 e 250 °C, corresponde à degradação de antocianinas como cianidina-3-glicosídeo que sofrerem clivagens. Esta degradação encontra-se normalmente sobreposta à degradação dos açúcares provenientes da clivagem, ocorrendo já cerca dos 250 °C, ou para temperaturas superiores. No intervalo entre 300 e 390 °C os autores relatam que as antocianinas já se encontram totalmente degradadas. No presente trabalho, o resíduo obtido no final da análise (temperatura de 700 °C) corresponde a 33,52%, mostrando que a amostra apresenta frações difíceis de serem degradadas em atmosfera inerte (presença de componentes termicamente estáveis), contrariamente à utilização de atmosfera oxidativa. Por se tratar de um extrato obtido a partir de um fruto, a degradação observada nos segundo e terceiro estágios pode estar também relacionada com a decomposição de componentes orgânicos como fibras, proteínas ou outros carboidratos, contribuindo também para o resíduo final obtido.

Com base nesta análise é possível concluir que o extrato apresenta uma baixa estabilidade térmica, limitando certas aplicações, sendo também interessante estudar metodologias de proteção à temperatura (fora do âmbito deste estudo). Em síntese, as antocianinas (compostos responsáveis pela cor) degradam-se termicamente a partir dos 100 °C tendo um seu máximo de degradação a 150 °C.

**Tabela 5.** Valores referentes a análise de TGA

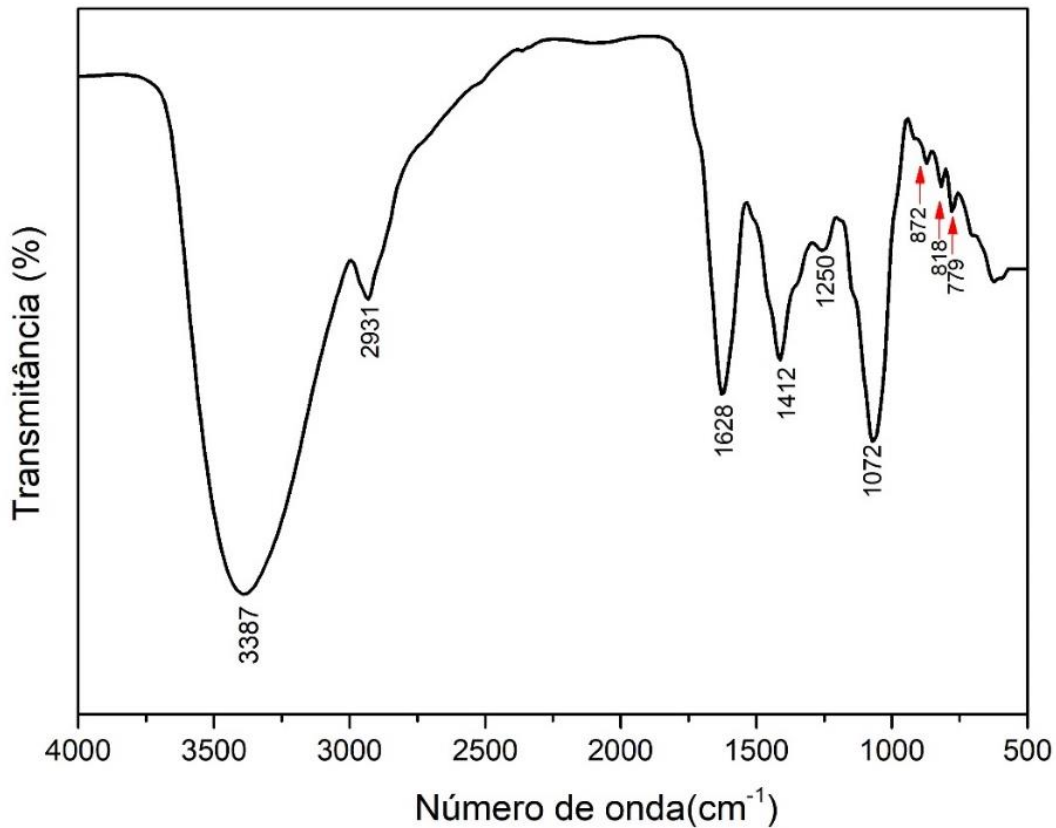
Picos	Temperatura inicial (°C)	Temperatura do máximo de degradação (°C)	Temperatura final (°C)	Perda de massa (%)
1	29,1	77,1	99,0	2,6
2	99,0	150,1	224,0	29,3
3	224,0	297,1	554,0	31,6

#### 3.1.4. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR do extrato do fruto de sabugueiro está representado na **Figura 16**, onde também foram assinaladas as principais vibrações observadas. Esta análise foi efetuada com o objetivo verificar a sua estrutura, através da identificação dos grupos funcionais característicos das antocianinas (anéis aromáticos, álcoois, açúcares e ésteres).

Os picos registados a 779, 818 e 872  $\text{cm}^{-1}$  são picos característicos de anéis aromáticos orto, meta e para substituídos (Pereira, Arruda, & Stefani, 2015). Os picos presentes na gama entre 1000 e 1250  $\text{cm}^{-1}$ , correspondem a vibrações associadas ao grupo éter (C-O-C), indicando a presença de carboidratos. Nomeadamente, o pico observado a 1250  $\text{cm}^{-1}$  neste trabalho pode ser atribuído a estiramentos característicos dos anéis pirano, encontrados tipicamente nos flavonoides (Baran, Goud, & Das, 2019; V. A. J. Pereira et al., 2015; Swer & Chauhan, 2019). Os picos em torno de 1400  $\text{cm}^{-1}$  estão associados a deformações do grupo C-O em fenóis, tal como vibrações na região de 1628  $\text{cm}^{-1}$  são muitas vezes atribuídas à vibração do grupo C=C em anéis aromáticos (Baran et al., 2019). A banda intensa na região de 3387  $\text{cm}^{-1}$  é característica das vibrações dos grupos O-H (Baran et al., 2019; V. A. J. Pereira et al., 2015; Swer & Chauhan, 2019), sendo a vibração a 2931  $\text{cm}^{-1}$  indicativo da presença de ligações C-H (Baran et al., 2019).

Os resultados de FTIR sugerem a presença de vibrações de grupos funcionais característicos das antocianinas afirmando a sua presença nos componentes do extrato.

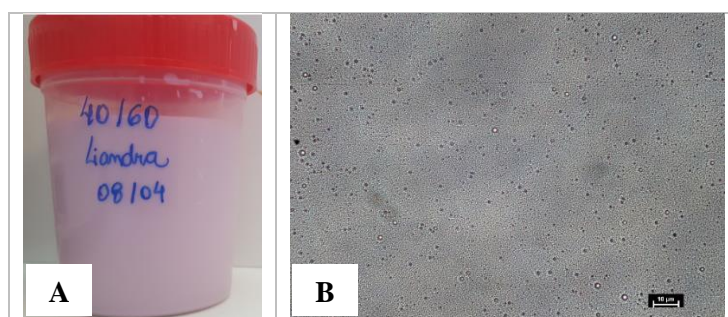


**Figura 16.** Leitura do espectro FTIR do extrato de *Sambucus nigra* L.

## 3.2. PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES

### 3.2.1. Emulsão simples

Tal como descrito no Capítulo 2, no presente trabalho foi desenvolvido um conjunto de experiências preliminares visando a obtenção das melhores condições de preparação das emulsões primária, cuja adequação foi validada em testes, também preliminares, de preparação da emulsão dupla. A sequência dos resultados obtidos até fixar as condições de preparação pode ser consultada no **Apêndice A**. Assim, as condições de preparação da emulsão primária corresponderam à utilização da razão O/A de 40/60 (água/óleo) utilizando PGPR a 5% (base óleo), pelo fato de ser mais estável e permitir produzir duplas emulsões a partir desta emulsão primária. A **Figura 17** mostra o aspecto visual da emulsão primária acompanhado pela sua avaliação microscópica, permitindo verificar a estrutura fina desta (tamanho médio de gotículas de 3,2  $\mu\text{m}$ ). De referir que esta emulsão incorpora já o extrato de sabugueiro, cuja incorporação foi um ponto importante do estudo realizado.


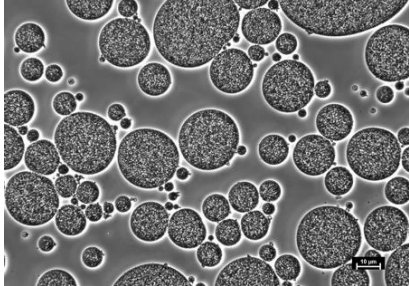

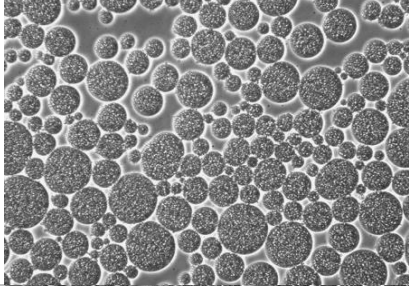

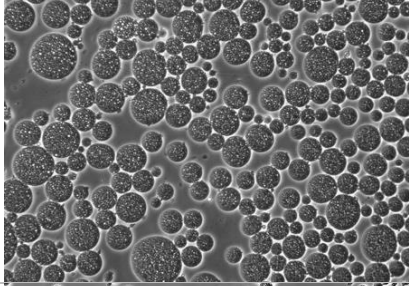

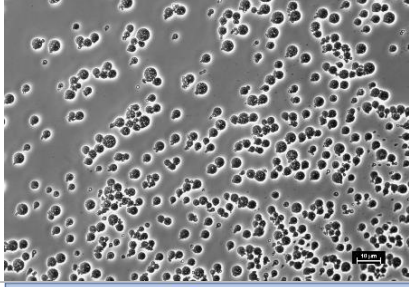
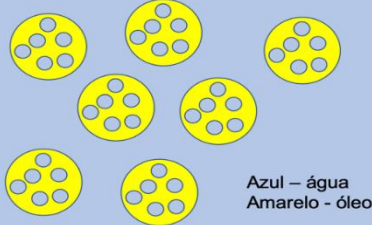


**Figura 17.** Aspecto da emulsão primária preparada: aspecto visual emulsão primária incorporando extrato de sabugueiro (A); Análise microscópica da emulsão primária (ampliação de 400X) (B).

### 3.2.2. Emulsão dupla

As emulsões duplas foram preparadas a partir da emulsão primária utilizando razões emulsão primária/água de 20/80, 30/70; 40/60 e 50/50. O sistema emulsionante para estabilização da segunda emulsão compreendeu 3% de Tween 80 (base emulsão total) e 15% Goma Arábica (base fase aquosa externa). A **Figura 18** mostra o aspecto visual das duplas emulsões e a respetiva análise microscópica após preparação. Todas as razões testadas conduziram à produção de emulsões duplas, tal como se pode observar pela obtenção da morfologia típica deste tipo de emulsões (**Figura 18**). Adicionalmente a composição 50/50 conduziu ao menor tamanho de gotícula (inferior a 5  $\mu\text{m}$ ). Estas imagens permitem também esclarecer o modo de funcionamento das emulsões duplas e a

hipótese colocada neste trabalho de que este tipo de sistemas pode conferir proteção da cor do extrato de sabugueiro às alterações de pH do meio externo. Mais especificamente, o óleo formará uma barreira entre o meio externo e as gotículas internas onde se encontra o extrato corante.

Emulsão	Aspetto visual	Análise microscópica (400X)
20/80		
30/70		
40/60		
50/50		
Aspetto típico de uma emulsão dupla		 <p>Azul – água Amarelo - óleo</p>

**Figura 18.** Aspetto visual das emulsões duplas preparadas e respetiva análise por microscopia ótica (ampliação 400X). Adicionalmente apresenta-se uma representação esquemática da morfologia típica para as emulsões duplas.

### 3.3. ESTABILIDADE DAS EMULSÕES DUPLAS

A estabilidade das emulsões duplas produzidas foi estudada ao longo do tempo utilizando duas metodologias principais: (i) análise microscópica para avaliar a evolução da morfologia e tamanho de gotícula das emulsões ao longo do tempo, nomeadamente visualizar fenómenos de desestabilização (por exemplo, o surgimento de coalescência); (ii) Determinação do *cream index* (CI). Os dois testes foram conjugados pelo que em (ii) foi apenas analisada a fase “creaming”.

