

ANDRÉA ALVES SIMIQUELI

**DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES A/O/A PARA O CARREAMENTO DE
FeSO₄ E SEU IMPACTO NA QUALIDADE SENSORIAL DE ALIMENTOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

S589d
2017 Simiqueli, Andréa Alves, 1987-
Desenvolvimento de emulsões A/O/A para o carreamento
de FeSO₄ e seu impacto na qualidade sensorial de alimentos /
Andréa Alves Simiqueli. – Viçosa, MG, 2017.
xiv, 70f. ; 29 cm.

Orientador: Valéria Paula Rodrigues Minim.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Emulsões. 3. Alimentos -
Teor mineral. 4. Sulfato ferroso. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 664

ANDRÉA ALVES SIMIQUELI

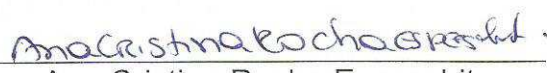
**DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES A/O/A PARA O CARREAMENTO DE
FeSO₄ E SEU IMPACTO NA QUALIDADE SENSORIAL DE ALIMENTOS**

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

APROVADA: 06 de outubro de 2017.




Márcia Cristina Teixeira R. Vidigal



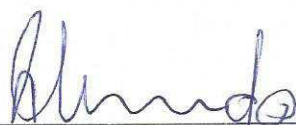
Ana Cristina Rocha Espeschit



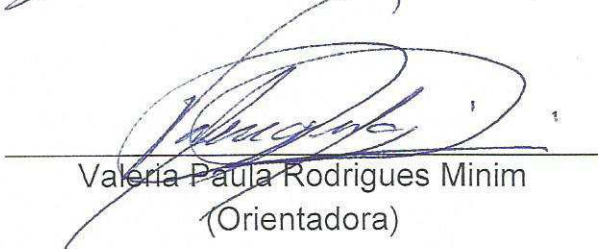
Eduardo Basílio de Oliveira
(Coorientador)



Luis Antonio Minim
(Coorientador)



Tarcísio Lima Filho
(Coorientador)



Valéria Paula Rodrigues Minim
(Orientadora)

“Ainda que eu falasse a língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor, eu nada seria.”
Renato Russo

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me ilumina e me conduz.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela formação acadêmica.

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

À professora Valéria Paula Rodrigues Minim, pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos que contribuíram para a minha formação. Obrigada pela oportunidade de trabalhar na sua equipe.

Aos coorientadores Eduardo Basílio de Oliveira, Luis Antonio Minim e Tarcísio Lima Filho pelos conselhos, contribuições, dedicação e ensinamentos que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

À profa. e amiga Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal, pelas contribuições e força durante esta jornada

À profa. Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal e profa. Ana Cristina Rocha Espeschit pela participação na banca de defesa de tese.

À equipe do laboratório, Mila, Ludmila, Francine, Thamiris, Christiane, Felipe, Isabele, Petiara, Valéria e Lohanna pela amizade e por terem tornado esta fase mais feliz.

Às estudantes da graduação, Isabele, Petiara, Valéria e Lohanna pelo apoio fundamental no desenvolvimento do experimento.

À equipe da Universidade Federal de Ouro Preto, prof. Lucas Deleon, Patrícia e Maria Helena.

A todos os funcionários do DTA que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais amados, Sebastião e Gislene, pelo amor, dedicação, orações e por terem me incentivado a nunca desistir dos meus sonhos.

À minha irmã Débora, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. À minha irmã Amanda, pelo carinho, amizade e cumplicidade. Ao meu irmão Victor pelo amor, força e amizade. Amo vocês!

Aos meus lindos sobrinhos, Thiago Henrique e Cauã, por tornarem a vida mais alegre.

Ao meu segundo pai, tio Wilson, que sempre acreditou no meu potencial. Serei eternamente grata. Amo você! Saudades!

Aos meus amados avós, Toninho e Ondina, pelo amor, carinho e cuidados. Mesmo de longe sempre me deram força e coragem para vencer todos os desafios. Quantas saudades!

Às minhas queridas tias, Gisele, Gilda e Léia, pela amizade, confiança e força sempre depositada. Ao tio Cândido, pelo apoio e carinho. Sem vocês esta conquista seria ainda mais difícil.

Aos meus primos queridos, Felipe, Eduardo, Karen, Ana Carolina, Marco Antônio, Laís e Iara, por estarem sempre “torcendo” pela minha vitória.

À minha madrastra Elizete, pela amizade e compreensão.

Aos meus amigos e trabalhadores do grupo ACEAK, por me proporcionarem um ambiente tranquilo e sereno, o qual me deu força e equilíbrio para seguir em frente.

E a todos que de alguma forma contribuíram e “vibraram” por esta conquista. Os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

ANDRÉA ALVES SIMIQUELI, filha de Sebastião Simiqueli e Gislene de Oliveira Alves, nasceu em 14 de abril de 1987, em Carangola, Minas Gerais.

Iniciou seus estudos na escola municipal Interventor Júlio de Carvalho, Espera Feliz/MG, em 1994. Em 1998 estudou na Escola Estadual Altivo Leopoldino de Souza, onde concluiu o ensino médio em 2004.

Em março de 2007 ingressou na Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG. Em 2009 transferiu-se para a Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa – MG, onde graduou-se em Engenharia de Alimentos em maio de 2013.

Em abril de 2013, iniciou o curso de Mestrado no programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa – MG, concluindo em julho de 2014.

Em agosto de 2014, iniciou o curso de Doutorado no programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa – MG, concluindo em outubro de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
Capítulo 1	7
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1 <i>Materiais</i>	9
2.2 <i>Delineamento experimental</i>	9
2.3 <i>Procedimento para a incorporação de FeSO₄: emulsão dupla</i>	11
2.3.1 <i>Preparo das emulsões</i>	11
2.4 <i>Análise instrumental dos sistemas emulsionados</i>	13
2.4.1 <i>Potencial zeta</i>	13
2.4.2 <i>Diâmetro médio das gotículas de óleo e índice de polidispersidade das emulsões</i>	13
2.4.3 <i>Microestrutura</i>	13
2.4.4 <i>Propriedades reológicas</i>	13
2.4.5 <i>Análise de Cor</i>	14
2.4.6 <i>Eficiência de aprisionamento e estabilidade cinética da localização do Fe²⁺</i>	14
2.4.7 <i>Estabilidade macroscópica</i>	15
2.4.8 <i>Análise estatística</i>	16
2.5 <i>Avaliação sensorial das emulsões duplas</i>	16
2.5.1 <i>Teste de ordenação: distribuição do FeSO₄</i>	17
2.5.2 <i>Teste de ordenação: proporção das fases aquosa interna e externa</i>	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
3.1 <i>Caracterização física das emulsões primárias (A_i/O)</i>	18
3.2 <i>Caracterização física das emulsões duplas (A_i/O/A_e)</i>	19
3.2.1 <i>Potencial zeta</i>	19

3.2.2 Diâmetro médio das gotículas de óleo e índice de polidispersidade das emulsões.....	21
3.2.3 Microestrutura	24
3.2.4 Propriedades reológicas.....	27
3.2.5 Análise de cor.....	31
3.2.6 Eficiência de aprisionamento e estabilidade cinética da localização do Fe^{2+}	33
3.2.6 Estabilidade macroscópica	35
3.3 Análise sensorial das emulsões duplas ($A/O/A_e$).....	36
3.3.1 Teste de ordenação: localização do $FeSO_4$	36
3.3.2 Teste de ordenação: proporção de fase aquosa interna e externa	38
4. CONCLUSÃO.....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
MATERIAL SUPLEMENTAR	48
Capítulo 2	50
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1 Materiais.....	52
2.1.1 Preparo das emulsões.....	53
2.1.2 Preparo do flan	55
2.2 Limiar de aceitação comprometida (LAC) e limiar de rejeição hedônica (LRH) 55	
3. RESULTADOS	58
3.1 Limiar de aceitação comprometida (LAC) e limiar de rejeição hedônica (LRH) 58	
4. DISCUSSÃO.....	61
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
CONCLUSÃO GERAL.....	69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1** - Combinações dos níveis de proporção entre as fases aquosas (interna e externa) e da distribuição do FeSO_4 e suas respectivas codificações.....10
- Tabela 1.2** - Modelos de regressão para o potencial ζ (mV) das gotículas de óleo das emulsões duplas, em função da proporção de fase aquosa interna (A_i), seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).....20
- Tabela 1.3** - Diâmetro médio (d, μm) e índice de polidispersidade (PDI) das gotículas de óleo das emulsões duplas em estudo (A_{i10} - A_{e20}) e das emulsões controle ($C_{1/x}$ e C_2), no tempo de armazenamento de 1 d.....21
- Tabela 1.4** - Modelos de regressão para o diâmetro médio (μm) das gotículas de óleo das emulsões, em função da proporção de fase aquosa interna (A_i) e do tempo de armazenamento (t), em dias, seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).....23
- Tabela 1.5** - Parâmetros médios do modelo de Ostwald-de-Waele utilizados para a caracterização reológica das emulsões duplas e simples (controle C_2) e valores médios da viscosidade aparente (η_{100}), a 100 s^{-1}27
- Tabela 1.6** - Modelos de regressão para a viscosidade aparente (η_{100}) em função do tempo de armazenamento (t), em dias, seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).....29
- Tabela 1.7** - Medidas de cor (L^* , h^* e C^*) das emulsões duplas e dos grupos de emulsão controle (C_1 e C_2).....32
- Tabela 1.8** - Significância das somas de ordens para a cor branca e sabor metálico das emulsões duplas carreadoras de FeSO_4 , em diferentes localizações no sistema.....36
- Tabela 1.9** - Significância das somas de ordens para a cor branca e sabor metálico das emulsões duplas contendo diferentes proporções de fase aquosa interna (%) e para a emulsão simples (controle C_2).....38
- Tabela 1.10** - Viscosidade absoluta média (μ) das emulsões primárias (A_i/O), a 25°C .48
- Tabela 2.1** - Modelos de regressão para os valores de t calculados (Y_1) em função da concentração de FeSO_4 (X, mg/100g de flan de morango) para cada tipo de ensaio experimental, seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).....58
- Tabela 2.2** - Modelos de regressão para as notas hedônicas médias (Y_2) em função da concentração de FeSO_4 (X, mg/100g de flan de morango) para cada tipo de ensaio experimental, seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).....60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Representação das emulsões carreadoras de Fe^{2+} e dos tratamentos controles.....10
- Figura 1.2** - Fotomicrografias com aumento de 1000 x das emulsões primárias (A_i/O), apresentando uma relação de fração aquosa e oleosa de 1 : 3 ($P:G_{10}$); 1 : 2 ($P:G_{15}$) e 1 : 1,5 ($P:G_{20}$), no tempo de armazenamento de 1 d.....18
- Figura 1.3** - Potencial zeta (mV) das gotículas de óleo das emulsões dupla, no tempo de armazenamento de 1 d.....19
- Figura 1.4** - Distribuição do diâmetro médio (μm) das gotículas oleosas das emulsões duplas, referente ao tratamento A_iA_e15 e das emulsões controle ($C_{1/15}$ e C_2), ao longo do tempo de armazenamento, em dias (d).....22
- Figura 1.5** – Fotomicrografias com aumento de 400 x das emulsões $A_i/O/A_e$ (A) e O/A_e (B) obtidas por microscopia de luz, no tempo de armazenamento de 1 d.....25
- Figura 1.6** - Fotomicrografias com aumento de 400 x das emulsões $A_i/O/A_e$ e das emulsões controles ($C_{1/x}$), obtidas por microscopia de luz, no tempo de armazenamento de 1 d.....26
- Figura 1.7** Valores médios dos módulos de viscoelasticidade (G' e G''), e a $\text{tg}(\delta)$, em função da frequência (f, Hz) das emulsões duplas e emulsão simples (controle C_2), a 25 °C.....30
- Figura 1.8** - Eficiência de aprisionamento (EA) e estabilidade cinética (EC) ao longo do tempo de armazenamento (d), expressos em porcentagem de Fe^{2+} presente na fase aquosa interna (A_i).....34
- Figura 1.9** - Fotografia das emulsões duplas contendo uma proporção de fase aquosa interna e externa de 15/55% (G_{15}) e da emulsão simples (C_2).....35
- Figura 1.10** - Reogramas com valores médios de tensão de cisalhamento (τ , Pa) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) para as emulsões primárias (A_i/O) a 25 °C.....48
- Figura 1.11** - Reogramas com valores médios de tensão de cisalhamento (τ , Pa) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) para as emulsões $A_i/O/A_e$ e O/A_e (controle C_2), a 25 °C.....49
- Figura 1.12** - Viscosidade aparente (η_{100}), a 100 s^{-1} , em função do tempo de armazenamento para emulsões contendo FeSO_4 na fase aquosa externa (A_iA_e e A_e).....49

Figura 2.1 - Fluxograma do procedimento de preparo das emulsões duplas.....	54
Figura 2.2 - Representação esquemática dos sistemas emulsionados e da solução de FeSO ₄ inserida no flan sabor morango, em cada ensaio experimental.....	56
Figura 2.3 - Valores de t calculados e notas hedônicas médias em função das concentrações de FeSO ₄ das amostras estímulo referente a cada sistema.....	59

RESUMO

SIMIQUELI, Andréa Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2017. **Desenvolvimento de emulsões A/O/A para o carregamento de FeSO₄ e seu impacto na qualidade sensorial de alimentos.** Orientadora: Valéria Paula Rodrigues Minim. Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira, Luis Antonio Minim e Tarcísio Lima Filho.

Emulsões duplas (A/O/A) foram desenvolvidas como veículo carreador de FeSO₄, a fim de possibilitar a fortificação de alimentos, sem acarretar na perda da qualidade sensorial. A proporção de fase aquosa interna e a inserção de FeSO₄ em diferentes localizações no sistema foram avaliados (até 30 dias de armazenamento), com base nas características físicas (potencial zeta, diâmetro médio, polidispersidade, microestrutura, propriedades reológicas, cor, eficiência de aprisionamento e estabilidade cinética da localização do Fe²⁺ e índice de cremação), podendo assim, estimar a estabilidade cinética dos sistemas. A percepção sensorial das diferentes emulsões A/O/A também foi avaliada em relação à intensidade da cor branca e do sabor metálico. As emulsões em estudo apresentaram baixo índice de polidispersidade e distribuições de tamanho unimodais. Todos os sistemas obtiveram potencial zeta superior a 20,9 mV (em módulo). As emulsões foram caracterizadas como fluido não-newtoniano (pseudoplástico). Além disso, apresentaram caráter predominantemente elástico, o qual tendeu a reduzir o movimento browniano das gotículas, favorecendo na estabilidade cinética do sistema. As emulsões apresentaram eficiência de aprisionamento superior a 89%, e um índice de cremação tendendo a 0%, durante 30 dias de armazenamento. As diferentes possibilidades da emulsão A/O/A em carrear FeSO₄ acarretaram em diferença na intensidade da cor branca e do sabor metálico. A inserção de FeSO₄ na fase aquosa interna acarretou na maior intensidade do sabor metálico. Já os sistemas contendo FeSO₄ somente na fase aquosa externa propiciou reduzir ou até mesmo “mascarar” a percepção do sabor metálico. A proporção de fase aquosa não acarretou em diferença sensorial perceptível. Com base na metodologia dos limiares hedônicos, verificou-se que as diferentes distribuições do FeSO₄ também influenciou na aceitabilidade sensorial da matriz alimentar em estudo (sobremesa láctea do tipo flan sabor morango) adicionada de emulsão carreadora de FeSO₄. A inserção de FeSO₄ na fase aquosa interna da emulsão A_i/O/A_e realçou a percepção sensorial das alterações indesejáveis no

flan, comprometendo a aceitabilidade sensorial da sobremesa láctea. Já a inserção do estímulo na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$ proporcionou a adição de uma maior concentração de $FeSO_4$, sem comprometer na aceitabilidade do flan e resultar na rejeição sensorial pelos consumidores, comparado com os demais ensaios avaliados. Portanto, concluiu-se que a emulsão $A/O/A$ apresenta potencial de aplicação no setor de fortificação de alimentos com $FeSO_4$, quando veiculado na fase aquosa externa do sistema, propiciando minimizar a perda da qualidade sensorial do produto.

ABSTRACT

SIMIQUELI, Andréa Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2017. **Development of W/O/W emulsions for carrying FeSO₄ and its impact of the sensory quality of foods.** Advisor: Valéria Paula Rodrigues Minim. Co-advisors: Eduardo Basílio de Oliveira, Luis Antonio Minim and Tarcísio Lima Filho.