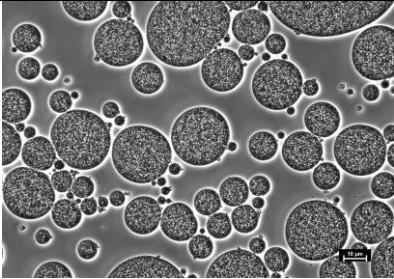
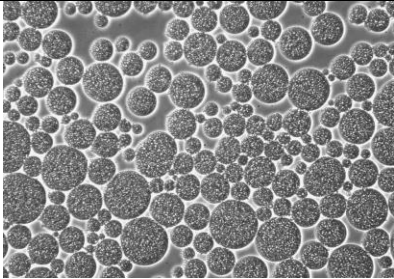
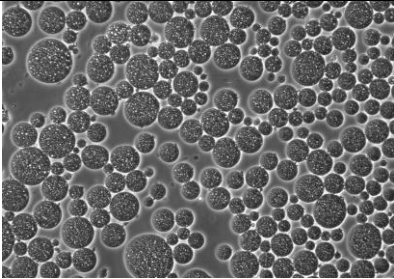
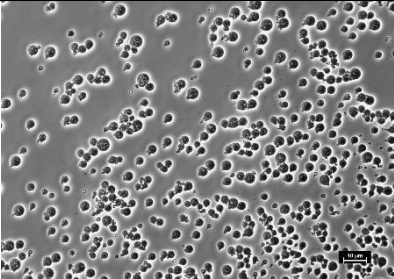
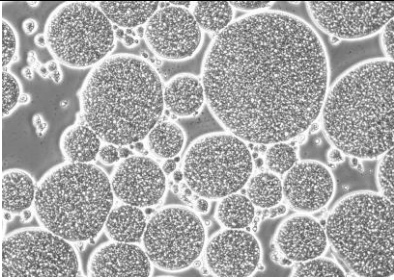
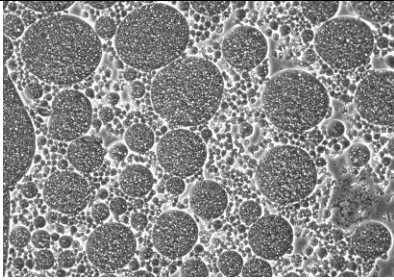
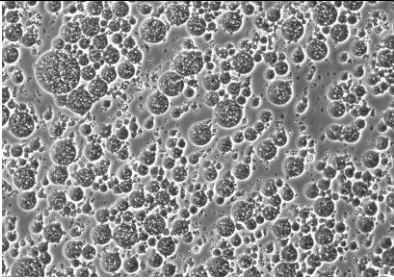
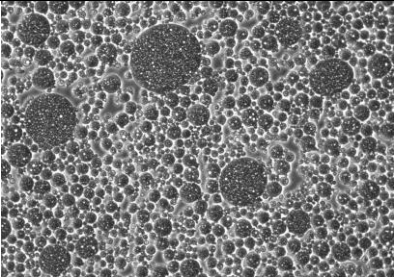
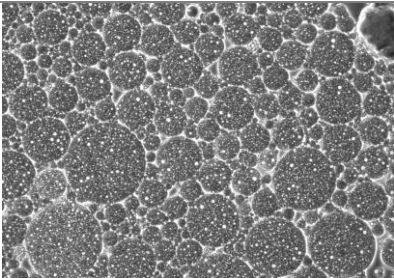
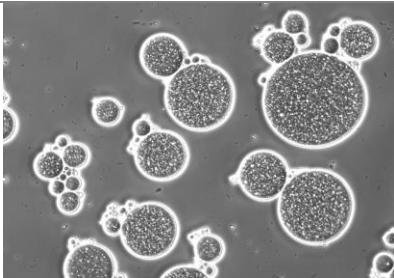
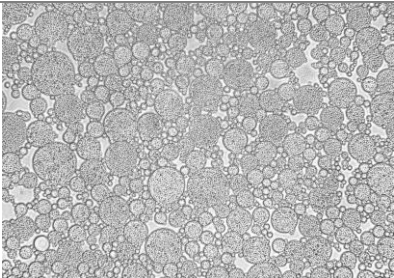
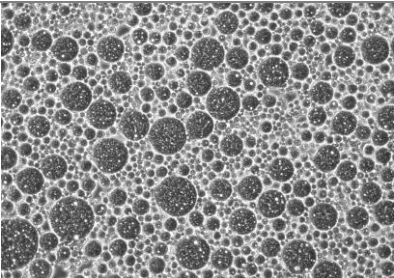
A **Tabela 6** reúne a análise microscópica efetuada para os tempos selecionados (o registo expandido dos resultados obtidos pode ser consultado no **Apêndice C**). Tal como comentado no ponto anterior, verifica-se a formação de emulsões duplas para todas as composições testadas. Porém, ao comparar as diferentes amostras verifica-se a obtenção de gotículas de diferentes tamanhos após preparação. Um tamanho menor indica, à partida, uma emulsão mais estável.

As gotículas estão em constante movimento devido a efeitos de energia térmica, gravidade e diversos efeitos mecânicos, podendo colidir motivando a sua agregação e, portanto, limitando a sua estabilidade (David Julian McClements, 2007b). Um aumento do tamanho da gotícula com o tempo indica a existência de processos de coalescência, portanto, de instabilidade da emulsão. Tal como pode perceber-se da análise da **Tabela 6**, as gotículas tendem a aumentar o seu tamanho ao longo do tempo. Adicionalmente, verifica-se comparando as amostras entre si, que a mais estável, isto é a que conduz a gotículas de menores dimensões é a correspondente à maior razão emulsão primária/água (50/50). Tal pode justificar-se também por esta amostra ser a mais viscosa apresentando melhor estabilidade cinética. Quanto maiores e menos homogêneas forem as gotas, menor a estabilidade da emulsão (McClements, 2007b). Reduzindo o tamanho das gotículas e aumentando a viscosidade da fase contínua irá promover-se a diminuição da formação de “creaming” (Gharehbeiglou, Jafari, Hamishekar, Homayouni, & Mirzaei, 2019), garantindo a proteção do extrato de *Sambucus nigra*.

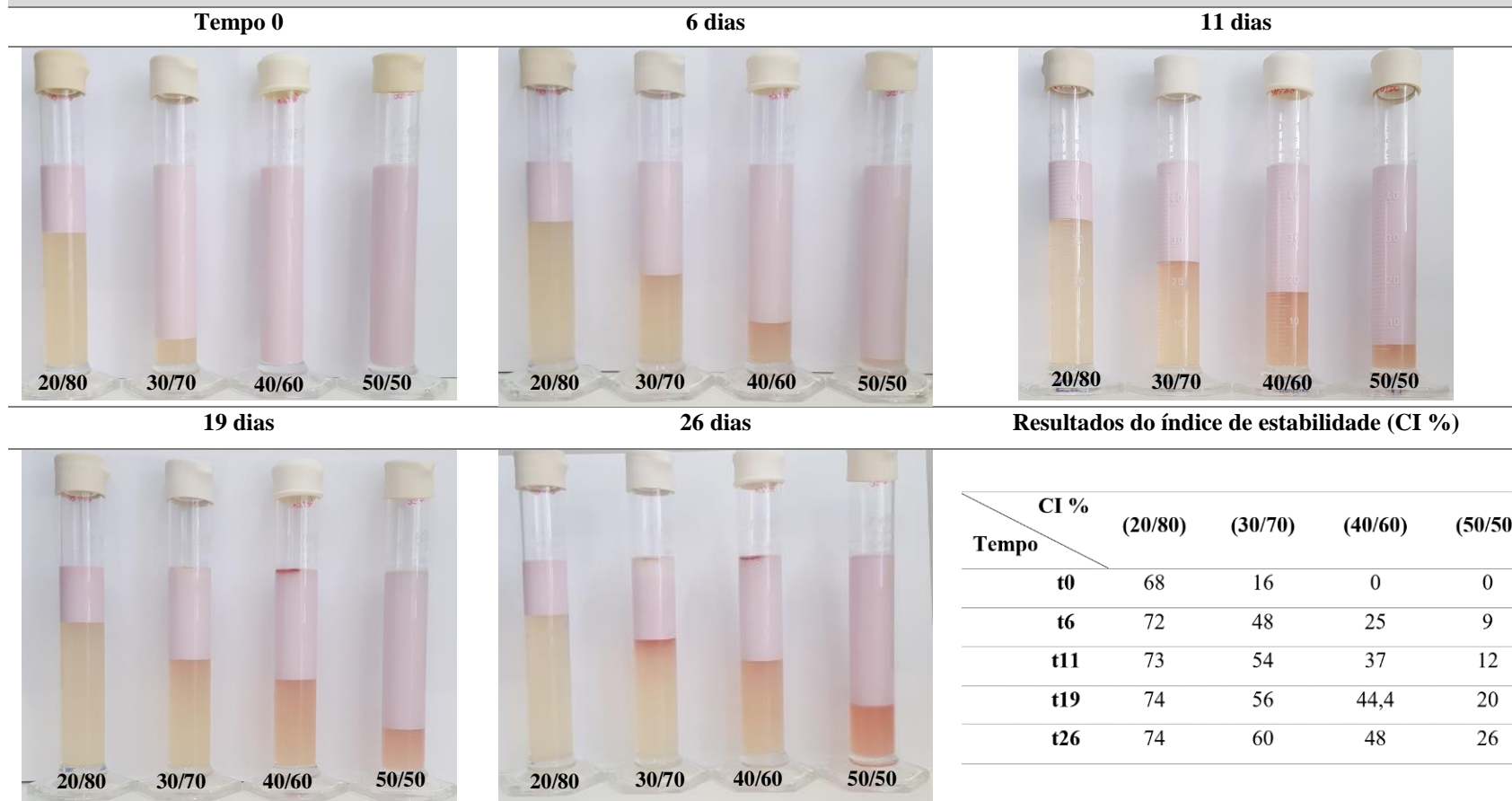
A **Tabela 7** mostra o “*cream index*” medido para as emulsões produzidas, teste que foi realizado com a finalidade de determinar a estabilidade da emulsão e fazer a relação desta com o observado por microscopia ótica. Para a razão 50/50 obteve-se um CI (%) menor comparativamente com as outras razões testadas, para todos os tempos avaliados, dando a indicação da melhor estabilidade desta formulação. Esta observação está de acordo com a análise efetuada por microscopia ótica. As amostras utilizando as

razões 20/80; 30/70 e 40/60 possuem gotículas maiores e desestabilizam mais rapidamente (Sun, Gunasekaran, & Richards, 2007). Adicionalmente, o fato da amostra 50/50 ser mais viscosa auxilia na estabilidade da emulsão garantindo a manutenção das suas características morfológicas (Kargar, Fayazmanesh, Alavi, Spyropoulos, & Norton, 2012). Como o resultado dos estudos de estabilidade, a razão 50/50 foi selecionada para fazer os estudos nas matrizes alimentares.

**Tabela 6.** Registro simplificado das imagens por microscópio óptico das emulsões duplas (Ampliação 400x)

Tempo (dias)	Amostra	(20/80)	(30/70)	(40/60)	(50/50)
t0					
t5					
t19					

**Tabela 7.** Imagens dos resultados do índice de estabilidade (CI %)



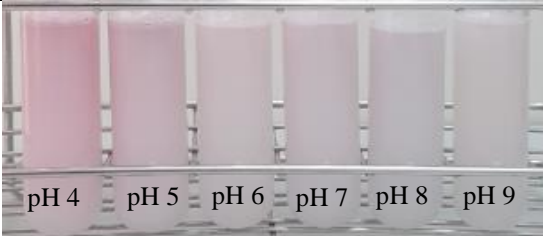
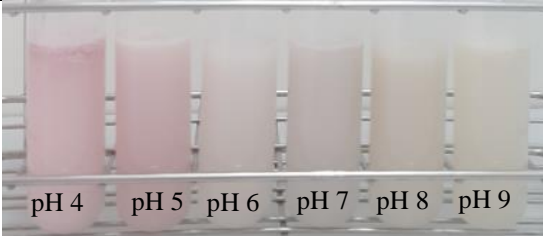






### 3.4. TESTES DE APLICAÇÃO UTILIZANDO TAMPÕES NA GAMA DE PH 4-9

#### 3.4.1. Análise Visual

Foram preparados tampões de pH 4-9 para abranger uma gama de pH alargada, sendo que em alimentos de pH básico o extrato de base antocianina possui uma coloração mais escura, tendendo para o azul e violeta, sendo um desafio para a área alimentar a sua aplicação nestes meios. Assim, para fins de testes preliminares, utilizaram-se nestes ensaios as emulsões duplas produzidas com as razões 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50. Pretendeu-se verificar o comportamento da coloração em função do pH ao longo do tempo, para depois prosseguir para as aplicações em matrizes alimentares.

A **Tabela 8** mostra o aspecto visual da coloração para as condições testadas ao longo do tempo, colocando em evidência o aspecto para 0 e após 19 dias. A verificação visual ao longo do tempo permitiu concluir que a razão 50/50, comparativamente às demais razões testadas, deu origem a produtos com pouca variabilidade na cor tendo-se mostrado também mais eficiente para pHs básicos. Em específico, pode observar-se que para o dia 19 a utilização da razão 50/50 origina cor semelhante para os pHs 9,7 e 8, diferindo esta das amostras utilizando as demais razões que perdem coloração (tendem para uma cor mais amarelada).

**Tabela 8.** Aplicação da emulsão dupla de razão 20/80; 30/70; 40/60 e 50/50 em tampões de pH 4-9

Tempo	t0	t19
20/80	 <p>pH 4   pH 5   pH 6   pH 7   pH 8   pH 9</p>	 <p>pH 4   pH 5   pH 6   pH 7   pH 8   pH 9</p>
30/70		
40/60		
50/50		

### 3.4.2. Análise Estatística

Para cada uma das formulações de emulsão dupla (proporções 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50), foi considerada a contribuição de dois fatores para a variabilidade estatística observada, nomeadamente o pH e o tempo de armazenamento (TA). Nesta condição, é necessário não apenas verificar a significância das diferenças induzidas por cada um dos fatores individuais, mas também avaliar se os dois fatores apresentam interação (pH×TA) significativa (valor de  $p < 0,001$ ). Esta agregação dos resultados implica que o valor apresentado para cada período de armazenamento seja obtido a partir da média de todos os valores de pH para esse período, e também, obviamente, que o resultado obtido para cada valor de pH seja a média dos sete tempos de armazenamento para essa mesma solução-tampão.

Em todos os casos, foram consideradas as coordenadas retangulares  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , respetivamente luminosidade, intensidade da cor vermelha e intensidade da cor amarela, mas também o sistema de coordenadas cilíndricas,  $L^*$ ,  $c^*$  e  $h^*$ , em que  $c^*$  representa a saturação (calculada como  $\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$ ) e  $h^*$  indica a tonalidade (calculada como  $180 + \left(\arctan \frac{b^*}{a^*}\right) * 360$ , a versão da fórmula aplicável nos casos em que o valor de  $a^*$  é negativo e o valor de  $b^*$  é positivo).

Na **Tabela 9**, são apresentados os valores obtidos para a formulação 20/80. Como pode verificar-se a interação foi significativa ( $p < 0,001$ ) em todos os casos, pelo que a classificação das comparações múltiplas efetuadas para cada fator não pode ser apresentada. Por outro lado, o efeito de cada fator individual foi também significativo em todos os casos, o que comprova que os valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c$  e  $h^*$  foram estatisticamente diferentes para pelo menos um dos tempos de armazenamento ou valores de pH.

Apesar da impossibilidade de apresentar a classificação estatística dos valores obtidos, é possível apresentar algumas tendências para os parâmetros colorimétricos avaliados. Assim, e começando pelos diferentes valores de pH, as amostras mantidas a pH mais elevado (6, 7, 8 ou 9) apresentaram maior luminosidade ( $L^*$ ), intensidade de cor amarela ( $b^*$ ), saturação ( $c$ ) e tonalidade ( $h^*$ ), tendo, por outro lado, manifestado tendência para menores valores da intensidade da cor vermelha ( $a^*$ ).

Em relação ao efeito induzido pelo tempo de armazenamento, não se observaram tendências inequívocas ao longo do tempo.

**Tabela 9.** Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (20/80) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento

		<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>c</b>	<b>h*</b>
pH	4	76±3	-1,0±0,3	6,6±0,3	6,6±0,3	98±2
	5	77±3	-0,9±0,3	6,6±0,5	6,7±0,5	97±2
	6	81±2	-1,4±0,2	6,8±0,5	7,0±0,5	101±2
	7	79±4	-1,3±0,3	7,0±0,5	7,1±0,5	100±2
	8	81±2	-1,4±0,2	7,2±0,4	7,3±0,4	101±1
	9	81±5	-1,4±0,2	7,1±0,5	7,3±0,5	101±1
Valor de $p^A$ (n=21)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	80±2	-1,0±0,3	6,9±0,2	6,9±0,2	98±2
	4 dias	80±3	-1,3±0,2	6,9±0,3	7,0±0,4	100±2
	5 dias	77±3	-1,0±0,3	6,7±0,3	6,8±0,3	99±2
	6 dias	81±3	-1,4±0,3	6,9±0,5	7,0±0,5	102±2
	11 dias	79±6	-1,2±0,3	6,9±0,5	7,0±0,5	99±1
	19 dias	81±5	-1,4±0,2	7,5±0,5	7,6±0,5	100±1
	26 dias	74±4	-1,4±0,1	6,6±0,5	6,7±0,5	102±1
Valor de $p^B$ (n=18)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pH×TA Valor de $p^C$ (n=117)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

<sup>A</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respectivo parâmetro em pelo menos um dos valores de pH testados. <sup>B</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respectivo parâmetro em pelo menos um dos tempos de armazenamento ensaiados. <sup>C</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma interação significativa entre os dois fatores (pH e TA), impossibilitando a classificação resultante da comparação múltipla de resultados.

Na **Tabela 10**, estão listados os resultados dos mesmos parâmetros colorimétricos, mas para a emulsão dupla 30/70. Como pode verificar-se, a interação foi significativa ( $p < 0,001$ ) em todos os casos, tendo sucedido o mesmo em relação ao efeito de cada fator individual. No entanto, não foi possível identificar tendências crescentes (ou decrescentes) que acompanhassem a evolução do tempo de armazenamento.

Por outro lado, no que concerne ao efeito do pH, foi possível verificar uma tendência para valores ligeiramente inferiores de  $a^*$  nas amostras ensaiadas a pH mais elevado (especificamente 8 e 9), que simultaneamente foram também as que apresentaram maiores valores de  $b^*$ ,  $c$  e  $h^*$ .

**Tabela 10.** Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (30/70) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento.

		<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>c</b>	<b>h*</b>
pH	4	79±5	-1,0±0,4	7,1±0,5	7,1±0,5	98±3
	5	77±3	-0,9±0,1	6,6±0,3	6,7±0,3	98±1
	6	79±4	-1,4±0,2	7,0±0,5	7,1±0,5	102±1
	7	79±4	-1,3±0,3	6,9±0,5	7,0±0,5	101±2
	8	78±6	-1,4±0,1	7,0±0,4	7,1±0,3	102±1
	9	78±3	-1,5±0,1	7,0±0,3	7,2±0,3	102±1
Valor de $p^A$ (n=21)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	76±3	-1,0±0,4	6,5±0,5	6,6±0,5	99±4
	4 dias	75±2	-1,1±0,2	6,6±0,4	6,7±0,4	99±1
	5 dias	81±3	-1,3±0,3	7,4±0,4	7,5±0,5	100±2
	6 dias	79±3	-1,5±0,2	7,0±0,2	7,2±0,4	102±1
	11 dias	79±3	-1,3±0,2	7,1±0,4	7,2±0,4	100±2

**Tabela 10 (continuação).** Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (30/70) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento.

	19 dias	82±2	-1,4±0,2	7,4±0,3	7,5±0,3	101±2
	26 dias	70±4	-1,3±0,1	6,2±0,3	6,4±0,3	102±1
Valor de $p^B$ (n=18)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pH×TA Valor de $p^C$ (n=117)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

<sup>A</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respetivo parâmetro em pelo menos um dos valores de pH testados. <sup>B</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respetivo parâmetro em pelo menos um dos tempos de armazenamento ensaiados. <sup>C</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma interação significativa entre os dois fatores (pH e TA), impossibilitando a classificação resultante da comparação múltipla de resultados.

Em relação às formulações preparadas com 40/60 (**Tabela 11**), a interação entre fatores foi uma vez mais significativa para todos os casos, tal como o efeito individual de cada um dos fatores (tempo de armazenamento e pH). Tal como observado nas duas primeiras formulações, foi apenas possível inferir algumas conclusões no caso do efeito do pH, que de uma maneira geral seguiram a mesma tendência que a observada na formulação 30/70, embora de forma menos pronunciada.

**Tabela 11.** Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (40/60) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento.

		<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>c</b>	<b>h*</b>
pH	4	75±2	-1,0±0,1	6,8±0,3	6,8±0,3	98±3
	5	76±2	-0,7±0,3	6,3±0,3	6,3±0,4	98±1
	6	79±4	-1,4±0,2	6,9±0,4	7,1±0,4	102±1
	7	75±4	-1,3±0,2	6,6±0,4	6,7±0,5	101±2
	8	75±4	-1,3±0,1	6,4±0,5	6,5±0,5	102±1
	9	76±5	-1,3±0,2	7,0±0,4	7,1±0,5	102±1
Valor de $p^A$ (n=21)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	74±2	-1,0±0,2	6,3±0,5	6,4±0,5	99±2
	4 dias	79±3	-1,2±0,2	6,9±0,3	7,0±0,4	100±2
	5 dias	77±3	-1,1±0,4	6,8±0,4	6,9±0,4	99±3
	6 dias	74±4	-1,1±0,2	6,4±0,3	6,5±0,3	99±2
	11 dias	77±3	-1,3±0,2	6,7±0,4	6,8±0,4	99±2
	19 dias	77±4	-1,5±0,1	6,9±0,4	7,0±0,4	101±1
	26 dias	74±4	-1,3±0,1	6,6±0,5	6,7±0,5	103±1
Valor de $p^B$ (n=18)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pH×TA Valor de $p^C$ (n=117)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

<sup>A</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respetivo parâmetro em pelo menos um dos valores de pH testados. <sup>B</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respetivo parâmetro em pelo menos um dos tempos de armazenamento ensaiados. <sup>C</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma interação significativa entre os dois fatores (pH e TA), impossibilitando a classificação resultante da comparação múltipla de resultados.

Finalmente, foi ainda ensaiada uma formulação resultante da combinação equimássica da formulação primária e água (**Tabela 12**). Nos resultados obtidos para esta formulação, a interação entre fatores foi uma vez mais significativa para todos os casos, a par do efeito individual de cada um dos fatores. Não foi, igualmente, possível verificar qualquer tendência clara de aumento ou diminuição dos fatores colorimétricos ao longo

do tempo de armazenamento. Em relação aos ensaios com diferentes valores de pH, verificou-se uma vez mais que os valores mais baixos de  $a^*$  foram registados nas amostras mantidas a pH mais elevado, que cumulativamente demonstraram, uma vez mais, valores ligeiramente superiores de  $b^*$ ,  $c$  e  $h^*$ .

**Tabela 12.** Parâmetros colorimétricos para a formulação de emulsão primária:água (50/50) em diferentes valores de pH e tempos de armazenamento.

		<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>c</b>	<b>h*</b>
pH	4	73±2	-0,8±0,4	6,3±0,4	7,1±0,5	98±3
	5	76±4	-0,8±0,3	6,4±0,5	6,7±0,3	98±1
	6	79±3	-1,3±0,1	7,1±0,3	7,1±0,5	102±1
	7	74±4	-0,9±0,3	6,3±0,5	7,0±0,5	101±2
	8	74±5	-1,2±0,1	6,6±0,4	7,1±0,5	102±1
	9	75±2	-1,2±0,2	7,2±0,3	7,2±0,3	102±1
Valor de $p^A$ (n=21)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	73±4	-1,0±0,2	6,5±0,5	6,6±0,5	98±4
	4 dias	77±3	-0,7±0,3	6,4±0,5	6,7±0,4	99±1
	5 dias	77±3	-1,3±0,1	7,0±0,4	7,5±0,4	100±2
	6 dias	78±3	-1,3±0,1	6,3±0,5	7,2±0,4	102±1
	11 dias	74±3	-0,8±0,3	6,6±0,5	7,2±0,4	100±2
	19 dias	74±3	-1,1±0,3	6,6±0,5	7,5±0,3	101±2
	26 dias	71±4	-1,3±0,1	6,6±0,4	6,4±0,3	102±1
Valor de $p^B$ (n=18)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pH×TA Valor de $p^C$ (n=117)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

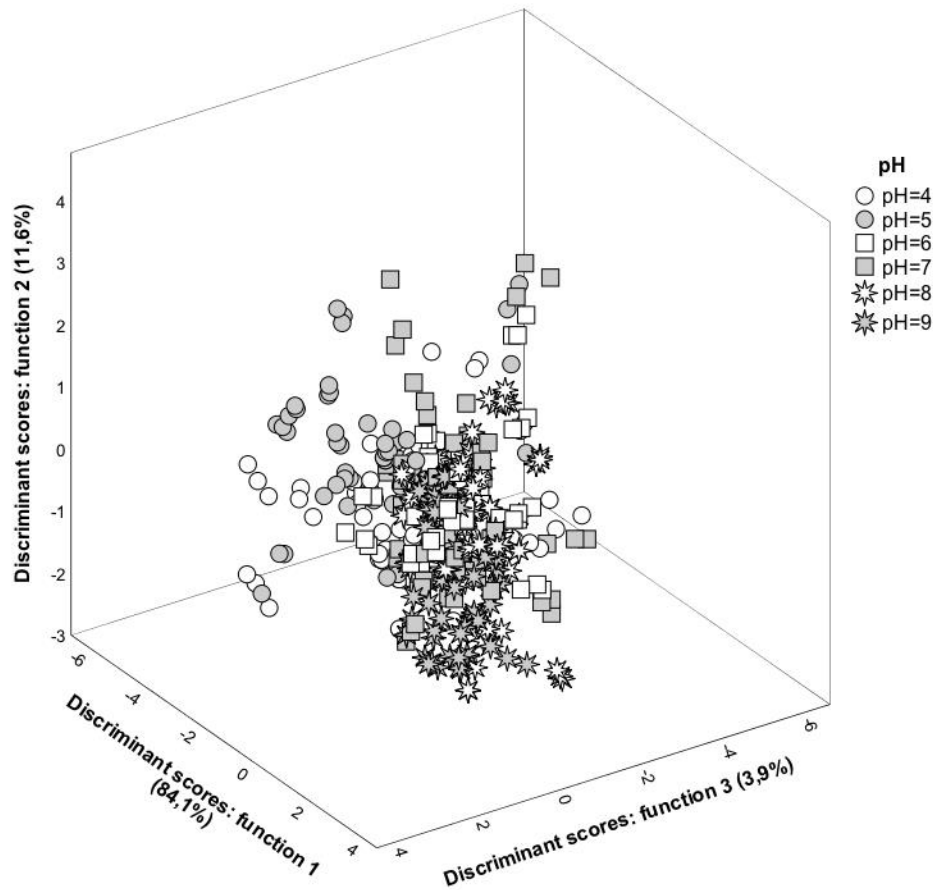
<sup>A</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respetivo parâmetro em pelo menos um dos valores de pH testados. <sup>B</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma diferença significativa no respetivo parâmetro em pelo menos um dos tempos de armazenamento ensaiados. <sup>C</sup>Valores de  $p$  inferiores a 0,050 indicam uma interação significativa entre os dois fatores (pH e TA), impossibilitando a classificação resultante da comparação múltipla de resultados.

### 3.4.2.1. Análise discriminante linear

Depois da identificação de algumas diferenças individuais em cada uma das formulações da emulsão dupla, efetuou-se um conjunto de análises discriminantes lineares de forma a avaliar as correlações entre os parâmetros colorimétricos (variáveis independentes quantitativas) e, sequencialmente, os valores de pH, o tempo de armazenamento e as formulações (variáveis dependentes categóricas). As variáveis independentes significativas foram selecionadas de acordo com o teste de  $\lambda$  Wilks. Apenas as variáveis com desempenho de classificação estatisticamente significativa ( $p < 0,050$ ) foram mantidas em cada um dos modelos estatísticos.