Double Emulsions (W/O/W) were developed as carrier vehicles of FeSO₄, in order to allow for the fortification of foods without causing sensorial quality losses. The internal aqueous phase ratio and FeSO₄ insertion at different locations in the system were evaluated (up to 30 days of storage) based on the physical characteristics (zeta potential, mean diameter, polydispersity, microstructure, rheological properties, color, trapping efficiency and kinetic stability of the Fe²⁺ and caking index), therefore to estimate the kinetic stability of the systems. Sensorial perception of the different W/O/W emulsions was also evaluated in relation to the white color and metallic taste intensity. The emulsions under study had a low polydispersity index and unimodal size distributions. All systems showed zeta potential greater than 20.9 mV (in module). The emulsions were characterized as non-Newtonian (pseudoplastic) fluids. Furthermore, they presented predominantly elastic character, which tended to reduce the Brownian motion of the droplets, favoring the kinetic stability of the system. The emulsions presented trap efficiency greater than 89%, and a caking index tending toward 0% during 30 days of storage. The different possibilities of the W/O/W emulsion to carry FeSO₄ resulted in a difference in white color and metallic taste intensity. Insertion of FeSO₄ into the internal aqueous phase resulted in the highest metallic taste intensity, while the systems containing FeSO₄ only in the external aqueous phase allowed for reducing or even “masking” the metallic taste perception. The proportion of aqueous phase did not lead to a perceptible sensorial difference. Based on the hedonic thresholds methodology, it was verified that the different distributions of FeSO₄ also influenced sensory acceptability of the food matrix under study (strawberry flan milk-based dessert) when supplemented with the FeSO₄ carrier emulsion. Insertion of FeSO₄ into the internal aqueous phase of the W/O/W emulsion enhanced the sensory perception of undesirable changes in the flan, compromising the sensory acceptability of the milk-based dessert. On the other hand the insertion of the stimulus to the external aqueous phase of the

W/O/W emulsion provided the addition of a higher concentration of FeSO₄, without compromising on the acceptability of the flan and resulting in sensorial rejection by the consumers, compared to the other assays evaluated. Therefore, it was concluded that the W/O/W emulsion system presents potential for application in the food fortification sector with FeSO₄ when it is carried in the external aqueous phase, minimizing the loss of the sensorial quality of the product.

INTRODUÇÃO GERAL

Tecnologias baseadas em conceitos físico-químicos, com potenciais de aplicação na área de desenvolvimento de produtos alimentícios são necessárias para controlar as propriedades funcionais de compostos bioativos, ao serem incorporados nos alimentos. Estas tecnologias devem atuar como veículos carreadores dos compostos, sem acarretar em prejuízo na qualidade sensorial do produto.

Neste contexto, sistemas coloidais do tipo “emulsão dupla”, vêm sendo pesquisado pela comunidade científica, sendo uma das técnicas mais indicadas e viáveis (Muschiolik & Dickinson, 2017). Esses sistemas possibilitam incorporar em sua estrutura (fases interna, intermediária e/ou externa), compostos não-polares e polares, atuando não só como carreadores, mas também como “veículos protetores” (Leal-Calderon et al., 2007; Dickinson, 2011; McClements, 2016).

Emulsão dupla do tipo $A_1/O/A_2$ consiste em gotículas de água (A_1) dispersas dentro de gotículas de óleo (O), que por sua vez são dispersas em uma segunda fase aquosa (A_2) (Bouyer et al., 2012; Muschiolik & Dickinson, 2017). A estruturação física desse tipo de sistema viabiliza a sua aplicação em diversas áreas, como por exemplo, cosméticos, fármacos, agroquímicos, produtos químicos industriais e outros (Sapei et al., 2012). Na indústria de alimentos, um dos principais potenciais de aplicações das emulsões duplas é carrear e controlar a liberação de compostos que apesar de apresentarem atividade biológica desejável ao organismo humano, podem conferir alterações sensoriais desagradáveis ao alimento, como por exemplo, alguns ácidos graxos e minerais (Bonnet et al., 2009; Fang & Bhandari, 2010; Dickinson, 2011). Diante da abordagem apresentada, emulsões duplas podem ser uma alternativa viável para permitir a fortificação de alimentos com sais de ferro, minimizando o risco de conferir um perfil de sabor desagradável para os consumidores.

O ferro é um elemento essencial ao organismo humano. Está envolvido em diversas reações fisiologicamente imprescindíveis, como o transporte de oxigênio (Dallman et al., 1980; Garcia-Casal & Layrisse, 1998). A sua carência está entre as desordens mais recorrentes da população, podendo acarretar em estado de anemia ferropriva (Silva & Mura, 2011). Pesquisas realizadas no ano de 2013 estimaram que o número de pessoas com deficiência de ferro atingia cerca de quatro bilhões. E que a anemia ferropriva acometia mais de dois bilhões de pessoas no mundo, sobretudo em

países que predominam as populações de baixa renda (Grebmer et al., 2014). No Brasil, dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS) evidenciam uma prevalência de anemia de aproximadamente 20,9% (Brasil, 2008).

Dentre as estratégias utilizadas para a prevenção da anemia por deficiência de ferro, encontra-se a fortificação de alimentos. Comparado à suplementação, a fortificação é provavelmente, a solução mais prática, sustentável e rentável, a longo prazo, para controlar a carência de ferro em nível internacional (WHO & FAO, 2006; Laxminarayan et al., 2006). A principal vantagem dessa estratégia é que o consumo destes produtos fortificados não requer a participação ativa dos indivíduos e nem mudança nos seus hábitos alimentares (Tripathi & Platel, 2011).

Na maioria dos casos, a fortificação visando combater a anemia ferropriva é realizada por meio de sais de ferro solúveis, visto que apresentam melhor biodisponibilidade. Entretanto, a adição de sais de ferro ao alimento pode ocasionar alterações sensoriais, principalmente relacionadas à formação de sabores indesejáveis e mudança na coloração do produto, afetando diretamente na aceitabilidade dos mesmos (Hurrell, 2002; Sohi et al., 2004; Pripp et al., 2005).

Desta forma, o procedimento de fortificação de alimentos com sais de ferro distribuídos de forma planejada nas diferentes fases da emulsão dupla, pode ser uma estratégia eficaz na prevenção da anemia ferropriva, sem acarretar na perda considerável da qualidade sensorial do produto.

Entretanto, existe na literatura uma divergência em relação aos potenciais de aplicações das emulsões duplas. Um grupo de pesquisadores relata que sistemas de emulsão dupla podem realçar as características sensoriais relacionadas ao sabor, quando veiculados na fase aquosa interna, logo, podem ser aplicados na redução de compostos (como por exemplo, NaCl, sacarose e edulcorantes) (Lad et al., 2012; Rocha-Selmi et al., 2013a;b; Santos et al., 2014; 2015; Chiu et al., 2015; Oppermann et al., 2016). Um segundo grupo afirma que a incorporação de compostos, na fase aquosa interna, pode “mascarar” as características sensoriais provenientes destes, e que podem ser indesejáveis aos consumidores (Bonnet et al., 2009; Fang & Bhandari, 2010; Dickinson, 2011). Além disso, a literatura científica ainda não elucidou o efeito na percepção sensorial, quando compostos são incorporados somente na fase aquosa externa.

Partindo dessa premissa, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e estudar a estabilidade cinética de emulsões duplas carreadoras de FeSO_4 nas diferentes fases aquosas do sistema, por meio de análises instrumentais de potencial zeta, distribuição de

diâmetro, propriedades reológicas, cor, eficiência de aprisionamento e estabilidade cinética da localização dos cátions Fe^{2+} e índice de cremeação, ao longo de 30 dias de armazenamento, a fim de obter um sistema modelo viável para permitir a inserção de ferro nos alimentos, com potencial de preservar a sua qualidade sensorial. (capítulo 1).

Além disso, objetivou-se determinar, por meio da metodologia dos limiares hedônicos (Lima Filho et al., 2015; 2017), qual a concentração máxima de FeSO_4 pode ser inserida em uma sobremesa láctea do tipo flan sabor morango, utilizando em sua formulação emulsão dupla contendo FeSO_4 distribuído nas diferentes fases aquosas do sistema, sem comprometer a aceitabilidade do flan ou acarretar na rejeição sensorial pelos consumidores (capítulo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bonnet, M.; Cansell, M.; Berkaoui, A.; Ropers, M.H.; Anton, M.; Leal-Calderon, F. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.92–101, 2009.

Boyer, E.; Mekhlouf, G.; Rosilio, V.; Grossiord, J.; Agnely F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*. v. 436, p.359–378, 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. PNDS 2006. *Relatório da pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e da mulher*. Brasília; 2008 [acesso 2008 ago 7]. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/pnds2006>>.

Chiu, N.; Hewson, L; Fisk, I.; Wolf, B. Programmed emulsions for sodium reduction in emulsion based foods. *Food & Function*, v. 6, p. 1428-1434.

Dallman, P.R.; Siimes, M.A.; Stekel, A. Iron deficiency in infancy and childhood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 33, p. 86-118, 1980.

Dickinson, E. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, v.6, p. 1–11, 2011.

Fang, Z.X.; Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols e a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 510-523, 2010.

Garcia-Casal, M.N.; Layrisse M. Absorción de hierro de los alimentos. Papel de la vitamina A. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.48, p. 191-196, 1998.

Grebmer, K.V.; Saltzman, A.; Birol,, E.; Wiesmann, D.; Prasai, N.; Yin, S.; Yohannes, Y.; Menon, P.; Thompson, J.; Sonntag, A. *Global Hunger Index: The Challenge of Hidden Hunger*. Bonn, Washington D. C. and Dublin: Welthungerhilfe, International Food Policy Research Institute and Concer Worldwide, v.1, 2014.

Hurrell, R.F. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutrition Reviews*, v. 60, p.7–15, 2002.

Lad, M.; Hewson, L.; Wolf, B. Enhancing saltiness in emulsion based foods. *Flavour*. p.1-13, 2012.

Laxminarayan, R.; Mills, A.J.; Breman, J.G. Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project. *Lancet*, v. 367, p. 1193–1208, 2006.

Leal-Calderon, F.; Thivilliers, F.; Schmitt, V. Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v. 12, n. 4-5, p. 206-212, 2007.

Lima Filho, T.; Minim, V.P.R.; Silva, R.C.S.N.; Della Lucia, S.M.; Minim, L.A. Methodology for determination of two new sensory thresholds: Compromised acceptance threshold and rejection threshold. *Food Research International*, v.76, p. 561–566, 2015.

Lima Filho, T.; Della Lucia, S.M.; Minim, L.A.; Silva, R.C.S.N.; Silva, A.N.; Minim, V.P.R. Validation of the hedonic threshold methodology in determining the compromised acceptance threshold. *Journal of Sensory Studies*, v. 01, p.e12255, 2017.

McClements, D.J. *Food emulsions: principles, practice and techniques*. 3 rd.ed. CRC Press, 2016.

Muschiolik, G., Dickinson, E. Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.16, p. 532-555, 2017.

Oppermann, A.K.L.; Piqueras-Fiszman, B.; de Graaf, C.; Scholten, E.; Stieger, M. Descriptive sensory profiling of double emulsions with gelled and non-gelled inner water phase. *Food Research International*, v.85, p. 215–223, 2016.

Pripp, A.H.; Isaksson, T.; Stepaniak, L.; Sorhaug, T.; Ardo, Y. Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science. *Trends in Food Science and Technology*, v. 16, p. 484–494, 2005.

Rocha-Selmi, G.A., Theodoro, A.C., Thomazini, M., Bolini, H.M.A., Favaro-Trindade, C.S. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. *Journal Food Engineering*, v. 119, p.28–32, 2013a.

Rocha-Selmi, G.A., Bozza, F.T., Thomazini, M., Bolini, H.M.A., Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. *Food Chemistry*, v.139, p.72–79, 2013b.

Santos, M.G., Carpinteiro, D.A., Thomazini, M., Rocha-Selmi, G.A., Cruz, A., Rodrigues, C.E.C., Favaro-Trindade, C.S. Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by complex coacervation and microcapsule application in chewing gum. *Food Research International*, v. 66, p.454–462, 2014.

Sapei, L.; Naqvi, M.A.; Rousseau, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 316–323, 2012.

Silva, S.M.C.; Mura, J.P. *Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia*. São Paulo, p. 107-134, 2011.

Sohi, H.; Sultana, Y.; Khar, R.k. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches. *Drug Devevelopment and Industrial Pharmacy*, v. 30, p. 429–48, 2004.

Tripathi, B., Platel, K. Iron fortification of finger millet (*Eleusine coracana*) flour with EDTA and folic acid as co-fortificants. *Food Chemistry*, v.126, p.537-542, 2011.

WHO e FAO. *Guidelines on Food Fortification with Micronutrients*. Eds. Allen L, de Benoist B, Dary O, Hurrell R. Geneva, WHO, 2006.

Emulsões A/O/A aplicadas no carreamento de FeSO₄: características físicas e sensoriais

1. INTRODUÇÃO

A demanda no mercado por produtos alimentícios com propriedades biológicas, adicionadas ao papel primário de nutrir, sem acarretar na perda da aceitabilidade sensorial, é um grande desafio e oportunidade para implementar as tecnologias emergentes que possuem a capacidade de atuarem como carreadores de compostos bioativos. Dentre as principais tecnologias, o sistema emulsionado do tipo água em óleo em água (A/O/A), conhecido como emulsão dupla, continua sendo cada vez mais pesquisado pela comunidade científica, sendo uma das técnicas mais indicadas e viáveis tecnologicamente (Muschiolik & Dickinson, 2017). Este sistema possibilita incorporar na sua estrutura (fases interna, intermediária e/ou externa), compostos não-polares e polares, atuando como veículos carreadores (Leal-Calderon et al., 2007; Dickinson, 2011; McClements, 2016).

Emulsão dupla do tipo $A_1/O/A_2$ consiste em gotículas de água (A_1) dispersas dentro de gotículas de óleo (O), os quais são dispersos numa segunda solução aquosa (A_2) (Bouyer et al., 2012; Muschiolik & Dickinson, 2017). A estruturação física deste sistema possibilita um amplo potencial de aplicação no setor de desenvolvimento de novos produtos. Como por exemplo, na redução do teor de gordura do alimento, mediante a substituição da emulsão simples convencional (O/A) pela emulsão A/O/A. Além disso, podem ser aplicados no revestimento e proteção de compostos biosensíveis, e para “mascarar” atributos sensoriais provenientes de alguns compostos, como ácidos graxos e minerais. (Giroux et al., 2013; Aditya et al., 2015; Berendsen et al., 2015; Hemández-Marin et al., 2016; Eslami et al., 2017).

Porém, a capacidade que uma emulsão dupla possui de servir como suporte de revestimento, depende da sua estabilidade cinética. Embora, diversos estudos têm sido realizados visando otimizar o preparo e a estabilidade cinética de sistemas emulsionados, a fim de proporcionar um meio carreador estável durante a vida útil do

produto, novas pesquisas são necessárias para avaliar as diferentes possibilidades do sistema em veicular um composto bioativo e a sua potencialidade em “mascarar” as alterações sensoriais desagradáveis, ao ser incorporado em uma matriz alimentar (Sapei et al., 2012; Cofrades et al., 2013; Delamplé et al., 2014; Aditya et al., 2015 e Giroux et al., 2016; Muschiolik & Dickinson, 2017).

Neste sentido, a emulsão A/O/A pode ser uma tecnologia viável para permitir a fortificação de alimentos com sais de ferro, de forma a minimizar o perfil de sabor desagradável aos consumidores.

O ferro é um elemento essencial ao organismo humano, está envolvido em diversas reações biologicamente importantes para a função celular e transporte de oxigênio (Dallman et al., 1980; Garcia-Casal & Layrisse, 1998). A deficiência de ferro é um problema nutricional que atinge cerca de quatro bilhões de indivíduos no mundo, podendo acarretar em estado de anemia ferropriva (Silva & Mura, 2011; Grebmer et al., 2014).

A técnica da fortificação, quando aplicada em alimentos consumidos regularmente, pode ser uma alternativa vantajosa para a manutenção da homeostase do ferro no organismo, e conseqüentemente, na prevenção da anemia ferropriva. Desta forma, o procedimento de fortificação de alimentos com ferro através do sistema de emulsão dupla, como veículo carreador, pode ser uma prática eficaz para permitir a adição de sais de ferro ao alimento, sem acarretar em alterações sensoriais desagradáveis e perceptíveis aos consumidores, ocasionando a rejeição do produto.

Entretanto, existe na literatura uma divergência em relação aos potenciais de aplicações das emulsões duplas. Um grupo de pesquisadores relata que sistemas de emulsão dupla podem realçar as características sensoriais relacionadas ao sabor, quando veiculados na fase aquosa interna, logo, podem ser aplicados na redução de compostos (como por exemplo, NaCl, sacarose e edulcorantes) (Lad et al., 2012; Rocha-Selmi et al., 2013a;b; Santos et al., 2014; 2015; Chiu et al., 2015; Oppermann et al., 2016). Um segundo grupo afirma que a incorporação de compostos, na fase aquosa interna, pode “mascarar” as características sensoriais provenientes destes, e que podem ser indesejáveis aos consumidores (Bonnet et al., 2009; Fang & Bhandari, 2010; Dickinson, 2011).

Além disso, a literatura científica ainda não elucidou o efeito na percepção sensorial, quando compostos são incorporados somente na fase aquosa externa. Diante das indagações apresentadas, o presente trabalho teve como objetivo incorporar FeSO_4

em diferentes localizações na emulsão A/O/A, com o intuito de avaliar a sua potencialidade em "mascarar" a percepção de sabores indesejáveis do sal de ferro, e evitar alterações nas características sensoriais do alimento fortificado. A estabilidade cinética também foi avaliada, a fim de verificar a capacidade que o sistema de emulsão A/O/A apresenta como veículo carreador de compostos bioativos, especificamente FeSO_4 .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 *Materiais*

O sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi adquirido da Sigma-Aldrich. O emulsificante ésteres de poliglicerol de ácido polirricinoleico (PGPR) foi doado pela empresa Granolab/Granotec. Tween 80 (Sigma Aldrich, > 58% ácido oléico, CMC 0,012 mM (20-25 °C), BHL 15,0). Os polímeros goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*, < 1% de cinzas) e gelatina (pele de porco, Tipo A, Bloom - 300) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais produtos químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas em água deionizada (Bedford, EUA). A fração oleosa foi composta por óleo de girassol comprado em um supermercado local (marca Sinhá, tipo 1).