Em relação aos diferentes valores de pH (**Figura 19**), as três funções com maior poder discriminante (primeira função: 84,1%; segunda função: 11,6%; terceira função: 3,9% da variância observada) foram definidas a partir das variáveis  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $h^*$  e  $c$  ( $a^*$  não revelou capacidade discriminante significativa). Como pode ser visualizado, não foi

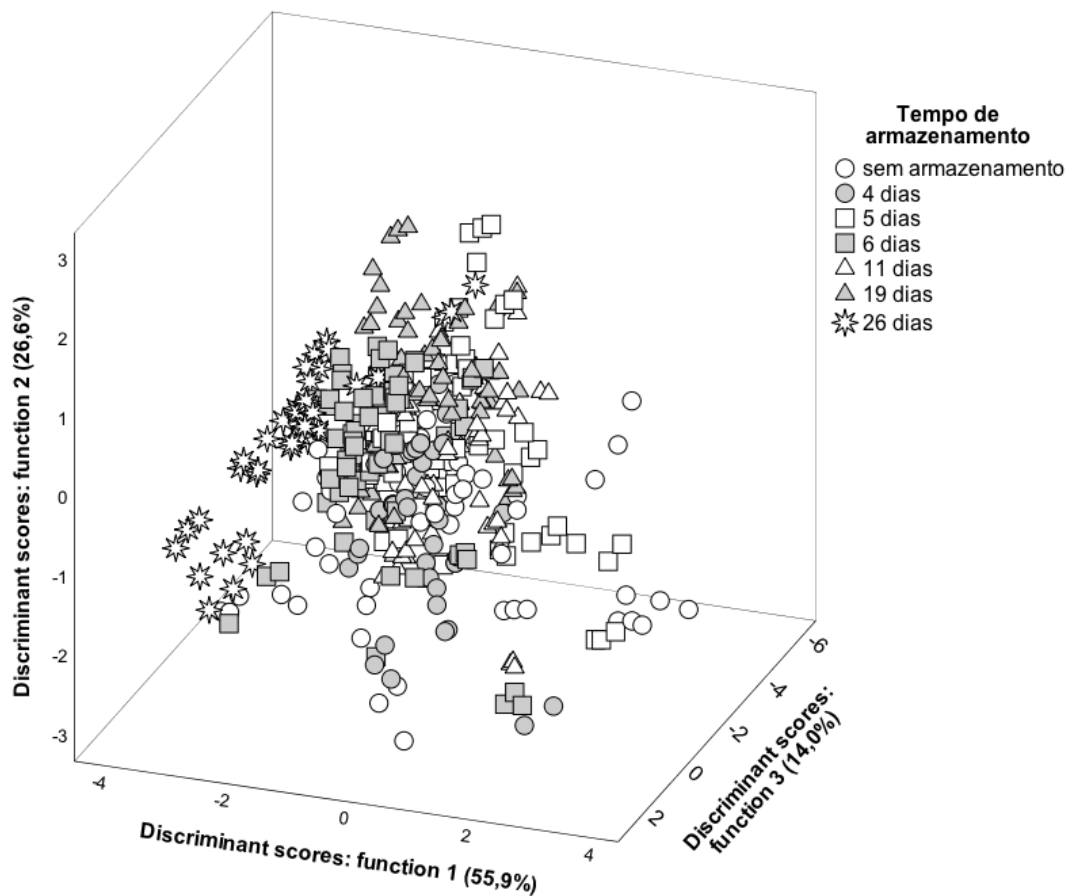
obtida uma separação dos marcadores correspondentes a cada um dos valores de pH ensaiados, pelo que não é relevante analisar as correlações obtidas entre as funções discriminantes e cada uma das variáveis selecionadas. Na verdade, de acordo com os resultados da eficácia de classificação apenas 41,2% dos grupos originais e 38,0% dos grupos obtidos por validação cruzada foram classificados corretamente.



**Figura 19.** Distribuição tridimensional de marcadores para os valores de pH de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos.

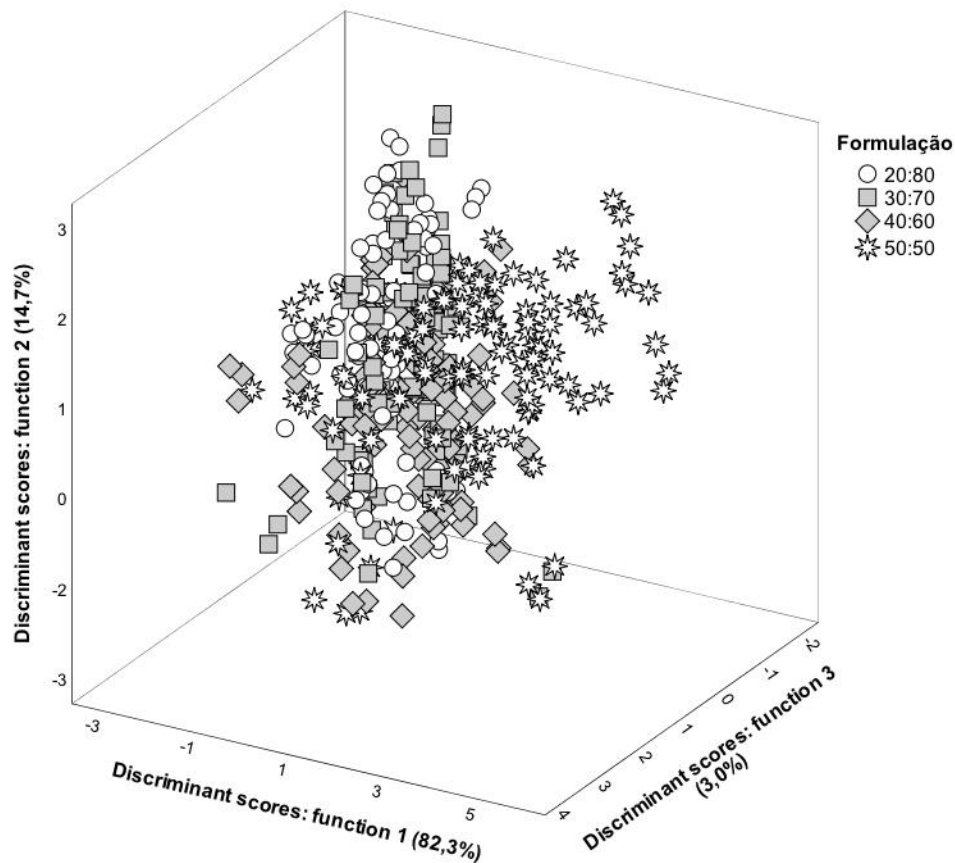
No caso do efeito global do tempo de armazenamento, os resultados foram similares, com 96,5% da variância observada explicada pelas três primeiras funções (**Figura 20**), embora neste caso as variáveis selecionadas como tendo poder discriminante tenham sido  $L^*$ ,  $c$ ,  $h^*$  e  $a^*$ . Para além desta diferença, também foi possível observar uma individualização parcial dos marcadores correspondentes aos 26 dias de armazenamento, particularmente em resultado da distribuição obtida pela função 1, que posicionou os marcadores no lado negativo do eixo. Uma vez que esta função apresentou a correlação mais alta com o parâmetro  $c^*$ , pode concluir-se que a alteração mais relevante nestas

amostras foi precisamente o abaixamento deste parâmetro. Ainda assim, as percentagens de grupos originais e grupos obtidos por validação cruzada foram de apenas 36,1% e 34,6%.



**Figura 20.** Distribuição tridimensional de marcadores para os tempos de armazenamento de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos.

Após verificação da manutenção dos parâmetros colorimétricos independentemente do pH e tempo de armazenamento, foi ainda analisada a hipótese de estes parâmetros poderem sofrer alterações específicas para cada uma das formulações ensaiadas. No entanto, e como pode confirmar-se na **Figura 21**, a distribuição espacial dos marcadores correspondentes a cada uma destas formulações não revelou a individualização de grupos, indicando assim que a manutenção destes parâmetros é independente da quantidade de formulação primária e água utilizadas nas formulações, acontecendo isto para diferentes valores de pH e tempos de armazenamento. Neste caso, as três únicas funções definidas incluíram, obviamente, 100% da variância dos resultados. Em relação às percentagens de casos corretamente classificados, estas foram, mais uma vez, baixas, fixando-se nos 53,7% para os grupos originais e 52,9% para os casos obtidos por validação cruzada.



**Figura 21.** Distribuição tridimensional de marcadores para as diferentes formulações de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos.

### 3.5. TESTES DE APLICAÇÃO EM MATRIZ ALIMENTAR

#### 3.5.1. Análise Visual

Para o teste da incorporação em alimentos, foram selecionados diferentes grupos de bebidas lácteas e vegetais que foram adicionadas com *Sambucus nigra* L na forma livre e na forma de emulsão dupla (50/50). Para fins de comparação, a análise da coloração destas bebidas foi feita para duas condições de armazenamento: 23°C (temperatura ambiente) e 5°C (temperatura de refrigeração). A avaliação da coloração ao longo do tempo foi efetuada no dia da incorporação e após 3 e 7 dias.

As **Tabelas 13** e **14** mostram o registo fotográfico dos ensaios realizados. Visualmente, as amostras adicionadas com a emulsão dupla, tanto no caso da temperatura de refrigeração como no caso da temperatura ambiente, provocaram a diminuição do

efeito da variação da cor com o pH. Porém, no caso da temperatura de refrigeração, a bebida de soja sofreu uma variação de coloração entre o tempo 3 e 7. Tal facto pode estar relacionado com a estabilidade das emulsões a baixas temperaturas, ocorrendo a sua desestabilização. No entanto, para as emulsões duplas utilizadas à temperatura ambiente pode verificar-se uma melhor performance no que respeita à manutenção da cor ao longo do tempo.

**Tabela 13.** Aplicação do corante livre e incorporado em emulsões duplas em matrizes alimentares na temperatura refrigerada (5°C)

Tempo	Corante incorporado diretamente em alimentos (refrigerado)	Corante incorporado (emulsão dupla) em alimentos (refrigerado)
t0	 <p>Iogurte    Arroz    Leite    Soja</p>	 <p>Iogurte    Arroz    Leite    Soja</p>
t3		
t7		

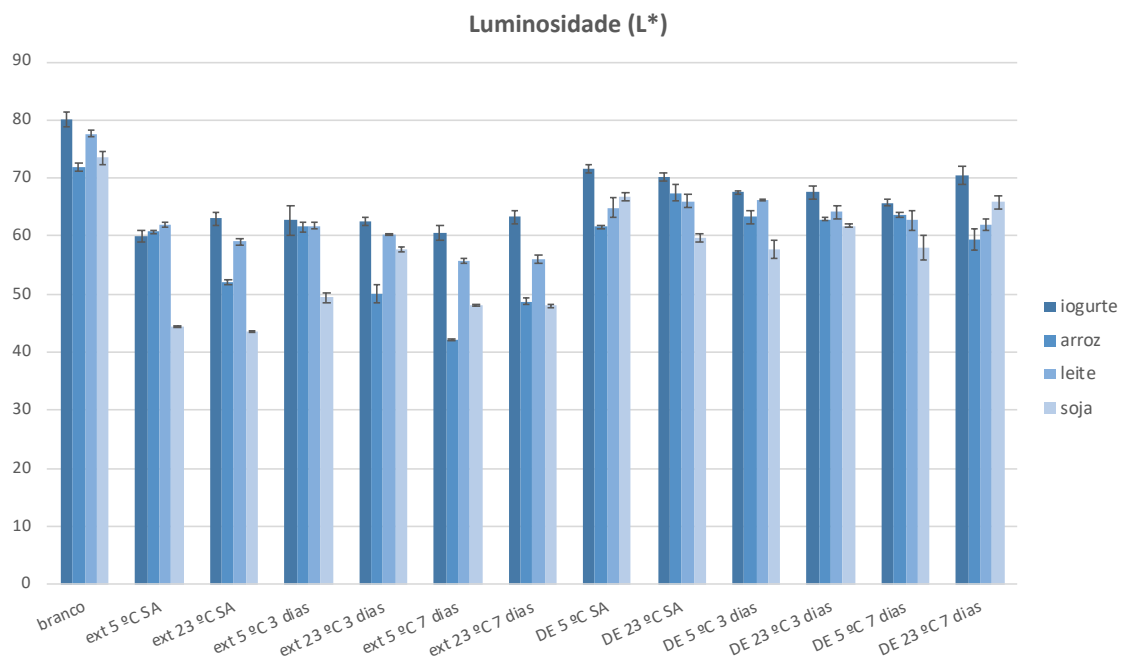
**Tabela 14.** Aplicação do corante livre e incorporado em emulsões duplas em matrizes alimentares na temperatura ambiente (23°C).

Tempo	Corante incorporado diretamente em temperatura ambiente	Corante incorporado (emulsão dupla) em temperatura ambiente
t0		
t3		
t7		

### 3.5.2. Análise Estatística

De forma a avaliar o potencial das formulações desenvolvidas para aplicações alimentares, foi selecionada uma das emulsões duplas preparadas (especificamente a 50/50), que posteriormente se incorporou em 4 bebidas distintas: iogurte, bebida orgânica de arroz, leite e bebida orgânica de soja. A fim de verificar eventuais melhorias induzidas pela utilização da emulsão dupla, foi também preparado um segundo conjunto de alimentos, aos quais se adicionou o extrato de sabugueiro diretamente, na mesma concentração utilizada com a emulsão dupla. Adicionalmente foi preparado um branco (produto sem adição de extrato ou emulsão dupla)

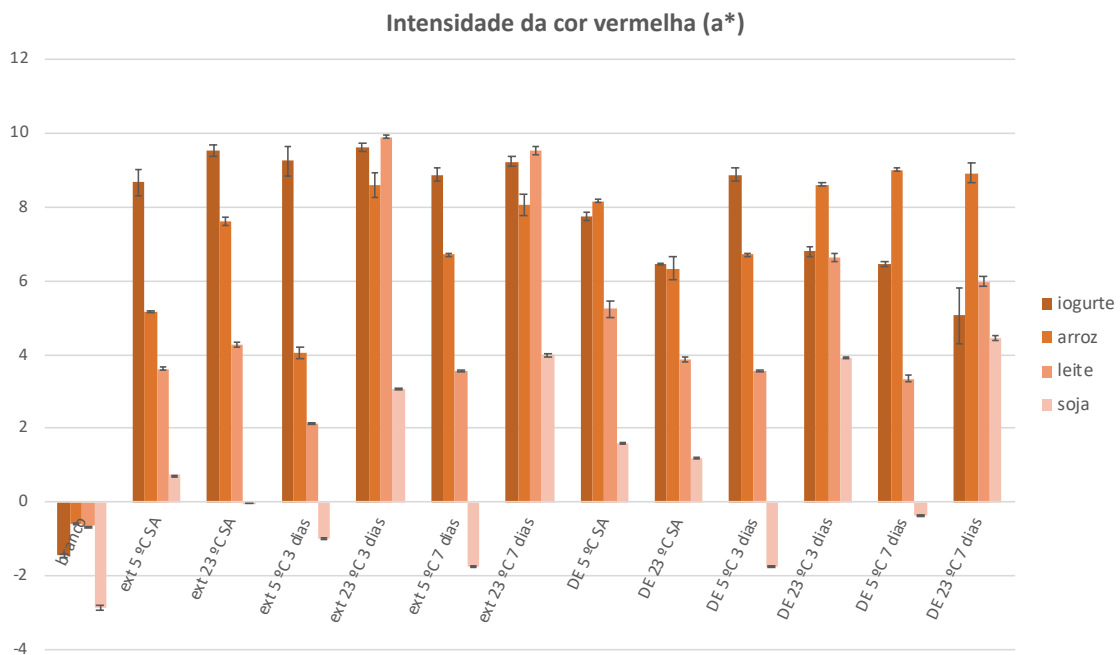
No que concerne à luminosidade (**Figura 22**), é notório que a utilização da emulsão dupla (DE) permitiu valores mais próximos daqueles observados no branco (produto não armazenado e sem adição de extrato ou DE). Adicionalmente, este efeito foi mantido quase constante, independentemente do tempo e temperatura de armazenamento. O facto de estes alimentos apresentarem naturalmente valores de pH diferentes comprova que a formulação baseada na DE foi utilizada é adequada para diferentes gamas deste parâmetro físico-químico.