2.2 *Delineamento experimental*

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas um fatorial 3^2 , e na subparcela o tempo de armazenamento (1, 7, 15 e 30 dias). Os fatores avaliados foram diferentes proporções de fase aquosa interna e externa, A_i/A_e (Y_1) e distribuições do Fe^{2+} nas emulsões duplas (Y_2). Para este estudo considerou-se dois grupos de tratamentos controle. O primeiro foi formado pela emulsão A/O/A sem adição de FeSO_4 e o segundo grupo pela emulsão O/A com adição de FeSO_4 na fase contínua. A concentração de fase oleosa foi mantida constante em todos os tratamentos (30%, m/m).

As combinações dos níveis de proporção entre as fases aquosa interna e externa e da distribuição do FeSO_4 que originaram os nove tratamentos (parcela), e os tratamentos controle estão descritos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Combinações dos níveis de proporção entre as fases aquosas (interna e externa) e da distribuição do FeSO₄ e suas respectivas codificações.

Tratamentos	A _i /A _e (%)	Codificação (Y ₁)	Distribuição do FeSO ₄	Codificação (Y ₂)
A _i 10	10/60	-1	A _i *	-1
A _i 15	15/55	0	A _i	-1
A _i 20	20/50	1	A _i	-1
A _i A _e 10	10/60	-1	A _i A _e	0
A _i A _e 15	15/55	0	A _i A _e	0
A _i A _e 20	20/50	1	A _i A _e	0
A _e 10	10/60	-1	A _e	1
A _e 15	15/55	0	A _e	1
A _e 20	20/50	1	A _e	1
C _{1/10} (controle)	10/60	-1	-	-
C _{1/15} (controle)	15/55	0	-	-
C _{1/20} (controle)	20/50	1	-	-
C ₂ (controle)	0/70	-	A _e	1

*A_i, A_iA_e e A_e: FeSO₄ localizado na fase aquosa interna, distribuído igualmente nas fases aquosa interna e externa e incorporado somente na fase aquosa externa da emulsão A_i/O/A_e e O/A_e.

Na Figura 1.1, tem-se uma representação esquemática dos sistemas emulsionados (A/O/A e O/A), produzidos neste estudo.

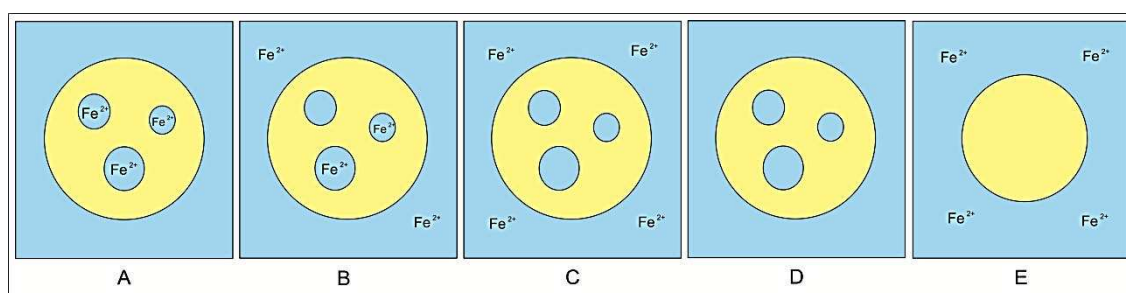


Figura 1.1. Representação das emulsões carreadoras de Fe²⁺ e dos tratamentos controles. A: com a incorporação de FeSO₄ na fração aquosa interna (A_i10 - A_i20); B: com a incorporação de FeSO₄ na fração aquosa interna e externa (A_iA_e10 - A_iA_e20); C: com a incorporação de FeSO₄ na fração aquosa externa (A_e10 - A_e20); D: sem adição de FeSO₄ (C_{1/10} - C_{1/20}) e E: emulsão O/A_e contendo FeSO₄ na fase contínua (C₂).

Todos os tratamentos em estudo continham a mesma concentração de FeSO₄ (0,042 g de FeSO₄ para cada 100 g de emulsão dupla). A escolha da concentração de FeSO₄ levou em consideração a alegação da legislação para alimentos considerados fortificados. De acordo com a ANVISA para ser considerado como “enriquecido” ou

“fortificado”, 100 mL ou 100 g do alimento pronto para consumo devem fornecer no mínimo 15% da IDR de referência, no caso de líquidos; e 30% da IDR de referência, no caso de sólidos, podendo o mesmo alimento ser denominado como de “alto teor” ou “rico” (Brasil, 1998). Desta forma, a concentração de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ corresponde a aproximadamente 60% da IDR para o mineral ferro, recomendado para adultos (14 mg/d) (Brasil, 2004).

2.3 Procedimento para a incorporação de FeSO_4 : emulsão dupla

As emulsões duplas do tipo $A_i/O/A_e$ carreadoras de FeSO_4 foram preparadas por meio do procedimento de dois passos. Primeiramente, foi preparada uma emulsão simples do tipo A_i/O (emulsão primária), em seguida, esta emulsão foi incorporada como “fase dispersa” em uma segunda fase aquosa (A_e). A fração total de fase aquosa utilizada foi de 70% m/m, distribuída entre as fases interna (10%, 15% ou 20% m/m) e externa (60%, 55% ou 50% m/m). Já a fração oleosa foi mantida constante em todos os tratamentos (30% m/m).

2.3.1 Preparo das emulsões

Para a elaboração das emulsões primárias (A_i/O), foi preparada uma solução aquosa por meio da dissolução de 0, 0,021 ou 0,042 g de FeSO_4 para cada 100 g de emulsão dupla, 0,75% (m/m) de gelatina e 0,05% (m/m) de sorbato de potássio em água deionizada a 90 °C. A gelatina foi hidratada durante 10 min, seguido por agitação magnética durante 30 min (Sapei et al., 2012). A gelatina foi incorporada à fase aquosa interna com o intuito de melhorar a estabilidade cinética da emulsão, devido à tendência de retardar a coalescência das gotículas aquosa (Oppermann et al., 2015).

Para os tratamentos contendo FeSO_4 localizados na fração aquosa externa (A_e10 - A_e20), foram adicionados, à fase aquosa interna, uma concentração específica de lactose para cada tratamento, com o intuito de equilibrar a pressão osmótica entre as fases aquosa interna e externa e, assim, minimizar a transferência de matéria entre as duas fases (Bonnet et al., 2009). As concentrações de lactose foram 0,050, 0,055 e 0,060 mol/100 g de emulsão dupla. referente aos tratamentos A_e10 , A_e15 e A_e20 , respectivamente.

A fração oleosa (O) foi preparada por meio da dissolução de 3% (m/m) de PGPR em óleo de girassol. Este sistema foi submetido a uma agitação magnética durante 30 min, a temperatura de 90 °C. A escolha da concentração de PGPR levou em

consideração estudos anteriores, nos quais foi verificado a formação de emulsões contendo gotículas de menor tamanho e distribuição homogênea nessa concentração de PGPR (Márquez & Wagner, 2010; O'Reagan & Mulvihill, 2010).

As emulsões A_i/O foram preparadas a partir da dispersão lenta de 10 g, 15 g ou 20 g de solução aquosa (A_i) em 30 g de fração oleosa (O), sob agitação constante, em homogeneizador de alta velocidade (Homogeneizador T18 Basic Ultra Turrax – IKA, S18N-19G) operando a 20000 rpm durante 4 min. As emulsões resultantes foram arrefecidas à 4 °C, durante uma hora, para assegurar uma completa gelificação da gelatina (Schuster et al., 2012).

Para a elaboração das emulsões duplas ($A_i/O/A_e$), primeiramente, foi preparado uma solução aquosa externa (A_e) pela dissolução de 0, 0,021 ou 0,042 g de $FeSO_4$ para cada 100 g de emulsão dupla, 3% (m/m) de tween 80 e 0,75% (m/m) de goma guar. Este sistema foi submetido a uma agitação magnética, durante 30 min à 50°C. Em seguida, foram adicionados 0,05% (m/m) de sorbato de potássio.

Para os tratamentos contendo Fe^{2+} localizados na fração aquosa interna e distribuídos igualmente entre as fases aquosas ($A_i10 - A_iA_e20$), foram adicionados, na fase aquosa externa, uma concentração específica de lactose para cada emulsão, são estas: 0,30; 0,20; 0,15; 0,13; 0,07 e 0,04 mol/100 g de emulsão dupla, referente aos tratamentos A_i10 a A_iA_e20 , respectivamente.

As emulsões duplas foram preparadas a partir da dispersão lenta de 40 g, 45 g ou 50 g das emulsões primárias (A_i/O) em 60 g, 55 g ou 50 g de solução aquosa externa (A_e), respectivamente. Este sistema foi agitado em homogeneizador de alta velocidade operando a 18000 rpm durante 4 min. As emulsões formadas foram armazenadas à 4 °C.

Para o primeiro grupo das emulsões controle (C_1), 40 g, 45 g ou 50 g de emulsão primária (A_i/O), apresentando uma relação de fração aquosa e oleosa de 1 : 3, 1 : 2 ou 1 : 1,5, respectivamente, foram dispersos em 60 g, 55 g ou 50 g de solução aquosa externa. As demais condições de processo foram idênticas às mencionadas no preparo dos tratamentos em estudo ($A_i10 - A_e20$).

No preparo da emulsão controle O/A_e (C_2), 30 g de óleo foi disperso lentamente em 70 g de solução aquosa, contendo 0,042 g de $FeSO_4$ para cada 100 g de emulsão, 3% (m/m) de tween 80, 0,75% (m/m) de goma guar e 0,05% (m/m) de sorbato de potássio. Este sistema foi agitado em homogeneizador de alta velocidade operando a 18000 rpm durante 4 min. As emulsões formadas foram armazenadas à 4 °C.

2.4 Análise instrumental dos sistemas emulsionados

2.4.1 Potencial zeta

A medida do potencial zeta (ζ) das gotículas de óleo foi realizada em equipamento ZetasizerNano-ZS (Malvern Instruments Inc., Southborough, MA), que calcula automaticamente o ζ dos tratamentos, com base nas medições da mobilidade eletroforética das gotículas, que se deslocam sob a ação de um campo elétrico. (pH médio das emulsões duplas foram 7,05, 6,45 e 5,14, referente aos sistemas sem adição de FeSO₄, contendo FeSO₄ distribuído nas fases aquosas interna e externa e localizado somente na fase aquosa externa, respectivamente). Para o preparo das amostras, estas foram diluídas em água deionizada (1:10⁵) (Wang et al., 2011). As medições foram realizadas a 25 °C.

2.4.2 Diâmetro médio das gotículas de óleo e índice de polidispersidade das emulsões

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das gotículas oleosas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras foram diluídas de aproximadamente 2 x 10³ vezes, em água deionizada e avaliadas a 25 °C (índice de refração da água igual a 1,33).

2.4.3 Microestrutura

A microestrutura das emulsões primárias e duplas foi analisada por meio de um microscópio de luz (OLYMPUS BX-60), com um aumento de 1000 x e 400 x, respectivamente. As formulações foram diluídas 10 vezes na fase aquosa externa (sem adição de FeSO₄), em seguida, inseridas em lâminas específicas e cobertas cuidadosamente com lamínulas de vidro.

2.4.4 Propriedades reológicas

As propriedades reológicas das emulsões carreadoras de FeSO₄ foram determinadas utilizando um reômetro dinâmico oscilatório HAAKE MARS (Modular Advanced Reometer System, Thermo Electron Corp., Alemanha), equipado com um banho termostático (Phoenix 2C30P, Thermo Electron Corp., Alemanha), a 25 °C.

A metodologia foi baseada em Li e Zhang (2015), com algumas modificações. O comportamento reológico foi obtido utilizando um sensor de cilindros coaxiais (DG41),

com taxa de deformação variando de 0,1 a 200 s⁻¹ (rampa ascendente, decrescente e ascendente) durante 6 min (Steffe, 1996; Rao, 2014).

A caracterização da viscoelasticidade das emulsões duplas foi obtida por meio do teste dinâmico oscilatório. As medidas foram realizadas com o sensor de geometria cone e placa (ângulo do cone = 1° ; diâmetro = 60 mm; gap = 0,051 mm) (C60/1). Primeiramente determinou-se a região de viscoelasticidade linear, aplicando sob as amostras o teste de varredura de tensão (1 a 1000 mPa, 1 Hz). Em seguida, as emulsões foram submetidas ao teste de varredura de frequência (0,1 a 10,0 Hz; 20,0 mPa), para a obtenção dos parâmetros dos módulos de elasticidade (G') e viscoso (G'').

2.4.5 *Análise de Cor*

A coloração das emulsões dupla carreadoras de FeSO₄ foi analisada utilizando um colorímetro Color Quest II Spera (Hunter Lab, Reston), com leitura direta das amostras. O sistema de leitura utilizado foi o CIELAB (Commission Internationale de l'Eclairage). Os parâmetros de tonalidade cromática (h*) e saturação (c*) foram calculados a partir dos dados de a* e b* (Pathare et al., 2012; Fante et al., 2013).

2.4.6 *Eficiência de aprisionamento e estabilidade cinética da localização do Fe²⁺*

A eficiência de aprisionamento de FeSO₄ (EA) e a estabilidade cinética (EC) da localização dos cátions Fe²⁺ dos sistemas de emulsão dupla foram determinados pela concentração de Fe²⁺ presente na fração aquosa externa. Desta forma, para os tratamentos contendo FeSO₄ na fase aquosa interna (A_i10 - A_iA_e20), a quantificação da concentração de Fe²⁺ representou a concentração de FeSO₄ não aprisionado na fase aquosa interna. A EA foi avaliada logo após a formação das emulsões duplas (0 dia), e a EC ao longo do período de armazenamento (1° ao 7° dia; 15° dia e 30° dia).

A metodologia para a determinação foi baseada em Choi et al. (2009), com algumas modificações. Inicialmente as formulações foram centrifugadas (2100g, 60 min) (Centrifuge 5804R, Eppendorf), a fim de separar os glóbulos de gordura da fração aquosa externa. Em seguida, foi coletada uma alíquota de fase aquosa, a qual foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 µm, com o intuito de remover possíveis resíduos de gotículas de óleo. A quantificação de Fe²⁺ presente na fase contínua das emulsões duplas foi realizada por meio do equipamento espectrofotômetro UV (Biomate 3, Thermo Scientific). Uma alíquota de 0,5 mL de amostra, previamente

filtrada e contendo cátions Fe^{2+} , e 0,5 mL de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 10 % (m/v) foram misturados à temperatura ambiente, com o intuito de promover a redução do ferro. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de ferrozina. Após 10 min, a absorbância foi medida a 510 nm. As concentrações de Fe^{2+} foram determinadas por meio de uma curva padrão utilizando FeSO_4 (0,001 – 0,10 mg/ml).

A partir da quantidade inicial de FeSO_4 adicionado em cada emulsão dupla, para as emulsões contendo FeSO_4 somente na fase aquosa interna ($A_i10 - A_i20$), a EA e a EC da localização dos cátions Fe^{2+} foram obtidas pelas equações (1) e (2), respectivamente. Já para os sistemas contendo FeSO_4 distribuído igualmente entre as fases aquosas interna e externa ($A_iA_e10 - A_iA_e20$), a EA e EC foram determinados por meio das equações (3) e (4), respectivamente.

$$\text{EA1 (\%)} = \left(1 - \left(\frac{C_{w2}}{C_t}\right)\right) * 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{EC1 (\%)} = \left[\left(1 - \left(\frac{C_{w2}}{C_t}\right)\right) - (1 - \text{EA1})\right] * 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{EA2 (\%)} = \left(1 - \left(\frac{C_{w2} - C_i}{C_t}\right)\right) * 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\text{EC2 (\%)} = \left[\left(1 - \left(\frac{C_{w2} - C_i}{C_t}\right)\right) - (1 - \text{EA2})\right] * 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde C_{w2} é a concentração de Fe^{2+} na fase aquosa externa, C_i é a concentração inicial de Fe^{2+} inserida na fase aquosa externa e C_t é a concentração total de Fe^{2+} .

2.4.7 Estabilidade macroscópica

A estabilidade macroscópica das emulsões carreadoras de FeSO_4 foram analisadas com base no índice de cremação dos sistemas. A análise da cremação das emulsões procedeu medindo, com o auxílio de uma régua, a altura da formação de creme, ou da fase oleosa, decorrente da coalescência das gotículas. As análises foram realizadas ao longo do período de armazenamento de 30 dias, com medição a cada 12 horas.

2.4.8 Análise estatística

O efeito das diferentes proporções das fases aquosa, das diferentes localizações do FeSO_4 e do tempo de armazenamento nos parâmetros físico-químicos em estudo foram analisados por meio de ANOVA considerando cada variável independente em estudo e a interação entre as mesmas.

Para efeito significativo da interação ($p \leq 0,05$), as variáveis foram decompostas e avaliadas separadamente. Desta forma, foi realizada uma análise de regressão para avaliar a proporção de fase aquosa interna e o tempo de armazenamento sobre as grandezas potencial zeta, diâmetro médio e viscosidade aparente. A seleção do modelo de melhor ajuste dos dados foi baseada na análise de falta de ajuste, coeficiente de regressão e coeficiente de determinação, R^2 ($\text{SQ}_{\text{REGRESSÃO}}/\text{SQ}_{\text{TRATAMENTOS}}$). Já o efeito da localização do FeSO_4 na emulsão dupla foi avaliada por meio do teste de Tukey.