**Figura 22.** Valores de luminosidade para os diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de armazenamento. ext: extrato; SA: sem armazenamento; DE: emulsão dupla.

Em relação às diferenças observadas para a intensidade da cor vermelha (**Figura 23**), a alteração mais evidente, apesar de expectável, diz respeito aos maiores valores observados, quer para as amostras adicionadas com o extrato direta, quer para aquelas incorporadas com a emulsão dupla. Note-se, no entanto, que os resultados produzidos foram menos evidentes no caso da soja, o que deverá estar relacionado com o pH mais alto desta bebida, uma vez que as antocianinas presentes no extrato de sabugueiro têm cor vermelha apenas a pH ácido.

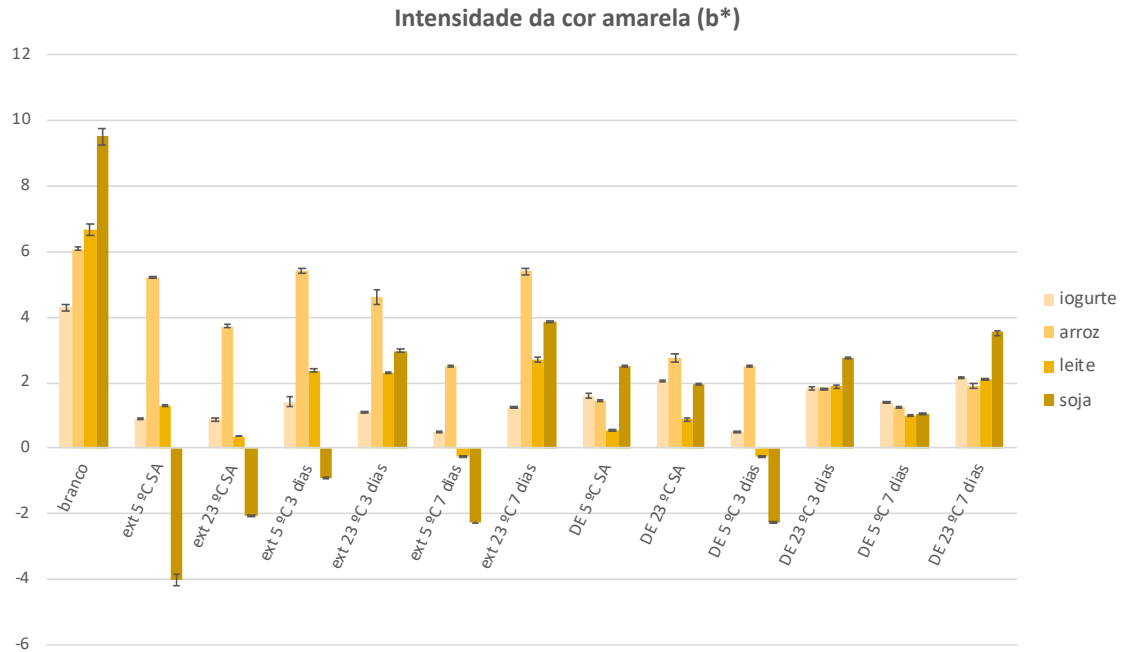
De notar também que se verificou, uma relativa tendência para valores mais altos da intensidade da cor vermelha nas amostras que foram mantidas a 23°C, quando comparadas com aquelas que foram refrigeradas (5°C). Por outro lado, os efeitos produzidos foram similares para as amostras analisadas no dia de preparação (SA) e para aquelas armazenadas durante 3 ou 7 dias, o que representa uma boa indicação da estabilidade destes corantes.



**Figura 23.** Valores de intensidade da cor vermelha para os diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de armazenamento. ext: extrato; SA: sem armazenamento; DE: emulsão dupla.

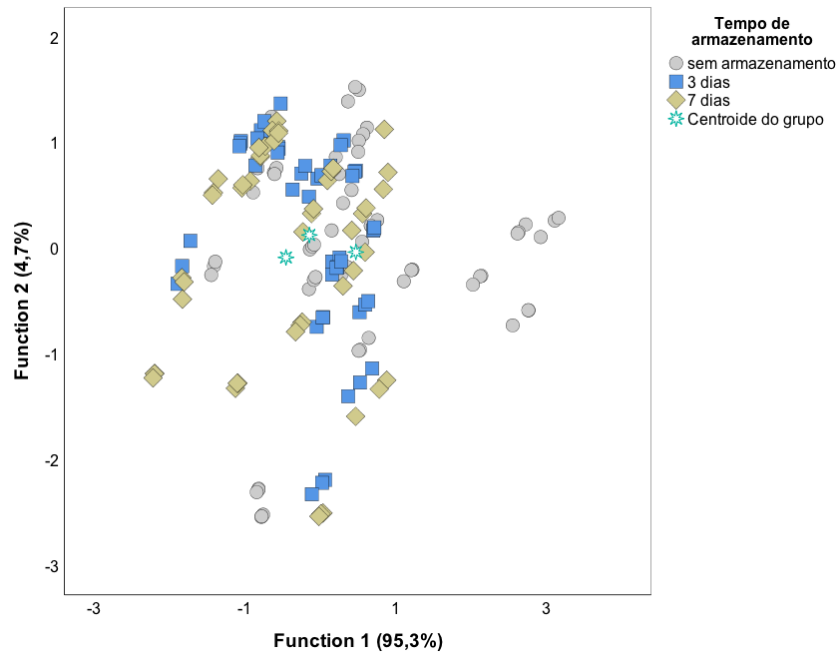
Em relação à intensidade da cor amarela (**Figura 24**), é notório que a bebida preparada a partir de soja e de arroz foram as que maiores diferenças evidenciaram entre as amostras preparadas com adição direta de extrato ou com o extrato protegido na emulsão dupla. Outro resultado evidente foi a maior similaridade deste parâmetro colorimétrico entre as amostras adicionadas com a emulsão dupla, para os quatro

alimentos ensaiados. De facto, as diferenças induzidas pelo tempo e temperatura de armazenamento foram mais evidentes nas amostras preparadas com adição de extrato direto, do que entre aquelas preparadas com adição da DE



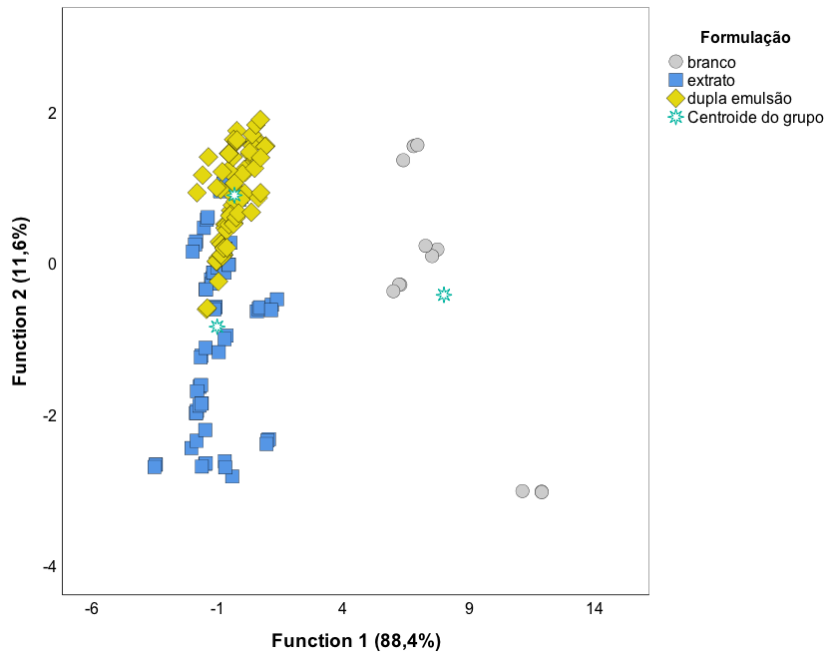
**Figura 24.** Valores de intensidade da cor amarela para os diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de armazenamento. ext: extrato; SA: sem armazenamento; DE: emulsão dupla

Após o estudo individual de cada uma das amostras preparadas, efetuou-se novamente uma análise discriminante linear para verificar as diferenças entre tempos de armazenamento e formulações de uma perspectiva global. Como pode verificar-se na **Figura 25**, os parâmetros colorimétricos não revelaram diferenças suficientes entre os tempos de armazenamento para permitir o agrupamento dos marcadores em aglomerados correspondentes a cada um desses tempos. Na verdade, nesta análise discriminante as percentagens de casos classificados corretamente foram apenas de 43,6% para os grupos originais e 41,7% para os casos obtidos por validação cruzada.



**Figura 25.** Distribuição tridimensional de marcadores para os diferentes tempos de armazenamento dos alimentos de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos.

Um resultado bem diferente foi obtido no caso das diferenças entre formulações (**Figura 26**). Efetivamente, verificou-se uma separação evidente entre os marcadores correspondentes às amostras sem adição de extrato ou emulsão dupla (branco) e amostras adicionadas com qualquer um destes agentes corantes. Esta separação resultou especificamente da aplicação da função 1, que como pode verificar-se posicionou as amostras de “branco” no lado direito do eixo, enquanto as restantes amostras ficaram do lado negativo. De acordo com os coeficientes de correlação, o parâmetro  $L^*$  obteve o valor máximo, pelo que se conclui que é este o parâmetro com as diferenças mais evidentes entre o branco e as restantes amostras. Já a função 2, mais correlacionada com a intensidade da cor vermelha, permitiu uma separação quase total entre as amostras preparadas por adição direta de corante e aquelas em que se utilizou a emulsão dupla. Fica, assim, comprovado que o  $a^*$  é o parâmetro com maiores diferenças entre os dois grupos de amostras, demonstrando especificamente maiores valores no caso das amostras adicionadas com a emulsão dupla (lado positivo do eixo vertical), independentemente do tempo e temperatura de armazenamento.



**Figura 26.** Distribuição tridimensional de marcadores para as diferentes formulações de acordo com os coeficientes das funções discriminantes definidas a partir dos parâmetros colorimétricos.

### 3.6. IMPACTO DA SOLUÇÃO DESENVOLVIDA NO VALOR NUTRICIONAL

Para analisar o impacto da incorporação do corante em emulsão dupla nos alimentos, fez-se análises do valor nutricional, referente à humidade, proteínas, lípidos, glúcidos, cinzas e valor energético.

A **Tabela 15** revela os valores médios, em g/100 mL de massa fresca (mf), obtidos para o valor nutricional e para o cálculo do valor energético das formulações analisadas. De uma forma geral verificaram-se diferenças significativas para os parâmetros analisados, principalmente no que respeita ao teor de lípidos e valor energético, que demonstrou ser superior para as amostras onde se utilizou a solução corante desenvolvida (emulsão dupla A/O/A), comparativamente com o alimento base e o alimento adicionado diretamente com o extrato. Tal pode ser justificado pelo teor de óleo adicionado na preparação da emulsão dupla, fator que deverá ser levado em consideração nos estudos futuros sobre estas preparações, já que seria vantajoso conseguir diminuir esta contribuição. No caso dos alimentos base verificou-se para o iogurte e bebida biológica de soja a fração mais abundante foram as proteínas e para o leite e bebida biológica de arroz foram os glúcidos. Adicionalmente, a diminuição da percentagem de humidade e teores de proteínas e glúcidos verificado para as amostras adicionadas com a emulsão dupla, comparativamente com o alimento base e o alimento adicionado diretamente com

o extrato, pode ser justificado pela necessidade de manter a percentagem de corante constante, sendo que no caso da utilização da emulsão dupla, o volume de emulsão dupla utilizado foi subtraído ao volume total a preparar, com o objetivo principal a comparação da cor. Em síntese, as amostras adicionadas com a emulsão dupla possuem na sua constituição um teor inferior do alimento base.

Entre os hidratos de carbono, os açúcares livres representaram uma importante contribuição, particularmente no caso do iogurte líquido e do leite. Para a bebida biológica de arroz a glucose é o açúcar mais abundante e para o leite a lactose. No caso do iogurte líquido verificaram-se contribuições idênticas da glucose e galactose e no caso da bebida biológica de soja não foi detectado nenhum dos açúcares analisados. Quanto ao valor energético, e devido ao óleo utilizado na emulsão dupla, verifica-se que as formulações que utilizaram a emulsão dupla registam sempre um aumento deste parâmetro.

### **Determinação de Ácidos Gordos**

Para as diferentes amostras analisadas foram detetadas composições em ácidos gordos distintas (**Tabela 16**), sendo estas dependentes do alimento base e do óleo utilizado na preparação das emulsões duplas (no caso das amostras adicionadas com a nova formulação corante desenvolvida). Fazendo a análise em termos de SFA, MUFA e PUFA verifica-se o seguinte: (i) no caso do iogurte não existe diferença significativa entre o alimento base e a amostra adicionada com o extrato, diferindo estas da amostra adicionada com a emulsão dupla (aumentando a sua composição em ácidos gordos insaturados (MUFA e PUFA, em particular PUFA e diminui em SFA); (ii) na bebida biológica de Arroz não existe uma diferença significativa em relação aos SFA e PUFA e MUFA, os valores possuem a mesma ordem de grandeza, havendo uma diferença substancial entre as amostras adicionadas com a emulsão dupla (aumento em PUFA e diminuição em MUFA). O valor dos SFA mantêm-se aproximadamente constante; (iii) no leite, entre o alimento base e o extrato não há diferença significativa, apenas em MUFA, diferindo estes valores dos obtidos para a amostra adicionada com a emulsão dupla, tal como no caso do iogurte, no leite houve um aumento em MUFA e PUFA e diminuição em SFA; (iv) na bebida de soja não existe diferença significativa entre o alimento base e a amostra adicionada com o extrato, diferindo estas da amostra adicionada com a emulsão dupla. Esta aumenta a sua composição em MUFA e diminui em SFA e

PUFA, isto porque a soja tem um nível elevado de PUFA, mas como o óleo tem mais MUFA o balanço faz com que o conteúdo em PUFA diminua.

Sintetizando, de uma forma geral o comportamento observado é compatível com o facto de os óleos serem naturalmente abundantes em ácidos gordos insaturados, incrementando o seu teor nas amostras que utilizaram a nova solução corante desenvolvida.

**Tabela 15.** Composição proximal, valor energético e açúcares livres das diferentes matrizes alimentares (média ± DP, n=9).

Valor Nutricional (g/100 mL mf)	Humidade (%)	Cinzas	Proteínas	Lípidos	Glúcidos	Valor Energético (kcal/100 mL mf)	Açúcares livres (g/100 mL mf)			
							Glucose	Galactose	Lactose	Total de açúcares totais
Iogurte líquido	85.1±0.8a	0.77±0.03a	7.89±0.08a	0.445±0.001b	5.8±0.5a	59±2b	1.89±0.05a	1.52±0.04a	nd	3.41±0.02a
Iogurte líquido com extrato	85.48±0.04a	0.77±0.02a	7.77±0.02a	0.46±0.01b	5.52±0.02a	57.3±0.2b	1.98±0.02a	1.54±0.03a	nd	3.52±0.01a
Iogurte líquido com emulsão dupla	78.5±0.2b	0.74±0.01b	5.2±0.2b	10.71±0.04a	4.9±0.3c	136.7±0.4a	1.42±0.01b	1.09±0.04b	nd	2.51±0.03b
Bebida biológica de Arroz	86.9±0.3b	0.15±0.01a	1.0±0.1a	1.01±0.05b	11.0±0.2a	57.1±0.8b	2.26±0.04b	nd	nd	2.26±0.04b
Bebida Biológica de Arroz com extrato	87.40±0.07a	0.119±0.003c	1.03±0.03a	0.97±0.03b	10.48±0.01a	54.8±0.3b	3.06±0.09a	nd	nd	3.06±0.09a
Bebida Biológica de Arroz com emulsão dupla	80.0±0.9c	0.141±0.002b	0.70±0.02b	11.2±0.1a	8.0±0.5b	135±3a	1.59±0.01c	nd	nd	1.59±0.01c
Leite	86.3±0.2b	0.75±0.02a	3.72±0.06a	1.56±0.03b	7.6±0.2a	59.5±0.7a	nd	nd	3.96±0.01a	3.96±0.01a
Leite com extrato	88.0±0.3a	0.78±0.03a	3.7±0.1a	1.57±0.03b	6.0±0.3b	52.6±0.8a	nd	nd	3.9±0.2a	3.9±0.2a
Leite com emulsão dupla	83.7±0.8c	0.77±0.04a	2.39±0.07b	10.7±0.1a	2.5±0.1c	116±1b	nd	nd	2.44±0.02c	2.44±0.02c
Bebida Biológica de Soja	92.40±0.08a	0.5±0.1a	3.4±0.1a	2.1±0.1b	1.6±0.1a	38.7±0.2a	nd	nd	nd	nd
Bebida Biológica de Soja com extrato	92.3±0.3a	0.56±0.02a	3.40±0.02a	2.09±0.05b	1.7±0.2a	39.1±0.7a	nd	nd	nd	nd
Bebida Biológica de Soja com emulsão dupla	83.9±0.2b	0.49±0.01b	2.48±0.02b	12.2±0.1a	0.9±0.1b	123.8±0.5b	nd	nd	nd	nd

**Tabela 16.** Composição em ácidos gordos das matrizes alimentares estudadas (média ± DP, n=9).

Ácidos gordos (%)	Iogurte líquido	Iogurte líquido com extrato	Iogurte com emulsão dupla
C6:0	3.0±0.1	3.09±0.01	0.120±0.004
C8:0	1.29±0.05	1.32±0.04	0.059±0.004
C10:0	2.9±0.1	2.46±0.08	0.087±0.001
C12:0	3.0±0.2	3.16±0.05	0.095±0.004
C14:0	10±1	9.7±0.4	0.313±0.009
C15:0	1.02±0.08	1.12±0.03	0.040±0.003
C16:0	33±1	33.0±0.2	11.7±0.2
C16:1	0.96±0.09	0.935±0.008	0.149±0.002
C17:0	0.74±0.01	0.649±0.006	0.087±0.001
C18:0	13.9±0.2	14.14±0.02	2.63±0.08
C18:1n9c	19.8±0.6	20.4±0.2	32.9±0.5
C18:2n6c	4.0±0.2	4.07±0.09	49.9±0.2
C18:3n3	0.97±0.04	0.60±0.02	0.766±0.001
C20:0	0.600±0.006	0.59±0.02	0.433±0.008
C20:1	0.515±0.007	0.44±0.03	0.218±0.006
C22:0	2.04±0.05	1.95±0.05	0.297±0.008
C23:0	1.54±0.03	1.4±0.1	0.040±0.003
C24:0	1.04±0.02	0.96±0.07	0.18±0.01
SFA	73.7±0.9a	73.6±0.2a	16.1±0.3b
MUFA	21.3±0.7a	21.7±0.1a	33.3±0.5b
PUFA	5.0±0.2b	4.7±0.1b	50.6±0.2a

Ácidos gordos (%)	Bebida Biológica de Arroz	Bebida Biológica de Arroz com extrato	Bebida Biológica de Arroz com emulsão dupla
C6:0	0.24±0.01	nd	0.068±0.003
C8:0	0.088±0.002	nd	0.026±0.002
C10:0	0.279±0.006	nd	0.039±0.003
C12:0	0.088±0.008	nd	0.039±0.001
C14:0	0.350±0.009	0.20±0.01	0.127±0.001
C16:0	10.3±0.4	8.9±0.1	11.0±0.1
C16:1	0.16±0.02	0.19±0.01	0.146±0.001
C18:0	4.10±0.08	3.51±0.02	2.65±0.01
C18:1n9c	71.2±0.2	72.0±0.1	36.5±0.5
C18:2n6c	9.61±0.01	12.4±0.1	46.9±0.6
C18:3n3	0.372±0.003	0.35±0.03	0.84±0.01
C20:0	0.83±0.02	0.38±0.02	0.456±0.001
C20:1	0.360±0.007	0.272±0.007	0.233±0.002
C20:2	0.23±0.01	0.490±0.006	0.26±0.02
C22:0	1.24±0.05	0.83±0.01	0.36±0.02
C24:0	0.55±0.06	0.52±0.03	0.35±0.01
SFA	18.1±0.2a	14.3±0.1c	15.10±0.01b
MUFA	71.7±0.2a	72.4±0.1a	36.9±0.5b
PUFA	10.2±0.1c	13.24±0.02b	48.0±0.5a

**Tabela 16 (continuação).** Composição em ácidos gordos das matrizes alimentares estudadas (média ± DP, n=9).

Ácidos gordos (%)	Leite	Leite com extrato	Leite com emulsão dupla
C6:0	4.24±0.04	4.4±0.2	0.71±0.03
C8:0	1.84±0.08	2.11±0.02	0.409±0.002
C10:0	4.3±0.1	4.05±0.01	0.74±0.02
C12:0	4.6±0.3	4.30±0.04	0.72±0.03
C14:0	11.8±0.7	12.3±0.2	1.66±0.03
C14:1	1.13±0.02	0.918±0.004	0.110 0.001
C15:0	1.44±0.01	1.22±0.01	0.136±0.005
C16:0	34.1±0.2	33.3±0.1	14.1±0.02
C16:1	1.26±0.05	1.50±0.06	0.293±0.003
C17:0	0.601±0.008	0.577±0.008	0.134±0.002
C18:0	11.7±0.6	11.3±0.1	3.9±0.2
C18:1n9c	19.9±0.2	21.07±0.03	31.6±0.4
C18:2n6c	2.2±0.1	2.1±0.1	43.8±0.7
C18:3n3	0.92±0.06	0.57±0.02	0.67±0.02
C20:0	nd	0.23±0.01	0.412±0.004
C20:1	nd	nd	0.164±0.006
C20:2	nd	nd	0.242±0.003
C22:0	nd	nd	0.23±0.01
SFA	74.6±0.2a	73.8±0.1a	23.1±0.3b
MUFA	22.3±0.3c	23.49±0.04b	32.2±0.4a
PUFA	3.08±0.06b	2.7±0.1b	44.7±0.7a

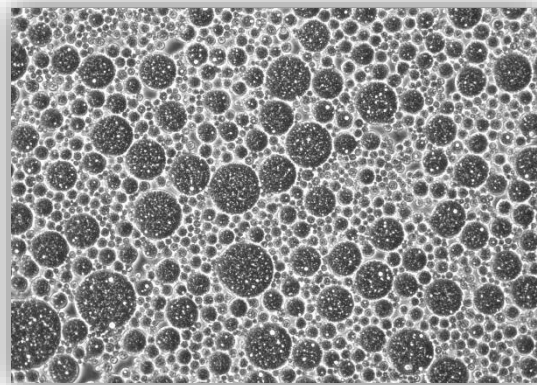
Ácidos gordos (%)	Bebida Biológica de Soja	Bebida Biológica de Soja com extrato	Bebida Biológica de Soja co emulsão dupla
C10:0	0.107±0.008	nd	nd
C12:0	0.11±0.01	nd	nd
C14:0	0.218±0.004	0.150±0.003	0.100±0.001
C16:0	12.4±0.3	12.5±0.2	11.35±0.4
C17:0	0.133±0.001	0.124±0.002	0.088±0.001
C18:0	6.3±0.2	6.4±0.1	3.05±0.07
C18:1n9c	20.6±0.4	20.26±0.09	31.2±0.3
C18:2n6c	51±1	52.10±0.07	50.8±0.7
C18:3n3	6.3±0.2	6.6±0.1	1.7±0.1
C20:0	0.41±0.02	0.36±0.01	0.48±0.02
C20:1	nd	0.215±0.001	0.222±0.001
C20:2	1.17±0.01	0.443±0.003	0.442±0.001
C22:0	0.66±0.04	0.519±0.004	0.383±0.003
C24:0	0.35±0.02	0.24±0.01	0.25±0.01
SFA	20.8±0.5a	20.33±0.07a	15.7±0.5b
MUFA	20.6±0.4b	20.48±0.09b	31.4±0.3a
PUFA	58.6±0.9a	59.15±0.02a	52.9±0.8b

**SFA** – Ácidos gordos saturados; **MUFA** – Ácidos gordos monoinsaturados; **PUFA** – Ácidos gordos polinsaturados; nd – não detectado

---

*Capítulo 4*

# Conclusão e Trabalho Futuro





#### 4. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de estabilização do corante baseado em antocianinas (*Sambucus nigra* L) que apresenta instabilidade ao pH, isto é, a sua cor muda substancialmente com o pH impedindo a sua utilização universal na indústria alimentar. Este comportamento causa constrangimentos de utilização em diferentes alimentos (diferentes cores vão ser obtidas) e também em processos produtivos onde o pH sofre alterações.

Neste contexto, testou-se o desenvolvimento de uma formulação corante baseada na tecnologia de emulsões duplas, nomeadamente emulsões A/O/A. O princípio de funcionamento reside no facto de o corante (hidrofílico) estar protegido na fase água interior que não contacta diretamente com a fase água exterior dado a existência de uma barreira (fase óleo). Esta foi a hipótese de partida deste trabalho que seguiu as seguintes fases: (i) definição das melhores condições para a produção das emulsões incorporando o extrato de *Sambucus nigra* L.; (ii) testes de estabilidade das diferentes formulações produzidas; (iii) testes de incorporação preliminares em soluções tampão (pH 4-9) para avaliação do comportamento da cor ao longo do tempo; (iv) testes em matrizes alimentares selecionadas para cobrir uma gama de pH de interesse utilizando a emulsão dupla mais promissora face aos pontos anteriores; e (v) dado esta formulação incorporar uma fase óleo, avaliar o impacto da sua adição no valor nutricional dos alimentos.

Como resultado deste trabalho foi possível demonstrar a viabilidade de utilização desta estratégia (produção de sistemas corantes baseados na produção de emulsões duplas) para conferir proteção a sistemas corantes baseados em antocianinas. De acordo com a revisão bibliográfica efetuada, esta estratégia nunca foi antes utilizada para o fim proposto neste trabalho.