Adicionalmente, avaliou-se o consenso entre as análises instrumentais e sensoriais, por meio do coeficiente de correlação de Serman (r). Este coeficiente mede o grau de concordância entre as duas análises distintas, varia de 0 (discordância total) a 1 (concordância perfeita) (Robert e Escoufier, 1976).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS[®] (Statistical Analysis System – SAS), versão 9.3, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

2.5 Avaliação sensorial das emulsões duplas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil, pelo parecer de número 041414/2016. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da UFV, em cabines individuais e sob a luz branca, por uma equipe constituída por 20 avaliadores selecionados (13 mulheres e 7 homens), com faixa etária variando de 19 a 37 anos (ISO, 2012).

O procedimento de seleção foi realizado com base no poder discriminatório de duas soluções distintas de FeSO_4 (0,1 e 0,4%) (Meilgaard et al., 2006). Para tanto, foi realizado uma série de quatro testes triangulares, sendo selecionado o avaliador que acertou no mínimo 50% dos testes. No teste triangular foram servidos aos avaliadores, em cabine individual, três soluções codificadas com três dígitos aleatórios, sendo duas iguais e uma diferente.

2.5.1 Teste de ordenação: distribuição do $FeSO_4$

O teste de ordenação foi aplicado com o intuito de avaliar a eficácia da emulsão dupla, e das diferentes possibilidades do sistema de carrear o $FeSO_4$, em “mascarar” a percepção dos atributos sensoriais característicos do $FeSO_4$, especificamente a cor branca e o sabor metálico.

Para isto, para cada atributo avaliado, foram realizadas três sessões de ordenação das emulsões, uma sessão para cada proporção de fase aquosa interna (10, 15 e 20%). Em cada sessão, foram apresentados aos avaliadores quatro tratamentos codificados com número de três dígitos aleatórios. Destes, três referiam-se às emulsões dupla com $FeSO_4$ distribuído em diferentes localizações no sistema (A_i , A_iA_e e A_e), e uma emulsão dupla sem adição de $FeSO_4$ (controle $C_{1/x}$).

As sessões de ordenação e a posição dos tratamentos dentro de cada sessão foram aleatorizadas. Foi solicitado aos avaliadores a provar as amostras da esquerda para a direita e ordená-las de forma crescente em relação à intensidade dos atributos avaliados.

2.5.2 Teste de ordenação: proporção das fases aquosa interna e externa

Um segundo teste de ordenação foi aplicado com o intuito de avaliar o efeito das diferentes proporções de fase aquosa (interna e externa) na percepção sensorial da tonalidade de cor branca e do sabor metálico.

Para cada atributo avaliado, foram realizadas três sessões de ordenação. Uma sessão referente a cada localização do $FeSO_4$ na emulsão dupla (A_i , A_iA_e e A_e). Em cada sessão, foram apresentados aos avaliadores quatro tratamentos, codificados com número de três dígitos aleatórios, com diferentes proporções de fase aquosa (0%/70%, 10%/60%, 15%/55% e 20%/50%), para uma mesma localização do Fe^{2+} .

As sessões de ordenação e a posição dos tratamentos dentro de cada sessão foram aleatorizadas. O procedimento de avaliação foi realizado de forma similar ao teste anterior.

Para evitar variações nas condições de armazenamento entre os diferentes tratamentos, os mesmos foram armazenados na geladeira e apresentados aos avaliadores na mesma temperatura ($\sim 8^\circ C$). Esta condição foi atendida para ambos os testes realizados.

Os resultados foram analisados por meio do teste de Friedman com o intuito de estabelecer diferença significativa ($p \leq 0,05$), seguido do teste de comparações múltiplas LSD (*Least-Significance-Difference*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização física das emulsões primárias (A_i/O)

A Figura 1.2 representa a microestrutura das emulsões primárias (A_i/O) contendo uma relação de fração aquosa e oleosa de 1 : 3 (P:G₁₀); 1 : 2 (P:G₁₅) e 1 : 1,5 (P:G₂₀). Todas as imagens referem-se aos tratamentos sem adição do FeSO₄, visto que a inserção do cátion Fe²⁺ não alterou a morfologia dos sistemas emulsionados.

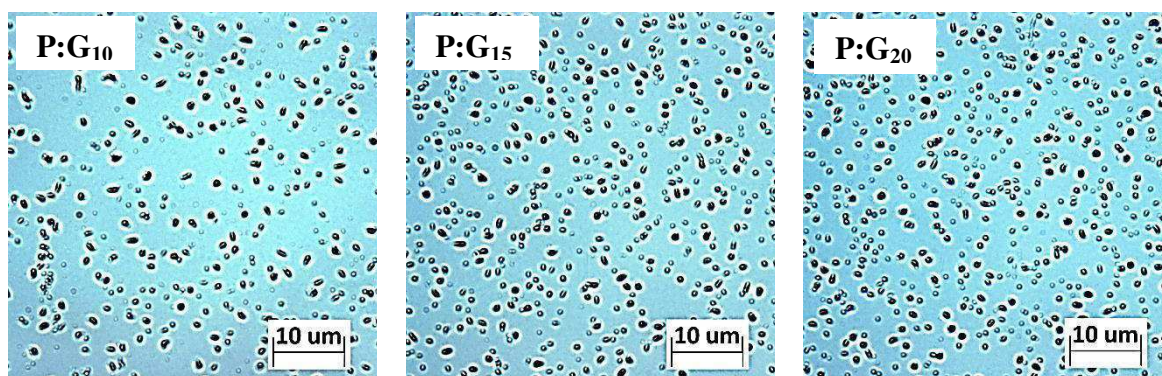


Figura 1.2. Fotomicrografias com aumento de 1000 x das emulsões primárias (A_i/O), apresentando uma relação de fração aquosa e oleosa de 1 : 3 (P:G₁₀); 1 : 2 (P:G₁₅) e 1 : 1,5 (P:G₂₀), no tempo de armazenamento de 1 dia.

*P: emulsão primária; Barras de escala representam 10 μm.

De acordo com a Figura 1.2, à medida que aumentou a fração aquosa, observou-se uma maior concentração de gotículas de água dispersas na fase oleosa. Com base nas fotomicrografias, estima-se que o diâmetro médio das gotículas foi menor que 1 μm, em todos os grupos de emulsão primária (P:G_{10,15 e 20}).

Com relação ao comportamento reológico das emulsões primárias (A/O), os ensaios obtidos indicaram que os três grupos de emulsões (P:G_{10,15 e 20}) apresentaram um comportamento newtoniano. O aumento na proporção de fase dispersa, associada à maior concentração de gotículas formadas, acarretou no aumento da viscosidade absoluta (μ) dos sistemas emulsionados, devido à maior resistência ao escoamento. O valor médio da μ para os diferentes grupos de emulsão primária, P:G₁₀, P:G₁₅ e P:G₂₀ foram 0,11, 0,15, 0,20 Pa.s, respectivamente (material suplementar).

3.2 Caracterização física das emulsões duplas ($A_i/O/A_e$)

3.2.1 Potencial zeta

A Figura 1.3 representa os valores obtidos do potencial zeta (ζ), logo após a formação das emulsões (1º dia). Todos os tratamentos apresentaram potenciais ζ negativo, variando de -50,05 a -20,94 mV. Com base apenas no potencial ζ , os resultados obtidos sugerem que os sistemas apresentaram estabilidade cinética, devido à repulsão eletrostática entre as gotículas de óleo (Aditya et al., 2015; McClements, 2016).

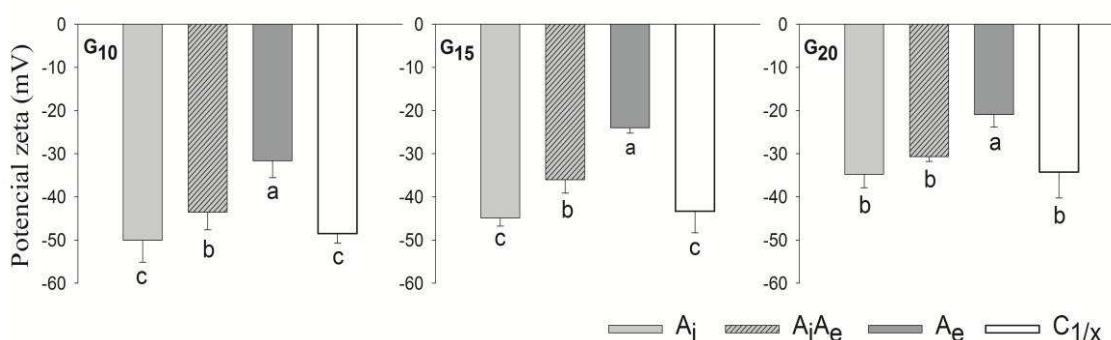


Figura 1.3. Potencial zeta (mV) das gotículas de óleo das emulsões dupla, no tempo de armazenamento de 1 dia.

* Médias seguidas da mesma letra, dentro de um mesmo grupo (G_{10,15 e 20}), não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os valores negativos do potencial ζ obtidos neste trabalho não eram esperados, devido à neutralidade elétrica das moléculas de tween 80, adsorvidas na superfície das gotículas oleosas. Desta forma, acredita-se que as cargas elétricas negativas podem ter sido originadas pela contribuição de diversos fatores, como por exemplo, presença de ácidos graxos livres no óleo comercial de girassol, visto o baixo valor do pH do óleo (pH ~ 3,4) (Mun et al., 2005; Perrechil & Cunha, 2013). Adição de goma guar na fase aquosa externa. Embora este espessante seja não-iônico, pode conter íons que difundiram para a superfície das gotículas, tornando-as ainda mais carregadas eletricamente (Yang et al., 2013; Tamnak et al., 2016a). Esta suposição baseou-se na medida do potencial ζ da solução de goma guar (0,075%, m/m) (ζ ~ -16,3 mV). E devido à adição de sorbato de potássio como agente antimicrobiano.

As diferentes distribuições do FeSO₄ na emulsão dupla (A_i, A_iA_e, A_e e C₁) propiciaram uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) no valor do potencial ζ . Independente da proporção de fase aquosa interna (G_{10, 15 e 20}), a inserção de FeSO₄

somente na fase aquosa externa (A_e) acarretou na redução (em módulo) do potencial ζ . Isto indica que os cátions Fe^{2+} estão atenuando uma fração das cargas elétricas negativas, presentes na superfície das gotículas de óleo, por meio de interações eletrostáticas. Além disso, a capacidade de complexação dos cátions Fe^{2+} com as hidroxilas da molécula de tween 80, adsorvida na superfície das gotículas oleosas pode ter favorecido na redução (em módulo) do potencial ζ (Serobatse, 2016).

Comparado aos demais tratamentos (A_i , A_iA_e e $C_{1/x}$), a presença de cátions Fe^{2+} apenas na fase aquosa externa, pode acarretar na redução da estabilidade cinética do sistema, visto à menor intensidade da força eletrostática de repulsão (McClements, 2016).

Ainda na Figura 1.3, foi possível constatar que os tratamentos contendo cátions Fe^{2+} na fase aquosa interna (A_{i10} , A_{i15} e A_{i20}) não diferiram significativamente ($p > 0,05$) das emulsões duplas sem adição de $FeSO_4$ (controle $C_{1/x}$). Logo, este resultado sugere que o sistema de emulsão dupla apresentou boa eficiência no aprisionamento dos cátions Fe^{2+} .

Para cada localização do $FeSO_4$, a influência da proporção de fase aquosa interna (A_i) no potencial ζ foi modelada estatisticamente por meio das equações apresentadas na Tabela 1.2. O modelo de primeira ordem foi testado quanto à falta de ajuste e significância dos parâmetros de regressão, apresentando coeficiente de determinação superior ou igual a 94,32%.

Tabela 1.2. Modelos de regressão para o potencial ζ (mV) das gotículas de óleo das emulsões duplas, em função da proporção de fase aquosa interna (A_i), seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).

Distribuição do $FeSO_4$	Modelo de regressão	R^2	p(F)
A_i *	$\zeta = -66,1367 + 1,5267 A_i$	0,9665	<0,0001
A_iA_e	$\zeta = -56,0661 + 1,2877 A_i$	0,9910	<0,0001
A_e	$\zeta = -41,5855 + 1,0700 A_i$	0,9432	0,0005
C_1	$\zeta = -62,8355 + 1,3933 A_i$	0,9704	<0,0001

* A_i , A_iA_e , A_e e C_1 : $FeSO_4$ localizado na fase aquosa interna, distribuído igualmente nas fases aquosa interna e externa, inserido somente na fase aquosa externa e sem adição de $FeSO_4$, respectivamente.

Independente da distribuição do $FeSO_4$, o aumento na proporção de fase aquosa interna, associado à menor fração de fase aquosa externa, tendeu a reduzir o potencial ζ (em módulo). Esta redução pode ser atribuída pela menor mobilidade eletroforética das gotículas de óleo carregadas eletricamente, devido à menor proporção de fase aquosa externa. Esta suposição também levou em consideração o maior valor (em módulo) do

potencial ζ da emulsão simples (controle C₂) ($\zeta \sim -42,3$ mV). Mesmo contendo FeSO₄ na fase contínua, a ausência de fase aquosa interna pode ter favorecido no aumento da mobilidade eletroforética.

O tempo de armazenamento (30 dias) não alterou significativamente ($p > 0,05$) o potencial ζ das emulsões avaliadas.

3.2.2 Diâmetro médio das gotículas de óleo e índice de polidispersidade das emulsões

Os resultados do diâmetro médio (d) das gotículas de óleo e do índice de polidispersidade (PdI) das emulsões carreadoras de FeSO₄ estão apresentados na Tabela 1.3. Logo após a formação das emulsões (1º dia), o diâmetro médio das gotículas de óleo variou de 3,85 a 4,26 μm nas emulsões duplas e apresentou um valor médio de 4,20 μm na emulsão simples (controle C₂).

Tabela 1.3. Diâmetro médio (d, μm) das gotículas de óleo e índice de polidispersidade (PdI) das emulsões duplas em estudo (A_i10 - A_e20) e das emulsões controle (C_{1/x} e C₂), no tempo de armazenamento de 1 dia.

	Emulsões	d (μm)	PdI
G₁₀	A _i 10	3,88 \pm 0,33 ^b	0,32 \pm 0,13
	A _i A _e 10	3,90 \pm 0,29 ^b	0,31 \pm 0,15
	A _e 10	3,85 \pm 0,31 ^b	0,31 \pm 0,10
	C _{1/10}	3,86 \pm 0,31 ^b	0,31 \pm 0,12
	C ₂	4,20 \pm 0,38 ^a	0,36 \pm 0,30
G₁₅	A _i 15	3,95 \pm 0,36 ^b	0,30 \pm 0,11
	A _i A _e 15	3,96 \pm 0,41 ^b	0,31 \pm 0,08
	A _e 15	4,01 \pm 0,33 ^b	0,30 \pm 0,14
	C _{1/15}	3,95 \pm 0,29 ^b	0,32 \pm 0,17
	C ₂	4,20 \pm 0,38 ^a	0,36 \pm 0,30
G₂₀	A _i 20	4,09 \pm 0,39 ^a	0,32 \pm 0,18
	A _i A _e 20	4,07 \pm 0,41 ^a	0,32 \pm 0,11
	A _e 20	4,26 \pm 0,35 ^a	0,31 \pm 0,13
	C _{1/20}	4,10 \pm 0,37 ^a	0,31 \pm 0,16
	C ₂	4,20 \pm 0,38 ^a	0,36 \pm 0,30

* Médias seguidas da mesma letra, dentro de um mesmo grupo (G_{10,15 e 20}), não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Para um mesmo grupo (G_{10, 15 ou 20}), as diferentes distribuições do FeSO₄ na emulsão dupla (A_i, A_iA_e e A_e) não exerceu influência significativa ($p > 0,05$) no diâmetro médio das gotículas oleosas. A emulsão simples (controle C₂) apresentou diâmetro médio das gotículas significativamente maior ($p \leq 0,05$) comparado ao

diâmetro referente aos sistemas de emulsão dupla contendo menores proporções de fase aquosa interna (G_{10} e G_{15}).

Independente da proporção de fase aquosa interna e da localização dos cátions Fe^{2+} , as emulsões apresentaram baixo índice de polidispersidade e distribuições de tamanho unimodais (Tabela 1.3 e Figura 1.4). A distribuição do diâmetro médio foi representada somente para o tratamento A_iA_e15 e para as emulsões controle $C_{1/15}$ e C_2 .

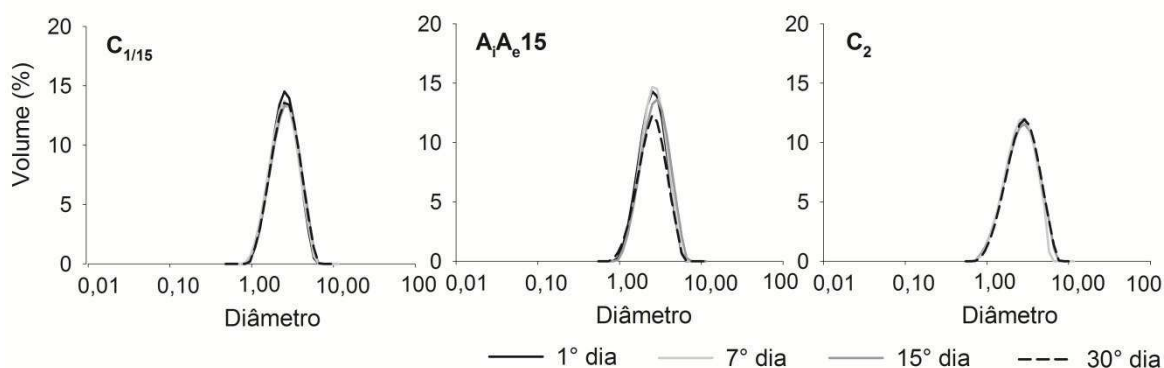


Figura 1.4. Distribuição do diâmetro (μm) das gotículas oleosas das emulsões duplas, referente ao tratamento A_iA_e15 e das emulsões controle ($C_{1/15}$ e C_2), ao longo do tempo de armazenamento, em dias.

Para cada localização do Fe^{2+} , a influência da proporção de fase aquosa interna (A_i) e do tempo de armazenamento (t) no diâmetro médio das gotículas oleosas (d) foi modelada estatisticamente (Tabela 1.4). O modelo de segunda ordem foi testado quanto à falta de ajuste e significância dos parâmetros de regressão, apresentando coeficiente de determinação superior ou igual a 96,80%.

A proporção de fase aquosa influenciou positivamente no diâmetro médio das gotículas de óleo ($p \leq 0,05$), em todos os tratamentos avaliados. Considerando que todos os sistemas em estudo continham a mesma concentração de fase oleosa (30%), o aumento na proporção de fase aquosa interna propiciou a formação de maior número de gotículas de água (Figura 1.2). Estas, ao dispersarem na fração oleosa, ocupando maior volume, contribuíram para o aumento no diâmetro das gotículas oleosas.

Tabela 1.4. Modelos de regressão para o diâmetro (d ; μm) das gotículas de óleo das emulsões, em função da proporção de fase aquosa interna (A_i) e do tempo de armazenamento (t), em dias, seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).

Distribuição do FeSO_4	Modelo de regressão	R^2	$p(F)$
A_i	$d = 3,8003 + 0,0114 A_i - 0,0166 t + 0,0004 t^2$	0,9680	<0,0001
$A_i A_e$	$d = 3,7524 + 0,0155 A_i - 0,0239 t + 0,0007 t^2$	0,9716	<0,0001
A_e	$d = 3,4141 + 0,0441 A_i - 0,0278 t + 0,0008 t^2$	0,9998	<0,0001
C_1	$d = 3,7207 + 0,0184 A_i - 0,0293 t + 0,0007 t^2$	0,9965	<0,0001
C_2	$d = 4,1847 + 0,0073 t$	0,9842	<0,0001

* A_i , $A_i A_e$, A_e , C_1 e C_2 : FeSO_4 localizado na fase aquosa interna, distribuído igualmente nas fases aquosa interna e externa, inserido somente na fase aquosa externa, sem adição de FeSO_4 e distribuído na fase contínua da emulsão O/A, respectivamente.

O efeito quadrático da variável t indica que o diâmetro das gotículas oleosas diminui até um determinado tempo de armazenamento. E em seguida, tendeu a aumentar, em todos os sistemas de emulsão dupla. Esta redução pode ter ocorrido devido à difusão das moléculas de água da fase aquosa interna para a externa, através da fração oleosa, resultando na perda de gotículas de água dispersas nas gotículas oleosas, e conseqüentemente na alteração da morfologia e do diâmetro das emulsões dupla (Tadros, 2013). A difusão das moléculas de água está relacionada com o gradiente de pressão osmótica entre os dois meios. Segundo Benichou et al. (2007), em sistemas de emulsão dupla, o processo de osmose pode ocorrer devido à adsorção parcial do emulsificante (lipofílico e/ou hidrofílico), com a formação de uma camada fina na interface.

De acordo com Garti (1997), a concentração do emulsificante e a sua afinidade com ambas as fases estão entre os fatores que interferem na estabilidade cinética do sistema emulsionado. O autor supracitado verificou que o excesso da adição do emulsificante lipofílico no preparo de emulsões dupla acarretou na formação de micelas invertidas, com “aprisionamento” de moléculas de água, levando o sistema ao desequilíbrio osmótico. Desta forma, a redução do diâmetro das gotículas oleosas pode ser resultado do inchaço das gotículas de água, seguido pela ruptura da membrana de óleo, e liberação de algumas gotículas para a fase aquosa externa.

Além disso, uma fração do excesso da concentração de emulsificante lipofílico poderá difundir para a superfície das gotículas oleosas, competindo com o segundo emulsificante (hidrofílico). Esta adsorção competitiva pode desestabilizar ambas as gotículas (água e óleo), acarretando na desestabilização do sistema (Dickinson, 2011).

Resultados semelhantes foram obtidos por Tamnak et al. (2016b) ao avaliarem a estabilidade cinética de emulsões dupla contendo 2 e 5% (m/m) de PGPR. Após 30 dias de armazenamento, todos os tratamentos apresentaram uma redução no diâmetro das gotículas oleosas. Como no presente estudo foram adicionados 3% (m/m) de PGPR, em todas as emulsões duplas, sugere-se que esta concentração (em excesso) está favorecendo para a desestabilização do sistema.

Ainda na Tabela 1.4, os modelos de regressão indicaram que sob condições de maiores tempos de armazenamento, o diâmetro das gotículas de óleo tendeu a aumentar, em todos os sistemas emulsionados. Isto ocorre devido à tendência do sistema em retornar ao estado de equilíbrio termodinâmico. O aumento no diâmetro das gotículas promove a redução na área interfacial total, reduzindo, assim a componente da energia livre de Gibbs associada à interface O/A no sistema (Sapei et al., 2012).

Para a emulsão simples (controle C_2), o modelo linear foi ajustado adequadamente ($R^2 = 98,42\%$). A variável t exerceu influência positiva no diâmetro das gotículas. Isto indica que o tempo de armazenamento favoreceu no aumento do diâmetro das gotículas de óleo.

3.2.3 Microestrutura

A formação da emulsão dupla do tipo $A_i/O/A_e$, caracterizada pela presença de gotículas de água distribuídas uniformemente no interior de uma gotícula oleosa foi confirmada por meio da análise da microestrutura dos sistemas emulsionados. A Figura 1.5 representa a fotomicrografia de uma emulsão dupla ($A_i/O/A_e$) e simples (O/A_e), para nível de comparação entre as duas morfologias. Com base na Figura 1.5A, constatou-se que todas as gotículas possuem a estrutura característica de uma emulsão dupla, que consiste em pequenas gotas de água distribuídas uniformemente no interior de uma gota oleosa (seta indicativa). Já na Figura 1.5B observou-se a ausência dessa estrutura, o que caracteriza a morfologia de uma emulsão simples.

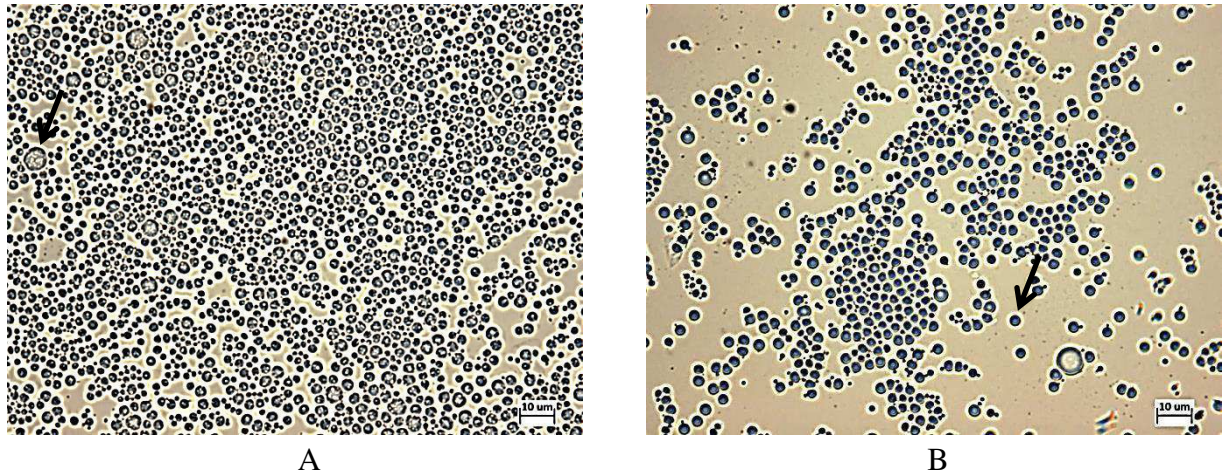


Figura 1.5. Fotomicrografias com aumento de 400 x das emulsões $A_i/O/A_e$ (A) e O/A_e (B) obtidas por microscopia de luz, no tempo de armazenamento de 1 dia.

*Barras de escala representam 10 μm

A microestrutura das emulsões duplas em estudo está representada na Figura 1.6. As imagens obtidas por meio da microscopia de luz confirmou a presença de gotículas de água dispersa na fração oleosa, em todos os tratamentos (seta indicativa).

Para o grupo de emulsão contendo maiores proporções de fase aquosa interna (G_{15} e G_{20}) verificou-se a presença de maior número de gotículas de água. Este resultado corrobora com as análises obtidas da microestrutura das emulsões primárias (Figura 1.2). Logo, um sistema emulsionado que apresenta maior proporção de fase dispersa, conseqüentemente, apresentará maior quantidade de gotículas formadas.

A distribuição do FeSO_4 nas diferentes fases das emulsões duplas (A_i , A_iA_e e A_e) tendeu a alterar a dispersão das gotículas oleosas na fase aquosa externa do sistema emulsionado. Para os tratamentos carreadores de cátions Fe^{2+} na fase aquosa interna (A_i10 - A_i20) e para as emulsões duplas sem adição de FeSO_4 (controle $C_{1/x}$), constatou-se que as gotículas oleosas se apresentaram mais afastadas entre si. O mesmo não ocorreu com os tratamentos que continham cátions Fe^{2+} na fase aquosa externa (A_iA_e10 - A_e20). Este resultado é corroborado pelos os valores obtidos dos potenciais ζ (Figura 1.3). Quanto menor o potencial ζ (em módulo), menor será a magnitude de intensidade da força eletrostática repulsiva, resultando na maior tendência de aproximação entre as gotículas de óleo.

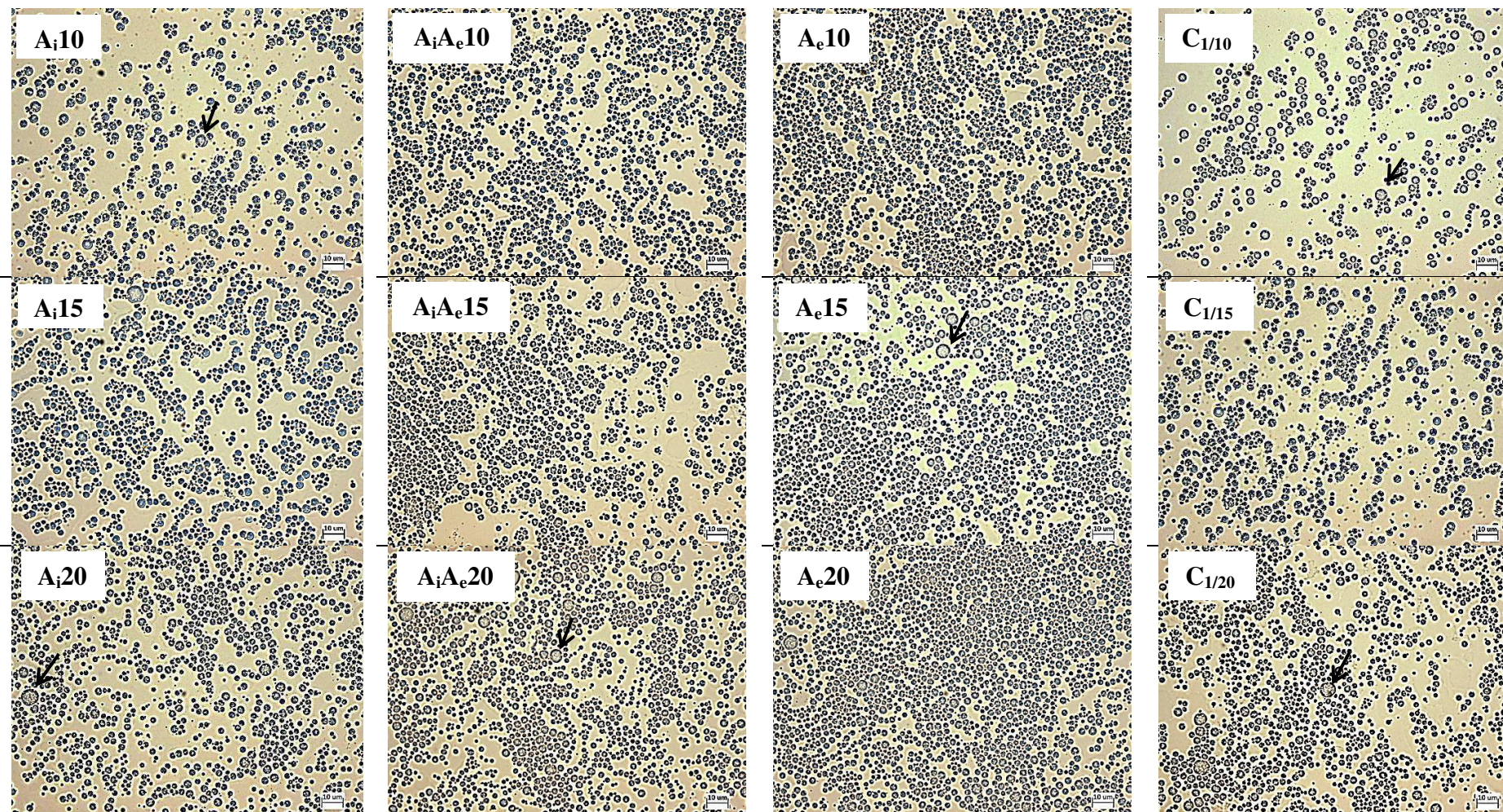


Figura 1.6. Fotomicrografias com aumento de 400 x das emulsões $A_i/O/A_e$ e das emulsões controle ($C_{1/x}$), obtidas por microscopia de luz, no tempo de armazenamento de 1 dia. Barras de escala representam 10 μm .

Com base na associação dos valores dos potenciais δ e das imagens morfológicas pode-se inferir que a presença de cátions Fe^{2+} na fase aquosa externa tende a reduzir a estabilidade cinética do sistema, comparado com os demais tratamentos, uma vez que, poderá favorecer na ocorrência dos processos de floculação das gotículas oleosas, levando à coalescência das mesmas.

3.2.4 Propriedades reológicas

Nenhuma das emulsões apresentou comportamento tixotrópico. Isto foi observado pela superposição das curvas ascendente e descendente de escoamento, obtidas logo após a formação dos sistemas (1 dia). Desta forma, os reogramas de cada sistema emulsionado foram representados pela terceira curva (material suplementar). Com base nos parâmetros reológicos apresentados na Tabela 1.5, o modelo matemático mais adequado ($R^2 > 0,99$) para caracterizar o escoamento das emulsões foi Ostwald-de-Waele ($n < 1$).

Tabela 1.5. Parâmetros médios do modelo de Ostwald-de-Waele utilizados para a caracterização reológica das emulsões duplas e simples (controle C_2) e valores médios da viscosidade aparente (η_{100}), a 100 s^{-1} .

		K (Pa.sⁿ)	n	R²	η_{100} (Pa.s)
G ₁₀	A _i 10	1,04 ± 0,03	0,509 ± 0,001	0,9996	0,108 ± 0,002 ^b
	A _i A _e 10	1,43 ± 0,08	0,474 ± 0,003	0,9995	0,126 ± 0,007 ^a
	A _e 10	1,42 ± 0,03	0,481 ± 0,001	0,9996	0,130 ± 0,001 ^a
	C ₁ /10	1,05 ± 0,09	0,496 ± 0,002	0,9996	0,103 ± 0,004 ^b
G ₁₅	A _i 15	1,19 ± 0,07	0,487 ± 0,002	0,9998	0,111 ± 0,001 ^b
	A _i A _e 15	1,33 ± 0,13	0,500 ± 0,005	0,9996	0,133 ± 0,012 ^a
	A _e 15	1,55 ± 0,06	0,475 ± 0,002	0,9992	0,138 ± 0,002 ^a
	C ₁ /15	1,49 ± 0,10	0,450 ± 0,004	0,9994	0,115 ± 0,009 ^b
G ₂₀	A _i 20	1,40 ± 0,09	0,456 ± 0,003	0,9994	0,114 ± 0,005 ^c
	A _i A _e 20	1,45 ± 0,05	0,477 ± 0,006	0,9996	0,130 ± 0,001 ^b
	A _e 20	1,32 ± 0,08	0,520 ± 0,004	0,9998	0,144 ± 0,004 ^a
	C ₁ /20	1,09 ± 0,08	0,517 ± 0,003	0,9996	0,118 ± 0,002 ^c
	C ₂	0,82 ± 0,03	0,495 ± 0,002	0,9996	0,080 ± 0,001 ^d

* Médias seguidas da mesma letra, dentro de um mesmo grupo (G₁₀, 15 e 20), não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As emulsões constituídas por elevadas concentrações de fase dispersa ($\Phi > 0,3$) são conhecidas por apresentarem um comportamento não-newtoniano e pseudoplástico, devido ao rearranjo das gotículas no fluido, a fim de minimizar o atrito (Mayson, 1999; Schuch et al., 2014). Segundo Pal et al. (2007), a força de cisalhamento tende a esticar

as gotículas, que passam a assumir um formato filamentosos. Desta forma, à medida que a taxa de cisalhamento aumenta, as gotículas se tornam mais alongadas. O alongamento e a orientação paralela às linhas de corrente de fluxo resultam na diminuição da viscosidade do sistema (Holdsworth, 1971).