Quanto aos resultados específicos deste trabalho e face às condições testadas, verificou-se que a solução corante desenvolvida mais promissora foi a baseada na emulsão designada por 50/50, isto é a emulsão que parte de uma emulsão primária com uma razão A/O 40/60 seguidamente da sua dispersão em água utilizando uma razão emulsão primária/água de 50/50. Em síntese, esta foi a emulsão produzida com maior poder corante (incorpora a maior concentração de *Sambucus nigra* L., entre as emulsões duplas testadas), apresenta maior estabilidade ao longo do tempo e confere uma maior uniformidade de cor entre os pHs testados.

De forma a avaliar o potencial da solução corante desenvolvida, a emulsão dupla mais promissora (50/50) foi testada em matrizes alimentares na gama de pH 4-8, como o iogurte (pH 4,65), bebida de arroz (pH 6,01), leite (pH 6,47) e bebida de soja (pH 7,92), além disso, para fim de comparação analisou-se estas bebidas armazenadas em temperatura de 23°C (ambiente) e a temperatura de 5°C (refrigerada). Visualmente, as amostras que utilizaram a emulsão dupla e que armazenadas à temperatura ambiente permaneceram com uma coloração estável, ou seja, protegeram o corante da influência do pH do meio. No entanto, no caso das amostras refrigeradas obteve-se alguma desestabilização da coloração, particularmente no caso da bebida de soja (pH 7,92) apontando para a influencia das baixas temperaturas na desestabilização das emulsões neste pH.

Adicionalmente, verificou-se que o impacto do uso desta solução corante no valor nutricional, o qual teve de forma geral diferenças significativas para os parâmetros analisados, principalmente no que respeita ao teor de lípidos e valor energético, que foi superior quando se utilizou a solução corante baseada na emulsão dupla, comparativamente com o alimento base e o alimento adicionado diretamente ao extrato. Este fato pode ser justificado pelo teor de óleo adicionado na preparação da emulsão dupla, fator que deverá ser levado em consideração em estudos futuros sobre estas preparações, já que seria vantajoso conseguir diminuir esta contribuição.

Em síntese, o presente trabalho, consistiu num estudo inicial no campo de desenvolvimento de sistemas corantes baseados em emulsões duplas podendo ainda ser explorado a diversos níveis em trabalhos futuros. Alguns exemplos incluem:

- Dar continuidade aos estudos da preparação das emulsões, nomeadamente utilizando outras razões A/O/A visando sempre diminuir a quantidade de óleo utilizada para minimizar o impacto no valor nutricional. Adicionalmente, no caso de produtos com quantidades de óleo inferiores seria viável proceder à sua secagem, por exemplo utilizando a tecnologia de *spray-drying*, gerando produtos potencialmente mais atrativos para utilização ao nível industrial. De realçar que neste trabalho foi feito um teste de secagem com a emulsão 50/50 que revelou dificuldades na obtenção do pó seco.
- Testar outros óleos da família dos triacilgliceróis que se revelem nutricionalmente mais atrativos que o utilizado neste trabalho. A sua escolha deveu-se principalmente a questões de viscosidade baixa o que é importante quando se desenvolve este tipo de processos pela primeira vez. Assim, o óleo utilizado, poderia ser substituído por outro

com características funcionais mais atrativas, nomeadamente quanto à atividade antioxidante e capacidade de diminuição do colesterol. Um exemplo poderia ser o óleo de linhaça.

- Testar alternativas à família dos triacilgliceróis, procurando outras fases óleo de interesse. Este ponto necessitaria de ser suportado por uma pesquisa bibliográfica e testes de emulsificação dos óleos em água, o que requereria o estudo de sistemas emulsificantes alternativos ao utilizado neste trabalho.
- Seria também interessante estudar soluções para aumentar a quantidade de extrato corante para maximizar o poder corante do produto desenvolvido, assim como estender esta solução a outros corantes baseados em antocianinas, ou outros corantes de carácter hidrofílico e com problemas de estabilidade ao pH.

*Capítulo 5*  
**Referências**

---



## 5. REFERÊNCIAS

- Akhtar, M., Afeisume, E. I., & Khew, S. H. (2014). Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. *Food Hydrocolloids*, *34*, 62–67. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2012.12.025>
- Almeida, T. C. A. (2012). *Avaliação da estabilidade de emulsões concentradas em bebidas*. 121. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Andrade, F. de I., Florindo Guedes, M. I., Pinto Vieira, Í. G., Pereira Mendes, F. N., Salmito Rodrigues, P. A., Costa Maia, C. S., Matos Ribeiro, L. (2014). Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. *Food Chemistry*, *157*, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.100>
- AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. USA: AOAC INTERNATIONAL.:(D. G. W. I. Jr; Ed). , (2016).*
- Baran, A., Goud, V. V., & Das, C. (2019). Microencapsulation of anthocyanin extract from purple rice bran using modified rice starch and its effect on rice dough rheology. *International Journal of Biological Macromolecules*, *124*, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.247>
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, *5*(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Baum, M., Schantz, M., Leick, S., Berg, S., Betz, M., Frank, K., Richling, E. (2014). Is the antioxidative effectiveness of a bilberry extract influenced by encapsulation? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(11), 2301–2307. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6558>
- Bento, W. de A. S., Lima, B. P., & Paim, A. P. S. (2015). Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC. *Food Chemistry*, *183*, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.050>
- Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K., Richling, E., & Kulozik, U. (2012). Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Research International*, *47*(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.01.010>

- Bordignon Jr., C. L., Francescato, V., Nienow, A. A., Calvete, E., & Reginatto, F. H. (2009). Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(1), 183–188. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000100028>
- Brotto, D., Terci, L., & Rossi, V. (2002). Natural pH indicators: Using paper or solution? *Quim. Nova*, 25(4), 684–688. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400026>
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- CODEX. (2018). Codex Alimentarius. *Codex Stan*, 192–1995.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2010). Fennema's Food Chemistry. *CRC Press*, 4 ed.
- David, L., Moldovan, B., Vulcu, A., Olenic, L., Perde-Schrepler, M., Fischer-Fodor, E., Filip, G. A. (2014). Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 767–777. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.08.018>
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O., & Francis, F. J. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.05.093>
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Research International*, 48(2), 478–483. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.05.025>
- Flanigan, P., & Niemeyer, E. D. (2014). Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 164, 518–526.
- Flickr. (2018). elderberry fruit. Retrieved November 25, 2018, from <https://flic.kr/p/zcVZBC>
- Frank, K., Walz, E., Gräf, V., Greiner, R., Köhler, K., & Schuchmann, H. P. (2012).

- Stability of Anthocyanin-Rich W/O/W-Emulsions Designed for Intestinal Release in Gastrointestinal Environment. *Journal of Food Science*, 77(12), 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02982.x>
- Gharehbeiglou, P., Jafari, S. M., Hamishekar, H., Homayouni, A., & Mirzaei, H. (2019). Pectin-whey protein complexes vs. small molecule surfactants for stabilization of double nano-emulsions as novel bioactive delivery systems. *Journal of Food Engineering*, 245(October 2018), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.016>
- Gurak, P. D., Cabral, L. M. C., & Rocha-Leão, M. H. (2013). Production of grape juice powder obtained by freeze-drying after concentration by reverse osmosis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(6), 1011–1017. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013005000008>
- Henrique, P., & Jesus, R. (2008). *Revisão*. 31(5), 1218–1223.
- Herzi, S., Essafi, W., Bellagha, S., & Leal-Calderon, F. (2014). Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441, 489–495. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2013.09.036>
- Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Khaksar, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 582–588. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.09.054>
- Kargar, M., Fayazmanesh, K., Alavi, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2012). Investigation into the potential ability of Pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366(1), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.073>
- Kopanichuk, I. V., Vedenchuk, E. A., Koneva, A. S., & Vanin, A. A. (2018). Structural Properties of Span 80/Tween 80 Reverse Micelles by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B*, 122, 11. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.8b03945>
- Kropat, C., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Boettler, U., Marko, D. (2013). Effect of microformulation on the bioactivity of an anthocyanin-rich bilberry pomace extract (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4873–4881. <https://doi.org/10.1021/jf305180j>

- Lawson, L. B., & Papadopoulos, K. D. (2004). Effects of a phospholipid cosurfactant on external coalescence in water-in-oil-in-water double-emulsion globules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 250(1–3), 337–342. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2004.04.082>
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*, 32(5), 509–518. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.839562>
- MAPA. *Determinação de Lipídios em Leite e Derivados Lácteos pelo Método de Roese-Gottlieb.* , (2013).
- Martins, N., Roriz, C., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Trends in Food Science & Technology Food colorants : Challenges , opportunities and current desires of agro- industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends Food Sci. Technol.*, 52, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>
- Masone, D., & Chanforan, C. (2015). Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational Biology and Chemistry*, 56, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.04.006>
- McClements, D.J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- McClements, David Julian. (2007a). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- McClements, David Julian. (2007b). *Food Emulsions - Principles, Practices and Techniques* (Vol. 67).
- Mladěnka, P., Říha, M., Martin, J., Gorová, B., Matějčík, A., & Spilková, J. (2016). Fruit extracts of 10 varieties of elderberry (*Sambucus nigra* L.) interact differently with iron and copper. *Phytochemistry Letters*, 18, 232–238. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2016.10.025>
- Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., & Łysiak, G. P. (2018). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of Functional Foods*, 40, 377–390. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.11.025>

- Nikolovski, B. G., Ilić, J. D., Sovilj, M. N., Nikolovski, B. G., Ilić, J. D., & Sovilj, M. N. (2016). HOW TO FORMULATE A STABLE AND MONODISPERSE WATER-IN-OIL NANOEMULSION CONTAINING PUMPKIN SEED OIL: THE USE OF MULTIOBJECTIVE OPTIMIZATION. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4), 919–931. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160334s20140140>
- Pereira, J. B., & Garcia-Rojas, E. E. (2015). *Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive components*. (1), 155–162. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140315>
- Pereira, V. A. J., Arruda, I. N. Q., & Stefani, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time e Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.014>
- Pliszka, B. (2017). POLYPHENOLIC CONTENT, ANTIRADICAL ACTIVITY, STABILITY AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF ELDERBERRY (SAMBUCUS NIGRA L.) EXTRACTS. *Acta Scientiarum Polonorum Technol. Aliment*, 16(4), 393–401. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2017.0523>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
- Rossi, A. V., & Shimamoto, G. G. (2010). Antocianinas e gelo seco para visualizar equilíbrios ácido/base numa abordagem contextualizada. *Educació Química EduQ*, (7), 31–36.
- Santin, N. C. (2006). *Características químicas de vinhos cabernet sauvignon produzidos em diferentes regiões do Brasil*.
- Santos, F. R. A. (2011). *Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações*. 68.
- Senica, M., Stampar, F., Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2016). Processed elderberry (*Sambucus nigra* L.) products: A beneficial or harmful food alternative? *LWT - Food Science and Technology*, 72, 182–188. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.04.056>
- Sikorski, Z. E. (2006). *Chemical and Functional Properties of Food Components, Third Edition* (Z. Sikorski, Ed.). <https://doi.org/10.1201/9781420009613>

- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., & Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 538–544. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.08.039>
- Silva, R. F. R. (2017). *Propriedades corantes e bioativas de sumo de sabugueiro : aplicação alimentar e estabilidade cromática*.
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2016). Smeriglio, Antonella, . Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research Vol 30 Pp, 2016 SRC*(April), 1265–1286.
- Sorita, G. D. (2018). *Microencapsulação da curcumina em partículas lipídicas sólidas visando aplicações alimentares sujeitas a processamento térmico*.
- Sun, C., Gunasekaran, S., & Richards, M. P. (2007). Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, *21*(4), 555–564. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2006.06.003>
- Swier, T. L., & Chauhan, K. (2019). Stability studies of enzyme aided anthocyanin extracts from *Prunus nepalensis* L. *LWT*, *102*, 181–189. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.12.016>
- Tang, B., Xi, C., Zou, Y., Wang, G., Li, X., Zhang, L., Zhang, J. (2014). Simultaneous determination of 16 synthetic colorants in hotpot condiment by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *960*, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.026>
- Vargas, E. F. de, Jablonski, A., Flôres, S. H., & Rios, A. de O. (2017). Obtention of Natural Dyes from Industrial Blackberry Pulp Residues (*Rubus sp*). *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.12777>
- Velmurugan, P., Kamala-Kannan, S., Balachandar, V., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J. C., & Oh, B. T. (2010). Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, *79*(2), 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.058>
- Villacrez, J. L., Carriazo, J. G., & Osorio, C. (2014). Microencapsulation of Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) Aqueous Extract by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(5), 1445–1456. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1172-y>

- Wang, D., Ma, Y., Zhang, C., & Zhao, X. (2014). Thermal characterization of the anthocyanins from black soybean (*Glycine max* L.) exposed to thermogravimetry. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 645–649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.007>
- Zanatta, V. (2014). *Uso de Membranas Cerâmicas Microporosas na Produção de Emulsões óleo de Girassol em Água* (Vol. 8). Universidade Federal de Santa Catarina.
- Zhang, J., & Reineccius, G. A. (2016). Preparation and stability of W/O/W emulsions containing sucrose as weighting agent. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(1), 51–56. <https://doi.org/10.1002/ffj.3269>
- Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., & Sun, J. (2011). Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *Journal of Food Engineering*, 104(1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.11.031>
- Zuge, L. C. B. (2012). *Estudo da Inversão Catastrófica e Transicional de Emulsões de Óleo de Soja com Diferentes Tensoativos*. Universidade Federal do Paraná.

---

*Capítulo 6*  
**Apêndices**

---



## 6. APÊNDICES

## Apêndice A

<b>Tabela 1. Testes para produção da emulsão dupla</b>				
<b>Razão (A1/O)</b>	<b>Span 80 (% m/m)</b>	<b>Emulsão (A1/O/A2 Razão 0.25) Tween 80 (% m/m)</b>	<b>Vel. Agitação (rpm) (A1/O)</b>	<b>Características das emulsões</b>
0.1	1	1	500 rpm (agitador de pás)/10 min	Houve separação de fase na emulsão primária e não formou emulsão dupla
0.1	3	3	500 rpm (agitador de pás)/ 10 min	Houve separação de fase na emulsão primária e não formou emulsão dupla
0.4	3	3	500 rpm (agitador de pás)/ 10 min	Houve separação de fase na emulsão primária e não formou emulsão dupla
0.4	4	4	500 rpm (agitador de pás)/ 10 min	Houve separação de fase na emulsão primária e não formou emulsão dupla
0.4	5	5	500 rpm (agitador de pás)/ 10 min	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
0.4	5	2	500 rpm (agitador de pás)/ 10 min	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
0.4	5	5	(Dissolução a 1000 rpm/15 min)	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
0.4	5	3	(Pás 500 rpm/10 min)	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
0.4	5	3	(Turrax 8000 rpm/2 min)	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla

<b>0.4</b>	5.6% do total da emulsão. Sendo 50% dos 5.6% de Tween e 50% de Span 80	5	600 rpm agitador magnético/ 10 min	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
<b>0.4</b>	5.6% do total da emulsão. Sendo 50% dos 5.6% de Tween e 50% de Span 80	3	600 rpm agitador magnético/ 10 min	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
<b>0.4</b>	5.6% do total da emulsão. Sendo 50% dos 5.6% de Tween e 50% de Span 80	4	Turrax: 8000 rpm / 2 min	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
<b>0.1</b>	5.6% do total da emulsão. Sendo 50% dos 5.6% de Tween e 50% de Span 80	4	Turrax: 8000 rpm / 2 min	Não houve separação de fase na primária, mas não formou emulsão dupla
<b>40/60</b>	5.6% do total da emulsão. Sendo 50% dos 5.6% de Tween e 50% de Span	Não foi realizado emulsão dupla	Turrax 11000 rpm por 3 min e então 6 ciclos no Homogeneizador	Não houve separação de fase na emulsão primária, porém no microscópio pode perceber a aglomeração das partículas
<b>40/60</b>	5.6% do total da emulsão. Sendo 20% dos 5.6% de Tween e 80% de Span	Não foi realizado emulsão dupla	Turrax 11000 rpm por 3 min e então 6 ciclos no Homogeneizador	Não houve separação de fase na emulsão e no microscópio ficou adequado
<b>Razão (A1/O)</b>	<b>PGPR (% m/m)</b>	<b>Emulsão (A1/O/A2 – Razão 0.25) Tween 80 e Goma Arábica (% m/m)</b>	<b>Vel. Agitação (rpm) (A1/O)</b>	<b>Características das emulsões</b>
<b>40/60</b>	5	4 % de Tween 80	20000 rpm/5 min	Obteve dupla emulsão, porém, logo se destabilizou
<b>40/60</b>	5	5% de Tween 80	20000 rpm/5 min	Obteve dupla emulsão, porém, logo se destabilizou
<b>40/60**</b>	5	<b>3% de Tween 80 e 15% de goma arábica</b>	<b>20000 rpm/5 min</b>	<b>Obteve dupla emulsão e permaneceu estável</b>
<b>40/60</b>	5	15% de Goma arábica	20000 rpm/5 min	Obteve dupla emulsão, porém, logo se destabilizou

40/60\*\* emulsão utilizada na produção das emulsões duplas.

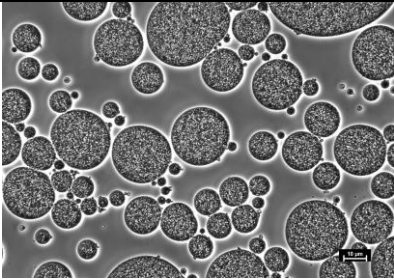
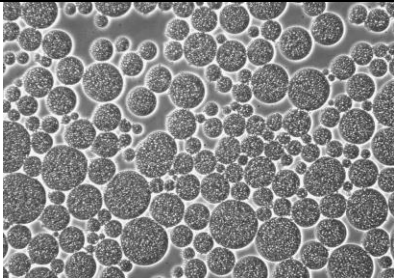
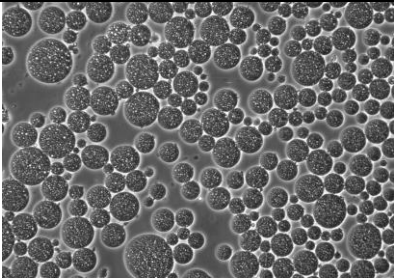
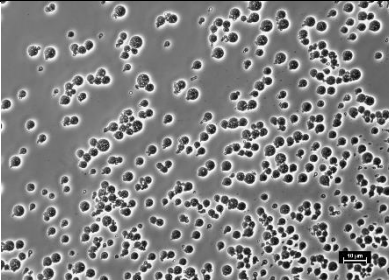
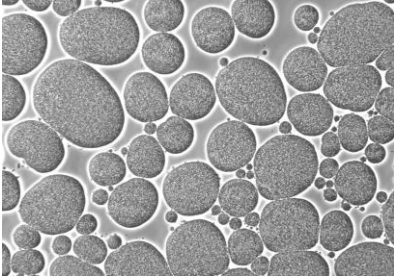
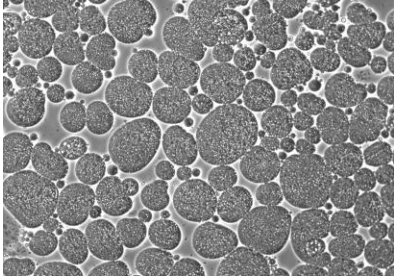
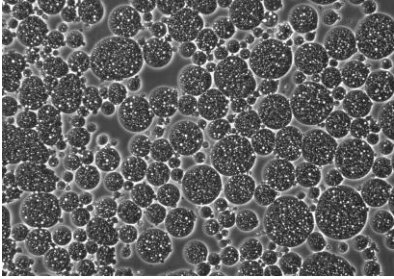
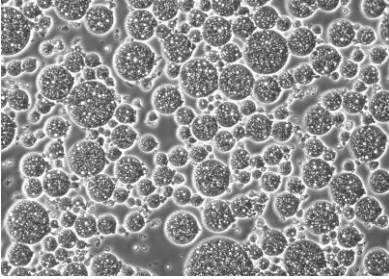
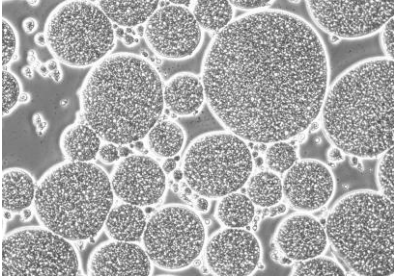
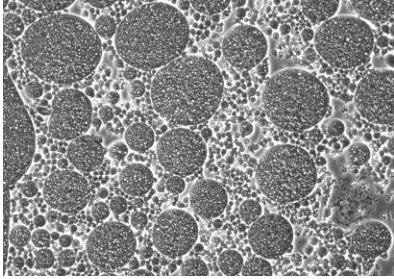
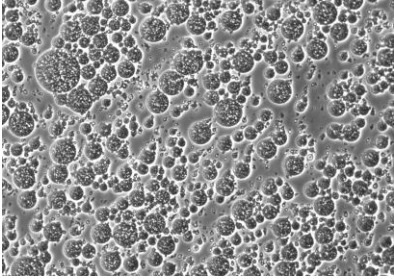
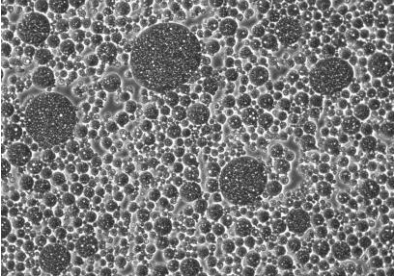
Apêndice B



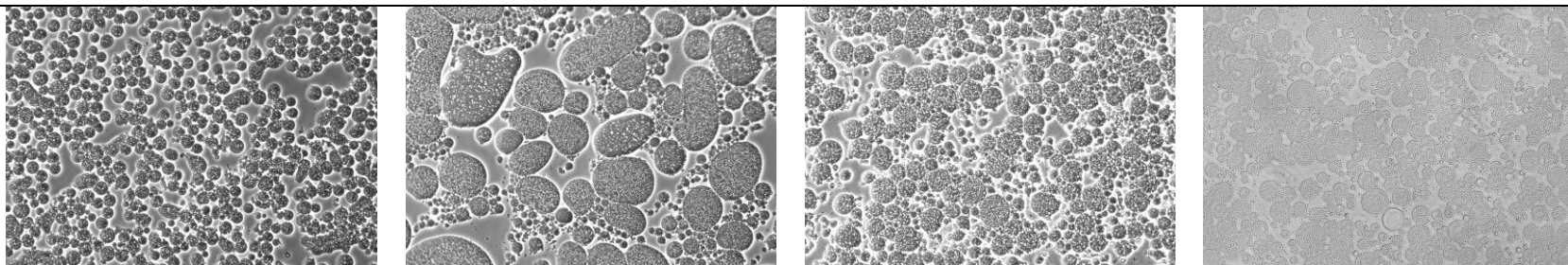
Figura 1. Alguns dos testes preliminares

Apêndice C

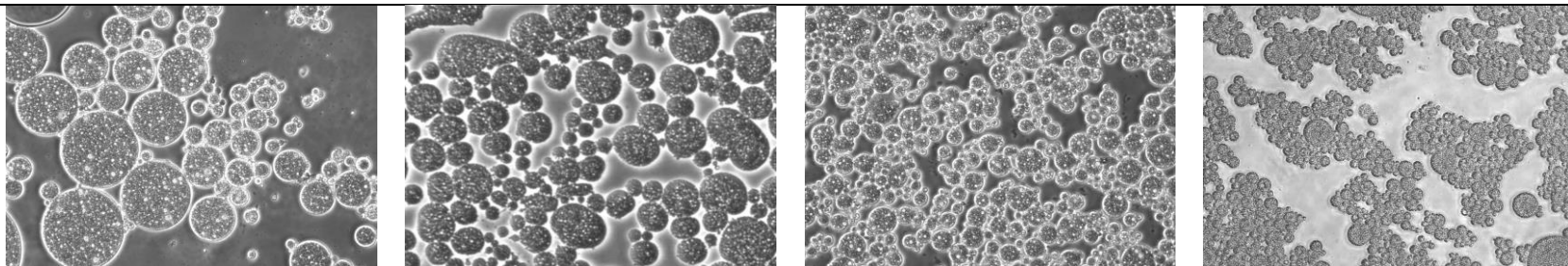
Tabela 1. Registro completo de imagens por microscópio óptico das emulsões duplas (Ampliação 400X).

Amostra	(20/80)	(30/70)	(40/60)	(50/50)
Tempo (dias)				
t0				
t4				
t5				

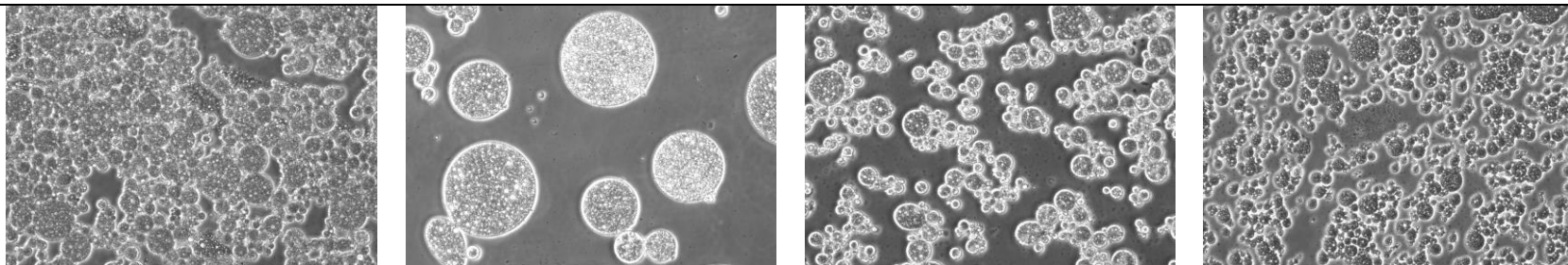
t6



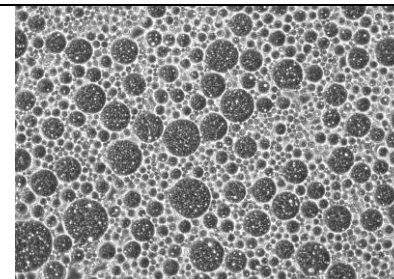
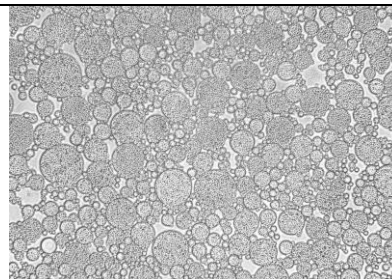
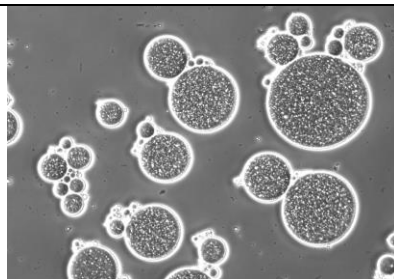
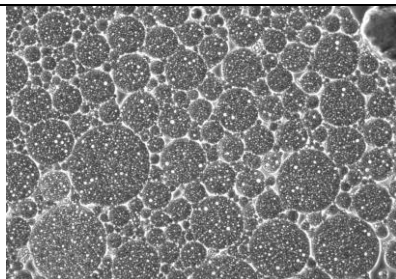
t8



t11



t19



t26

Não foi possível registrar, pois todas as gotículas estavam agregadas

Não foi possível registrar, pois todas as gotículas estavam agregadas