Ao avaliar as emulsões duplas pertencentes a um mesmo grupo ($G_{10, 15}$ e 20), observou-se que os tratamentos contendo $FeSO_4$ na fase aquosa externa (A_iA_e e A_e) apresentaram um valor significativamente maior ($p \leq 0,05$) na viscosidade aparente (η_{100}), comparado aos tratamentos contendo $FeSO_4$ na fase aquosa interna (A_i) e sem adição de $FeSO_4$ (controle $C_{1/x}$). Além disso, nas emulsões contendo maior proporção de fase aquosa interna (G_{20}), a η_{100} foi diretamente proporcional à quantidade de $FeSO_4$ adicionado na fase aquosa externa (Tabela 1.5).

A capacidade de interação dos cátions Fe^{2+} , dissolvidos na fase aquosa externa, com as hidroxilas da molécula de tween 80, adsorvida na superfície das gotículas de óleo pode ter propiciado no aumento da η_{100} . Sendo bivalente, os cátions Fe^{2+} podem complexar com as hidroxilas presentes na superfície de duas gotículas, formando assim uma “rede”, a qual tende a dificultar o “arraste” do sistema, acarretando no aumento da η_{100} do mesmo (Serobatse, 2016).

Além disso, a propriedade de solvatação das moléculas de água, formando uma camada ao redor dos íons oriundos da dissociação da molécula de $FeSO_4$, pode ter acarretado no aumento da viscosidade das emulsões. Quanto menor a proporção de água livre na fase contínua, maior será a resistência ao escoamento, o que implica no aumento da η_{100} do sistema (Dickinson, 2011).

Todas as emulsões duplas em estudo apresentaram η_{100} significativamente maior ($p \leq 0,05$), em relação à η_{100} da emulsão simples (controle C_2). Considerando que ambos os sistemas continham o mesmo teor de óleo (30%), a emulsão simples por apresentar maior proporção de fase contínua (70%), devido à ausência de gotículas aquosas na fração oleosa, propiciou uma maior distância média entre as gotículas, acarretando na redução da η_{100} do sistema (Nakhare & Vyas, 1996; Pal & Paul, 2011).

Independente da distribuição do $FeSO_4$, a proporção de fase aquosa interna não exerceu influência significativa ($p > 0,05$) na η_{100} das emulsões duplas. Sendo assim, o modelo de primeira ordem foi ajustado apenas para a variável tempo de armazenamento (t), sendo adequado quanto à falta de ajuste e significância dos parâmetros de regressão. Além disso, apresentou coeficiente de determinação superior ou igual a 83,38% (Tabela

1.6). Para os tratamentos contendo FeSO₄ na fase aquosa externa (A_iA_e e A_e), não foi possível ajustar um modelo adequado aos dados obtidos. Desta forma, avaliou-se apenas a tendência da η_{100} ao longo do tempo de armazenamento (material suplementar).

Tabela 1.6. Modelos de regressão para a viscosidade aparente (η_{100}) em função do tempo de armazenamento (t), em dias, seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).

Distribuição do FeSO ₄	Modelo de regressão	R ²	p(F)
A _i	$\eta_{100} = 0,1121 - 0,0002 t$	0,8338	0,0083
C ₁	$\eta_{100} = 0,1125 - 0,0005 t$	0,9298	<0,0001
C ₂	$\eta_{100} = 0,0814 - 0,0009 t$	0,9704	<0,0001

A variável tempo de armazenamento (t) propiciou uma redução significativa ($p \leq 0,05$) na viscosidade aparente de todas as emulsões, independente da distribuição do FeSO₄. Conforme discutido anteriormente, no item 3.2.2 (diâmetro médio das gotículas de óleo e índice de polidispersidade das emulsões), a liberação de gotículas de água para a fase aquosa externa, associado à redução no diâmetro médio das gotículas oleosas, pode ter acarretado na redução da viscosidade das emulsões duplas (Pal, 2011).

Embora o coeficiente linear da variável t seja praticamente zero, este indicou que os sistemas emulsionados tenderam a apresentar um comportamento tixotrópico, quando armazenadas por um maior período de tempo.

As emulsões em estudo também foram avaliadas em relação à caracterização viscoelástica, por meio do ensaio oscilatório dinâmico. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que todos os sistemas emulsionados apresentaram caráter predominantemente elástico ($\text{tg } \delta < 1$, em todo intervalo de frequência avaliado; $0,1 \text{ Hz} < \omega < 10 \text{ Hz}$) (Figura 1.7).

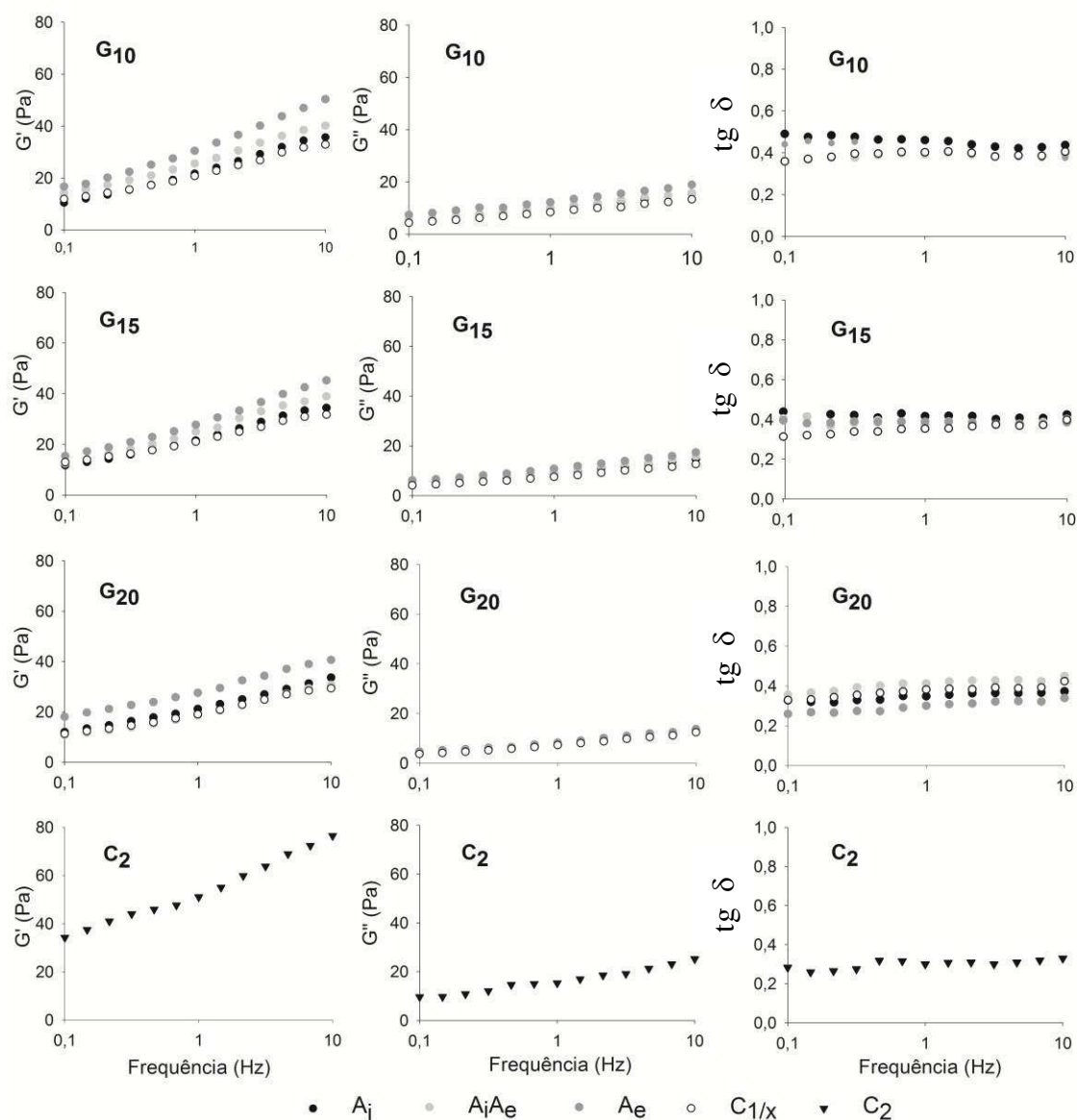


Figura 1.7. Valores médios dos módulos de viscoelasticidade (G' e G''), e a $\text{tg}(\delta)$, em função da frequência (f , Hz) das emulsões duplas e emulsão simples (controle C_2), a 25 °C.

O caráter elástico predominante observado em todos os tratamentos provavelmente está relacionado com a adição do espessante goma guar. Este polissacarídeo apresenta a capacidade funcional de “arrastar” moléculas de água em sua cadeia, aumentando a viscosidade da emulsão, logo, irá contribuir para uma estruturação física do sistema. Segundo McClements (2016), quanto maior a viscosidade da fase contínua de um sistema emulsionado, este tenderá a apresentar um caráter de um semi-sólido.

De acordo com Figura 1.7, verificou-se que para um mesmo grupo (G_{10} , G_{15} e G_{20}), o módulo elástico referente às emulsões com diferentes distribuições de $FeSO_4$ (A_i , A_iA_e e $C_{1/x}$), foi maior com o aumento da frequência. O mesmo comportamento foi observado para o módulo viscoso, porém, em uma menor proporção.

Os gráficos referentes ao ângulo de perda ($tg \delta$) em função da frequência ressaltou a predominância do caráter elástico dos sistemas emulsionados, visto a relação entre os módulos reológicos serem menores do que 1, para todas as emulsões avaliadas (Stteffe, 1996).

Além disso, a $tg \delta$ obtida para cada tratamento indicou que as diferentes proporções de fase aquosa interna e externa, e a localização do $FeSO_4$ não influenciou no caráter viscoelástico das emulsões. Isto indica que a propriedade reológica, especificamente a viscoelasticidade não é um fator determinante na escolha das condições ideais do sistema de emulsão dupla.

Para a emulsão simples (controle C_2), observou-se maior valor do módulo elástico (G'), comparado aos valores obtidos para as emulsões duplas, considerando uma mesma frequência. Este resultado realçou o efeito positivo do espessante goma guar no caráter elástico dos sistemas emulsionados.

A predominância do caráter elástico observado em todos os tratamentos tende a favorecer na redução do movimento browniano das gotículas oleosas, bem como na frequência e intensidade de colisões entre as mesmas, contribuindo, assim, para a estabilidade cinética do sistema (McClements, 2016).

3.2.5 Análise de cor

As diferentes distribuições do $FeSO_4$ nos sistemas emulsionados conferiu diferença significativa ($p \leq 0,05$) nas medidas de luminosidade (L^*), tonalidade cromática (h^*) e índice de saturação (C^*) (Tabela 1.7). As demais variáveis (proporção de fase aquosa e tempo de armazenamento) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) nos dados avaliados.

Tabela 1.7. Medidas de cor (L^* , h^* e C^*) das emulsões duplas e dos grupos de emulsão controle (C_1 e C_2)

		Medidas de cor		
		L^*	h^* (°)	C^*
G₁₀	A_i10	88,69 ± 0,18 ^b	115,10 ± 0,75 ^b	4,24 ± 0,09 ^c
	A_iA_e10	87,50 ± 0,14 ^c	107,04 ± 0,46 ^c	5,11 ± 0,08 ^b
	A_e10	87,24 ± 0,11 ^c	102,91 ± 1,42 ^d	5,72 ± 0,13 ^b
	C_{1/10}	89,87 ± 0,19 ^a	123,80 ± 1,60 ^a	3,81 ± 0,13 ^c
G₁₅	A_i15	88,80 ± 0,08 ^b	112,60 ± 0,36 ^b	4,42 ± 0,05 ^d
	A_iA_e15	87,73 ± 0,06 ^c	106,69 ± 0,97 ^c	5,15 ± 0,18 ^c
	A_e15	87,39 ± 0,03 ^c	102,20 ± 0,46 ^d	5,99 ± 0,12 ^b
	C_{1/15}	89,93 ± 0,29 ^a	124,00 ± 1,35 ^a	3,79 ± 0,13 ^e
G₂₀	A_i20	88,66 ± 0,03 ^b	112,98 ± 0,74 ^b	4,44 ± 0,11 ^d
	A_iA_e20	87,93 ± 0,04 ^c	106,22 ± 0,25 ^c	5,21 ± 0,02 ^c
	A_e20	87,70 ± 0,09 ^c	103,21 ± 0,75 ^d	5,73 ± 0,22 ^b
	C_{1/20}	89,87 ± 0,21 ^a	124,77 ± 2,01 ^a	3,73 ± 0,19 ^e
	C₂	86,02 ± 0,01 ^d	98,01 ± 0,23 ^e	7,51 ± 0,10 ^a

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, dentro de um mesmo grupo ($G_{10,15}$ e 20), não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Para a coordenada L^* , verificou-se que todos os tratamentos em estudo podem ser considerados claros, uma vez que, apresentaram valores acima de 50, em uma escala que varia de 0 (preto puro) a 100 (branco puro) (Cohen & Jackik, 2005).

Independente da proporção de fase aquosa interna ($G_{10, 15}$ e 20), as emulsões duplas sem adição de $FeSO_4$ (controle C_1) foram classificadas de maior luminosidade ($L^* > 89$), seguido dos tratamentos contendo cátions Fe^{2+} na fase aquosa interna (A_i). Já as emulsões duplas contendo $FeSO_4$ na fase aquosa externa (A_iA_e e A_e) apresentaram menor luminosidade ($L^* \sim 87$).

Os compostos de ferro de maior biodisponibilidade, como, por exemplo, o $FeSO_4$, são hidrossolúveis, podendo muitas vezes reagir com os componentes que constituem a matriz alimentar. Na maioria das vezes, esta reação provoca o escurecimento do alimento, afetando diretamente na aceitabilidade do produto pelos consumidores (Hurrell, 2002).

A emulsão simples contendo $FeSO_4$ dissolvido na fase contínua (controle C_2) apresentou menor valor do parâmetro de luminosidade ($L^* = 86,02$), comparado às emulsões duplas ($L^* \geq 87,24$). Considerando que a emulsão C_2 apresentou diâmetro médio das gotículas de óleo igual ou maior ao diâmetro das gotículas das emulsões dupla (Tabela 1.2), a ausência de gotículas de água dispersas na fração oleosa propiciou ao sistema de emulsão simples, uma redução na concentração de gotículas de óleo. Desta forma, o menor valor obtido de L^* , pode ser resultado da menor espalhabilidade

da luz pelas gotículas de óleo, tornando o sistema com aparência mais escura (Chantrapornchai et al., 1999; Chung & McClements, 2014; McClements, 2016).

Os valores obtidos para a tonalidade cromática (h^*) das emulsões foram em torno de 90° , evidenciando uma tonalidade próxima do amarelo tendendo ao verde (Lopez et al., 1997; Cardoso et al., 2007). Todos os tratamentos diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$), indicando que as variáveis em estudo conferiram uma cor característica para cada emulsão, dentro do espectro visível.

As emulsões em estudo diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) em relação ao índice de saturação (C^*). Este parâmetro refere-se à intensidade da cor. Desta forma, valores menores correspondem ao padrão de cor mais fraco (“aspecto fosco do objeto”) e valores mais altos ao padrão de cor mais forte (“cores vivas”) (Cardoso et al., 2007).

Dentre os tratamentos avaliados, verificou-se que as emulsões contendo FeSO_4 na fase aquosa interna (A_i10 a A_i20) apresentaram menor intensidade da cor amarela e similar aos tratamentos sem adição de FeSO_4 (controle C_1). Além disso, foi possível constatar que a intensidade da cor amarela está diretamente relacionada com a presença do FeSO_4 na fase aquosa externa, visto os maiores valores obtidos do C^* para os tratamentos A_iA_e e A_e .

A emulsão simples (controle C_2) apresentou maior intensidade na cor amarela ($C^* = 7,51$), comparado às emulsões duplas. Este resultado mostra que além da presença do FeSO_4 , a ausência de gotículas de água dispersas na fração oleosa, tendeu a aumentar a intensidade da cor amarela nos sistemas emulsionados.

3.2.6 Eficiência de aprisionamento e estabilidade cinética da localização do Fe^{2+}

A eficiência de aprisionamento (EA) e a estabilidade cinética (EC) da localização do Fe^{2+} , ao longo de 30 dias de armazenamento foram avaliados para todos os sistemas de emulsão dupla contendo FeSO_4 na fase aquosa interna (A_i10 a A_iA_e20). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.8.

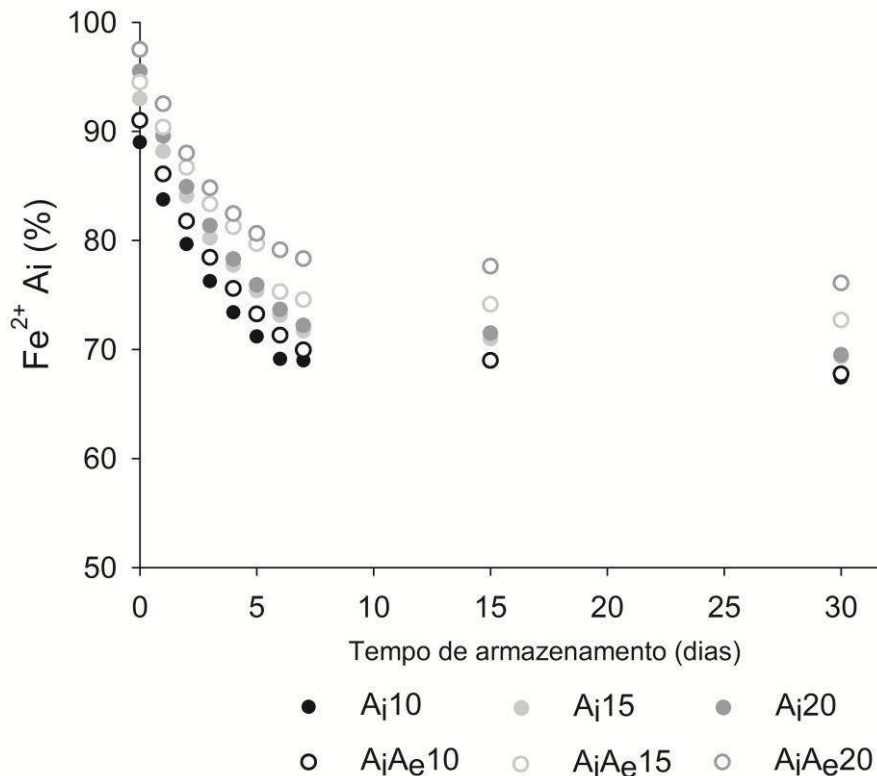


Figura 1.8. Eficiência de aprisionamento (EA) e estabilidade cinética (EC) da localização do FeSO_4 ao longo do tempo de armazenamento (dias), expressos em porcentagem de Fe^{2+} presente na fase aquosa interna (A_i).

A EA dos cátions Fe^{2+} na fase aquosa interna das emulsões duplas (A_i e A_iA_e) variou de 89,0 a 97,5%, dentre os tratamentos avaliados. O aumento na proporção de fase aquosa interna favoreceu o aprisionamento do Fe^{2+} . Além disso, constatou-se que a EA foi maior para os tratamentos no qual o FeSO_4 foi distribuído igualmente entre as fases aquosas interna e externa ($EA_{A_iA_e} > EA_{A_i}$).

De acordo com Dickinson (2011), em relação à capacidade de retenção e captura de compostos bioativos, um sistema de emulsão dupla apresenta boa estabilidade se a eficiência de aprisionamento foi em torno de 95%. Na prática, um rendimento total não é atingido, devido à ruptura inevitável de algumas gotículas internas, durante o segundo procedimento de emulsificação.

Ao longo do tempo de armazenamento foi possível verificar uma redução na EC da localização dos cátions Fe^{2+} , em todos os tratamentos. Com base na Figura 1.8, no tempo específico de 30 dias de formação das emulsões duplas, a porcentagem de cátions Fe^{2+} que permaneceu aprisionado na fase aquosa interna variou de 67,42 a 76,09%, dentre os tratamentos avaliados. Com valor máximo para a emulsão A_iA_e20 e valor

mínimo para A_i10 . Dickinson (2011) sugere um bom rendimento de aprisionamento, após algumas semanas, em torno de 70 a 80% (ou acima).

Segundo Choi et al. (2009), os mecanismos físico-químicos que possivelmente estão relacionados com o aumento gradual da concentração de Fe^{2+} na fase aquosa externa são a difusão do ferro da fase aquosa interna para a externa através da fração oleosa, e liberação das gotículas de água devido à ruptura da membrana de óleo. Ambos os mecanismos ocorrem quando o sistema encontra-se em desequilíbrio osmótico. Como foi observado no item 3.2.2, o diâmetro médio de todas as emulsões duplas diminuiu ao longo do tempo de armazenamento. Desta forma, sugere que a redução da EC dos tratamentos A_i e A_iA_e seja resultado da liberação das gotículas de água para o meio externo.

3.2.6 Estabilidade macroscópica

As emulsões foram fotografadas após a sua formação (1 dia) e no final do período de armazenamento (30 dias) com o intuito de avaliar a estabilidade cinética dos sistemas, em termos macroscópicos (Figura 1.9). Foram ilustrados somente os tratamentos referentes ao grupo intermediário (G_{15}) e a emulsão simples (controle C_2), visto que, a proporção de fase aquosa não acarretou diferença na estabilidade macroscópica das emulsões.

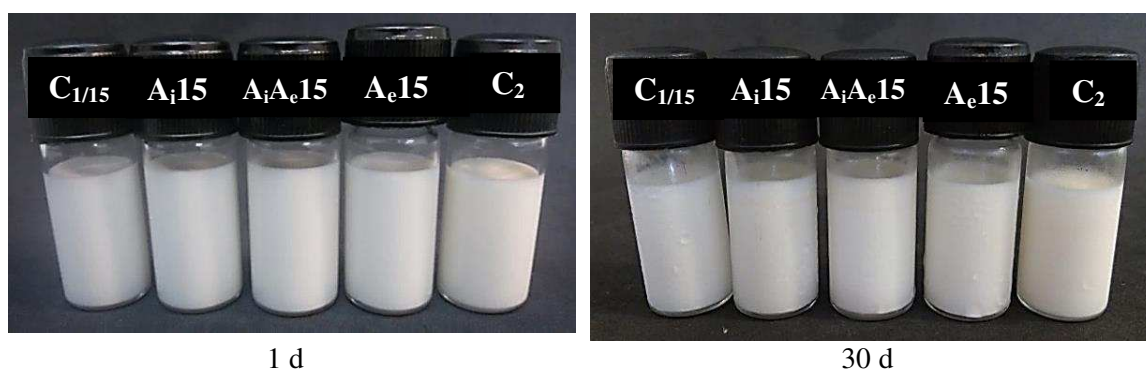


Figura 1.9. Fotografia das emulsões duplas contendo uma proporção de fase aquosa interna e externa de 15/55% (G_{15}) e da emulsão simples (C_2)

Com base nas imagens verificou-se que, independente da distribuição do $FeSO_4$, as emulsões duplas apresentaram boa estabilidade cinética durante 30 dias de armazenamento, com índice de cremação tendendo a 0%. O mesmo foi observado para a emulsão simples (controle C_2).

Este resultado comprova as suposições realizadas a respeito da estabilidade cinética de todos os tratamentos, mensurada por meio dos parâmetros físico-químicos (diâmetro médio, índice de polidispersidade, potencial zeta, comportamento reológico e cor). Portanto, com base apenas nas características instrumentais das emulsões, constatou-se que o sistema de emulsão dupla foi eficaz no carregamento do FeSO_4 , apresentando potencial de aplicação no setor de fortificação de alimentos.

3.3 Análise sensorial das emulsões duplas ($A_i/O/A_e$)

3.3.1 Teste de ordenação: localização do FeSO_4

A Tabela 1.8 representa os resultados obtidos da percepção sensorial dos avaliadores em relação à cor branca e o sabor metálico das emulsões duplas carreadoras de FeSO_4 , em diferentes localizações no sistema (A_i , A_iA_e e A_e) e da emulsão dupla sem adição de FeSO_4 (controle $C_{1/x}$). Para ambos os atributos sensoriais, verificou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sistemas emulsionados, por meio do teste de Friedman.

Tabela 1.8. Significância das somas de ordens para a cor branca e sabor metálico das emulsões duplas carreadoras de FeSO_4 , em diferentes localizações no sistema

	Cor branca				Sabor metálico			
	A_i	A_iA_e	A_e	$C_{1/x}$	A_i	A_iA_e	A_e	$C_{1/x}$
G_{10}	57 ^b	38 ^c	25 ^c	80 ^a	74 ^a	58 ^b	40 ^c	28 ^c
G_{15}	59 ^b	38 ^c	23 ^c	80 ^a	68 ^a	65 ^a	38 ^b	29 ^b
G_{20}	60 ^b	23 ^c	37 ^c	80 ^a	70 ^a	66 ^a	42 ^b	22 ^c

* Somas de ordens seguidas da mesma letra, dentro de um mesmo grupo ($G_{10,15}$ e 20), não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo método LSD (*Least-Significance-Difference*).

* Ordem crescente de intensidade do estímulo.

Independente da proporção de fase aquosa interna ($G_{10, 15}$ e 20), a emulsão controle ($C_{1/x}$) apresentou maior tonalidade de cor branca, seguido dos tratamentos contendo FeSO_4 na fase aquosa interna (A_i). Já as emulsões A_iA_e e A_e , de todos os grupos em estudo ($G_{10, 15}$ e 20), foram classificadas de menor intensidade de cor branca. Este resultado corrobora com as análises instrumentais da cor (Tabela 1.7), a qual evidenciou uma redução na luminosidade (L^*) para os tratamentos contendo FeSO_4 na fase aquosa externa. As duas medidas apresentaram coeficiente de correlação (r) igual 0,89.

Em relação ao sabor metálico, constatou-se que as emulsões contendo cátions Fe^{2+} na fase aquosa externa (A_e) apresentaram menor intensidade do atributo avaliado.

Isto indica que a adição de FeSO_4 somente na fase aquosa externa da emulsão dupla possibilitou reduzir a intensidade do sabor metálico, comparado aos demais tratamentos em estudo (A_i e A_iA_e). Para os sistemas contendo menores proporções de fase aquosa interna (G_{10} e G_{15}), verificou-se que a adição de FeSO_4 na fase aquosa externa da emulsão dupla tendeu a “mascarar” a percepção do sabor metálico, comparado à emulsão controle ($C_{1/x}$). Já as emulsões carreadoras de Fe^{2+} na fase aquosa interna e distribuídos igualmente entre as fases aquosa (A_i e A_iA_e) foram classificadas de maior intensidade no sabor metálico, para todos os grupos avaliados ($G_{10, 15}$ e 20).

Dickinson (2011) relatou que sistemas complexos, como por exemplo, emulsão dupla pode ser utilizado para influenciar na percepção sensorial do alimento pelos consumidores, uma vez que tende a modificar a extensão em que a fase aquosa, contendo o estímulo sensorial, irá interagir com as superfícies orais. Para os tratamentos nos quais o FeSO_4 foi inserido somente na fase aquosa externa, a redução na intensidade do sabor metálico pode ser resultado da liberação contínua dos cátions Fe^{2+} . Segundo Mosca et al. (2010), a estimulação prolongada e contínua dos receptores do gosto tende a diminuir a percepção sensorial, devido à menor atividade nervosa.

Além disso, a menor percepção da intensidade do sabor metálico pode ter sido favorecida durante o procedimento de mastigação, levando à coalescência das gotículas oleosas, com posterior liberação e coalescência das gotículas de água, ocasionando a diluição do FeSO_4 ao entrar em contato com as papilas gustativas.

O mesmo não foi observado para as emulsões contendo FeSO_4 na fase aquosa interna (A_i e A_iA_e). Como nestes sistemas a liberação do estímulo depende da coalescência das gotículas oleosas e aquosas e/ou da difusão dos cátions Fe^{2+} para o meio externo, o contato dos cátions Fe^{2+} com as papilas gustativas será descontínuo. Desta forma, a cada pulso de liberação do estímulo, o efeito da percepção do atributo sensorial será acumulativo, logo a intensidade do sabor metálico será aparentemente maior, comparado com os tratamentos contendo cátions Fe^{2+} na fase aquosa externa (A_e) e sem adição de FeSO_4 ($C_{1/x}$) (Busch et al., 2009; Burseg et al., 2010; 2011).

Resultados similares foram obtidos por Lad et al. (2012); Oppermann et al. (2016); Chiu et al. (2017) ao avaliarem a eficácia da emulsão dupla na redução do teor de sódio. Todos os autores verificaram uma maior percepção do gosto salgado para as emulsões contendo NaCl aprisionado na fase aquosa interna.

As características reológicas do sistema emulsionado também podem influenciar na percepção sensorial do sabor metálico. Para alimentos fluidos, diversos autores

verificaram que a intensidade dos atributos relacionados ao sabor está inversamente correlacionada com a viscosidade (Koliandris et al., 2010; Cook et al., 2003; Christensen, 1980). Neste estudo verificou-se uma maior viscosidade aparente para as emulsões duplas contendo FeSO₄ na fase aquosa externa (Tabela 1.5), o que pode ter favorecido na redução da percepção do sabor metálico. De acordo com Busch et al. (2013) quanto maior a viscosidade menor será a superfície de contato entre o estímulo sensorial e as papilas gustativas, resultando na redução da percepção sensorial.

Desta forma, os resultados obtidos mostraram que é possível manipular a intensidade da percepção sensorial, especificamente da tonalidade da cor branca e do sabor metálico, a partir do local em que o FeSO₄ será inserido no sistema e das diferenças estruturais das emulsões duplas.

3.3.2 Teste de ordenação: proporção de fase aquosa interna e externa

As diferentes proporções de fase aquosa interna e externa (G₁₀, G₁₅ e G₂₀) foram avaliadas sensorialmente em relação à tonalidade de cor branca e o sabor metálico dos sistemas emulsionados carreadores de FeSO₄. Para ambos os atributos sensoriais, verificou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, por meio do teste de Friedman (Tabela 1.9).

Tabela 1.9. Significância das somas de ordens para a cor branca e sabor metálico das emulsões duplas contendo diferentes proporções de fase aquosa interna (%) e para a emulsão simples (controle C₂).

	Cor branca				Sabor metálico			
	G ₁₀	G ₁₅	G ₂₀	G ₀ (C ₂)	G ₁₀	G ₁₅	G ₂₀	G ₀ (C ₂)
A _i	69 ^a	55 ^a	56 ^a	20 ^b	47 ^b	60 ^{a,b}	66 ^a	28 ^c
A _i A _e	60 ^a	69 ^a	52 ^a	20 ^b	56 ^a	59 ^a	53 ^a	34 ^b
A _e	55 ^a	51 ^a	69 ^a	25 ^b	40 ^b	45 ^b	47 ^b	68 ^a

* Somas de ordens seguidas da mesma letra, dentro de um mesmo grupo (G_{10,15 e 20}), não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo método LSD (*Least-Significance-Difference*).

* Ordem crescente de intensidade do estímulo.

Independente da localização do cátion Fe²⁺ (A_i, A_iA_e e A_e), a emulsão simples do tipo O/A_e (controle C₂) apresentou menor tonalidade de cor branca, comparado com os demais sistemas emulsionados. Para as emulsões duplas A_i e A_iA_e, as diferentes proporções de fase aquosa interna e externa não acarretaram em diferença significativa ($p > 0,05$) na intensidade da cor branca. Todos os tratamentos apresentaram tonalidade mais clara. O mesmo resultado foi obtido na análise instrumental da cor (L^{*}) (Tabela

1.7). Desta forma, as análises instrumentais e sensoriais da tonalidade de cor podem ser correlacionadas.

Em relação ao sabor metálico, constatou-se que as diferentes proporções de fase aquosa não conferiram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as emulsões duplas, exceto para os tratamentos contendo FeSO_4 na fase aquosa interna (A_i). Nestes, constatou-se que a emulsão A_i20 , contendo 20%/50% de fase aquosa interna e externa, apresentou maior intensidade do sabor metálico, comparado ao tratamento A_i10 , com 10%/60%. Este resultado indica que o menor volume de fase aquosa externa ao se misturar com a saliva durante o procedimento de mastigação, pode ter acelerado o transporte dos cátions Fe^{2+} para as papilas gustativas.

Além disso, a menor estabilidade cinética da emulsão A_i20 , atribuída pelo aumento da área interfacial presente no maior número de gotículas de água dispersa na fração oleosa (item 3.1.1), pode ter acelerado a ocorrência dos processos de desestabilização do sistema, acarretando na coalescência das gotículas aquosas e oleosas, propiciando, assim a maior liberação do estímulo sensorial, o qual conferiu maior intensidade do sabor metálico (Sapei et al., 2012; Dickinson, 2011).

Ainda na Tabela 1.8, observou-se que as emulsões duplas contendo cátions Fe^{2+} na fase aquosa interna (A_i) e distribuídos igualmente entre as frações aquosas (A_iA_e) apresentaram maior intensidade do sabor metálico, comparado à emulsão simples (controle C_2). Já a inserção de FeSO_4 somente na fase aquosa externa (A_e) propiciou menor percepção sensorial do sabor metálico. Logo, o tipo de sistema emulsionado e a localização do composto bioativo, especificamente FeSO_4 , podem intensificar ou “mascarar” a percepção sensorial de um determinado atributo sensorial.

A menor intensidade de percepção sensorial do sabor metálico, quando o estímulo encontra-se veiculado na fase aquosa externa da emulsão dupla, mostra que este sistema emulsionado apresenta um amplo potencial de aplicação nos setores de fortificação de alimentos com vitaminas e minerais, com menor perda da qualidade sensorial. Entretanto, é importante ressaltar que a fortificação de alimentos através da emulsão dupla como veículo carreador, somente se aplica para alimentos contendo gordura na sua formulação, como por exemplo, produtos lácteos.

Embora a inserção de FeSO_4 na fase aquosa externa tenha propiciado na menor percepção sensorial da intensidade da cor branca (Tabela 1.8), indicando escurecimento do sistema emulsionado, acredita-se que ao incorporar este sistema em uma matriz alimentar, o escurecimento da emulsão não será visualmente perceptível pelos

consumidores. Sendo assim, a coloração do produto não será um atributo determinante da aceitabilidade sensorial do produto contendo emulsão dupla carreadora de FeSO_4 .

4. CONCLUSÃO

Emulsões duplas carreadoras de FeSO_4 foram desenvolvidas com sucesso. Os fatores avaliados, proporção de fase aquosa interna e externa e diferentes localizações do Fe^{2+} influenciaram na estrutura das emulsões e conseqüentemente, afetaram as propriedades físico-químicas. A inserção de FeSO_4 na fase aquosa externa proporcionou menor valor (em módulo) do potencial ζ , acarretando na redução da estabilidade cinética do sistema, visto à menor intensidade da força eletrostática de repulsão. Entretanto, esta redução na magnitude de cargas presentes na superfície das gotículas oleosas não foi suficiente para ocasionar a desestabilização do sistema. Além disso, a estabilidade cinética foi favorecida pela predominância do caráter elástico.

As diferentes possibilidades do sistema de emulsão dupla em veicular Fe^{2+} acarretaram em diferença na percepção sensorial dos atributos avaliados (cor branca e sabor metálico). A inserção de FeSO_4 somente na fase aquosa externa propiciou reduzir ou até mesmo “mascarar” a percepção do sabor metálico, comparado aos demais sistemas avaliados. Já a proporção de fase aquosa não acarretou em diferença sensorial perceptível pela equipe de avaliadores. Os tratamentos contendo FeSO_4 na fase aquosa interna apresentaram maior intensidade do sabor metálico, comparado com as demais emulsões duplas em estudo.

A partir da associação dos resultados da análise sensorial com as características físicas das emulsões, verificou-se que a inserção do FeSO_4 na fase aquosa externa da emulsão dupla possibilitou minimizar a percepção sensorial dos atributos característicos do sal de ferro. Além disso, o sistema modelo apresentou estabilidade cinética durante 30 dias de armazenamento. Desta forma, emulsão dupla apresenta potencial de aplicação no setor de fortificação de alimentos com ferro, especificamente FeSO_4 , quando veiculado na fase aquosa externa do sistema.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aditya, N. P.; Aditya S.; Yang, H.; Kim, H. W.; Parque, O. P.; Ko, S. Codelivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food Chemistry*, v. 173, p. 7–1, 2015.

Benichou, A.; Aserin, A. e Garti, N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI epolysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 294, p.20-32, 2007.

Berendsen, R., G'uell, C., Ferrando, M. Spray-dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. *Food Chemistry*, v. 178, p.251–258, 2015.

Bonnet, M.; Cansell, M.; Berkaoui, A.; Ropers, M.H.; Anton, M.; Leal-Calderon, F. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.92–101, 2009.

Brasil. Portaria n° 31 de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. *Agencia Nacional de Vigilância Sanitária*, disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>

Brasil. Portaria n° 80 de 13 de dezembro de 2004. Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. *Agencia Nacional de Vigilância Sanitária*, disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>

Burseg, K.M.M.; de Kok, C.B.; P.M.T.; Bult, J.H.F. Sweet taste enhancement through pulsatile stimulation depends on pulsation period not on conscious pulse perception. *Physiology & Behavior*. v.100, p.327–331, 2010.

Burseg, K.M.M.; Camacho, S.; Bult, J.H.F. Effects of Pulsation Rate and Viscosity on Pulsation-Induced Taste Enhancement: New Insights into Texture–Taste Interactions *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.59 n.10, p.5548–53, 2011.

Busch, J.L.H.C.; Tournier, C.; Knoop¹, J.E.; Kooyman G. e Smit, G. Temporal Contrast of Salt Delivery in Mouth Increases Salt Perception. *Chemical Senses*, v.34, p.341–348, 2009.

- Cardoso, W.S.; Pinheiro, F.A.; Patelli, T.; Perez, R.; Ramos, A.M. Determinação da concentração de sulfito para a manutenção da qualidade da cor em maçã desidratada. *Revista Analytica*, v. 29, 2007.
- Chantrapornchai, W.; Clydesdale, F.; McClements D. J. Influence of droplet characteristics on the optical properties of colored oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.155, p.373–382, 1999.
- Choi, S.J.; Decker, E.A.; McClements, D.J. Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid oxidation. *Food Chemistry*. v. 116, p.271–276, 2009.
- Chung, C.; McClements, D. J. Structure–function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. *Food Structure*. v.1, p.106–126, 2014.
- Cofrades, S.; Antoniou, I.; Solas, M.T.; Herrero, A.M.; Jiménez-Colmenero, F. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chemistry*, v.141, p.338–346, 2013.
- Cohen, K.O.; Jackix, M.N.H. Estudo do licor de cupuaçu. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.25, n.1, 2005.
- Cook, D.J.; Hollowood, T.A.; Linforth, R.S.T.; Taylor, A.J. Oral Shear Stress Predicts Flavour Perception in Viscous Solutions. *Chemical Senses*. v.28, p.11–23, 2003.
- Chiu, N.; Hewson, L; Fisk, I.; Wolf, B. Programmed emulsions for sodium reduction in emulsion based foods. *Food & Function*, v. 6, p. 1428-1434.
- Dallman, P.R.; Siimes, M.A.; Stekel, A. Iron deficiency in infancy and childhood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 33, p. 86-118, 1980.
- Delample, M.; Silva, F.; Leal-Calderon, F. Osmotically driven gelation in double emulsions. *Food Hydrocolloids*. v.38, p.11-19, 2014.
- Dickinson, E. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, v.6, p. 1–11, 2011.

Eslami P, Davarpanah L, Vahabzadeh F. Encapsulating role of β -cyclodextrin in formation of Pickering water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing *Lactobacillus delbrueckii*. *Food Hydrocolloid*, v. 64, p. 133–148, 2017.

Fang, Z.X.; Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols e a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 510-523, 2010.

Fante, C.A.; Filas Boas, A.C.; Costa, A.C.; Silva, E.P.; Oliveira, M.C.; Lima, L.C.O. 1-MCP nos aspectos fisiológicos e na qualidade pós-colheita de maçãs Eva durante o armazenamento refrigerado. *Ciência Rural*. v. 43, n. 12, p. 2142-2147, 2013.

Garcia-Casal, M.N.; Layrisse M. Absorción de hierro de los alimentos. Papel de la vitamina A. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.48, p. 191-196, 1998.

Garti, N. Double emulsions: scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 123 e 124, p. 233-246, 1997.

Garti, N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT-Food Science and Technology*, v.30, n.3, p.222-235, 1997.

Giroux, H.J., Constantineau, S., Fustier, P., Champagne, C.P., St-Gelais, D., Lacroix, M., Britten, M. Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal*, v.29, p.107–114, 2013.

Grebmer, K.V.; Saltzman, A.; Birol, E.; Wiesmann, D.; Prasai, N.; Yin, S.; Yohannes, Y.; Menon, P.; Thompson, J.; Sonntag, A. *Global Hunger Index: The Challenge of Hidden Hunger*. Bonn, Washington D. C. and Dublin: Welthungerhilfe, International Food Policy Research Institute and Concer Worldwide, v.1, 2014.

Holdsworth, S. D. Aplicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products. *Journal Texture Studies*. v. 2, p. 393-418, 1971.

Hurrell, R.F. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutrition Reviews*, v. 60, p.7–15, 2002.

International Standard Organization. *General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors*, ISO 8586, 2012.

Koliandris, A.L.; Morris, C.; Hewson, L.; Hort, J.; Taylor, A.J.; Wolf, B. Correlation between saltiness perception and shear flow behaviour for viscous solutions. *Food Hydrocolloids*, v.24, p.792–799, 2010.

Lad, M.; Hewson, L.; Wolf, B. Enhancing saltiness in emulsion based foods. *Flavour*. p.1-13, 2012.

Laxminarayan, R.; Mills, A.J.; Breman, J.G. Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project. *Lancet*, v. 367, p. 1193–1208, 2006.

Lopez, A.; Pique, M.; Boatella, J.; Romero, A.; Ferran, A.; Garcia, J. Influence drying conditions on the hazelnut quality. III. Browning. *Drying Technology*, v. 15, n. 3–4, p. 989–1002, 1997.

Mayson, T.G. Novos conceitos fundamentais em emulsão de reologia. *Current Opinion in Colloid Interface de Ciência*, v. 4, p. 231-238, 1999.

McClements, D.J. *Food emulsions: principles, practice and techniques*. 3 rd.ed. CRC Press, 2016.

Meilgaard, M.C.; Civille, G.V.; Carr, B.T. *Sensory Evaluation Techniques*. (4th ed.). Boca Raton: CRC Press. 2006.

Mosca AC, van de Velde F, Bult JHF, van Boekel MAJS, Stieger M. Enhancement of sweetness intensity in gels by inhomogeneous distribution of sucrose. *Food Quality and Preference* v. 21, p. 837–842, 2010.

Mun, S.; Decker, E.A.; McClements, D.J. Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers. *Langmuir*, v.14, p.6228-34, 2005.

Muschiolik, G., Dickinson, E. Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.16, p. 532-555, 2017.

- Nakhare, S.; Vyas, P. Multiple emulsion based systems for prolonged delivery of rifampicin: in vitro and in vivo characterization. *Pharmazie*. v. 52, p. 224-226, 1997.
- O'regan, J.; Mulvihill, D.M. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: encapsulation and stability. *Food Research International*. v. 43, p. 224–231, 2010.
- Oppermann, A.K.L.; Renssena, M.; Schuchc, A.; Stiegerb, M.; Scholtena, E. Effect of gelation of inner dispersed phase on stability of (w1/o/w2) multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*. v. 48, p. 17–26, 2015.
- Oppermann, A.K.L.; Piqueras-Fiszman, B.; de Graaf, C.; Scholten, E.; Stieger, M. Descriptive sensory profiling of double emulsions with gelled and non-gelled inner water phase. *Food Research International*, v.85, p. 215–223, 2016.
- Pal, R. Rheology of high internal phase ratio emulsions. *Food Hydrocolloids*. v. 20, p. 997–1005, 2006.
- Pal, R. Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.16, n.1, p.41-60, 2011.
- Pal, T.; Paul, S.; Polymethylmethacrylate coated alginate matrix microcapsules for controlled release of diclofenac sodium. *Pharmacology & Pharmacy*. v. 2, p. 56–66, 2011.
- Pathare, P.B.; Opara, U.L.O.; Al-said, F.Al-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 2012.
- Perrechil, F.A.; Cunha, R.L. Stabilization of multilayered emulsions by sodium caseinate and κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*. v. 30, p.606, 2013.
- Rao, M.A. *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods: principles and applications*, 3rd. ed. Springer. 2014.
- Rocha-Selmi, G.A., Theodoro, A.C., Thomazini, M., Bolini, H.M.A., Favaro-Trindade, C.S. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. *Journal Food Engineering*, v. 119, p.28–32, 2013a.

Rocha-Selmi, G.A., Bozza, F.T., Thomazini, M., Bolini, H.M.A., Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. *Food Chemistry*, v.139, p.72–79, 2013b.

Santos, M.G., Carpinteiro, D.A., Thomazini, M., Rocha-Selmi, G.A., Cruz, A., Rodrigues, C.E.C., Favaro-Trindade, C.S. Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by complex coacervation and microcapsule application in chewing gum. *Food Research International*, v. 66, p.454–462, 2014.

Santos, M.G., Bozza, F.T., Thomazini, M., Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chemistry*, v.171, p.32–39, 2015.

Sapei, L.; Naqvi, M.A.; Rousseau, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 316–323, 2012.

Schuch, A.; Gary leal L.; Schuchmann, H.P. Production of W/O/W double emulsions. Part I: Visual observation of deformation and breakup of double emulsion drops and coalescence of the inner droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 461, p. 336–343, 2014.

Schuster, S.; Bernewitza, R.; Guthausenb, G.; Zappc, J.; Greinerd, A.M.; Köhlera, K.; Schuchmanna, H.P. Analysis of W1/O/W2 double emulsions with CLSM: Statistical image processing for droplet size distribution. *Chemical Engineering Science*. v. 81, p. 84–90, 2012.

Serobatse, K.R.N. A theoretical study on the antioxidant properties of methoxy-substituted chalcone derivatives: A case study of kanakugiol and pedicellin through their Fe (II and III) coordination ability. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*. v. 15, n.6, p.1-30, 2016.

Silva, S.M.C.; Mura, J.P. *Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia*. São Paulo, p. 107-134, 2011.

Tadros, T. *Drug delivery*. In T. Tadros (Ed.), *Encyclopedia of colloid and interface science*. UK: Springer. p. 211-340, 2013.

Steffe, J.F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*: Freeman Press. 1996, 418p.

Tamnak, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., Ghazali, H. M., & Muhammad, K. Physicochemical properties, rheological behavior and morphology of pectin-pea protein isolate mixtures and conjugates in aqueous system and oil in water emulsion. *Food Hydrocolloids*, v.56, p.405-416, 2016a.

Tamnak, S.; Mirhosseini, H.; Tan, C.P., Amid, B. T.; Kazemi, M.; Hedayatnia, S. Encapsulation properties, release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectine-pea protein isolate conjugate and Tween 80. *Food Hydrocolloids*. v.61, p.599-608, 2016b.

Wang, B.; Wang, L.; Li, D.; Adhikari, B.; Shid, J. Effect of gum Arabic on stability of oil-in-water emulsion stabilized by flaxseed and soybean protein. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 343– 351, 2011.

WHO e FAO. *Guidelines on Food Fortification with Micronutrients*. Eds. Allen L, de Benoist B, Dary O, Hurrell R. Geneva, WHO, 2006.

Yang, Y.; Leser, M.E.; Sher, A.A.; McClements, D.J. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin Q-Naturale. *Food Hydrocolloids*, v.30, n.2, p.589-596, 2013.

MATERIAL SUPLEMENTAR

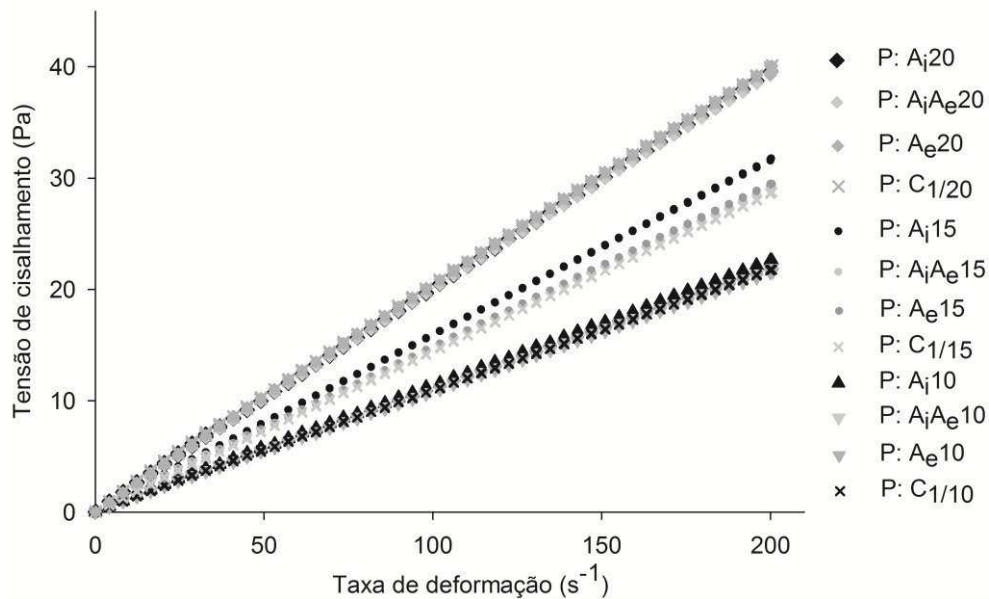


Figura 1.10. Reogramas com valores médios de tensão de cisalhamento (τ , Pa) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) para as emulsões primárias (A_i/O) a 25 °C.

* P: emulsão primária.

Tabela 1.10. Viscosidade absoluta média (μ) das emulsões primárias (A_i/O), a 25 °C.

		Viscosidade absoluta	
		μ (Pa.s)	R^2
P:G ₁₀	P:A _i 10	$0,1107 \pm 0,03$	0,9999
	P:A _i A _e 10	$0,1092 \pm 0,05$	0,9998
	P:A _e 10	$0,1079 \pm 0,04$	0,9998
	P:C ₁ /10	$0,1090 \pm 0,03$	0,9996
P:G ₁₅	P:A _i 15	$0,1499 \pm 0,03$	1,0000
	P:A _i A _e 15	$0,1465 \pm 0,04$	0,9997
	P:A _e 15	$0,1475 \pm 0,04$	0,9998
	P:C ₁ /15	$0,1419 \pm 0,02$	0,9998
P:G ₂₀	P:A _i 20	$0,1993 \pm 0,04$	0,9997
	P:A _i A _e 20	$0,1980 \pm 0,03$	0,9997
	P:A _e 20	$0,2020 \pm 0,04$	0,9996
	P:C ₁ /20	$0,2008 \pm 0,02$	0,9994

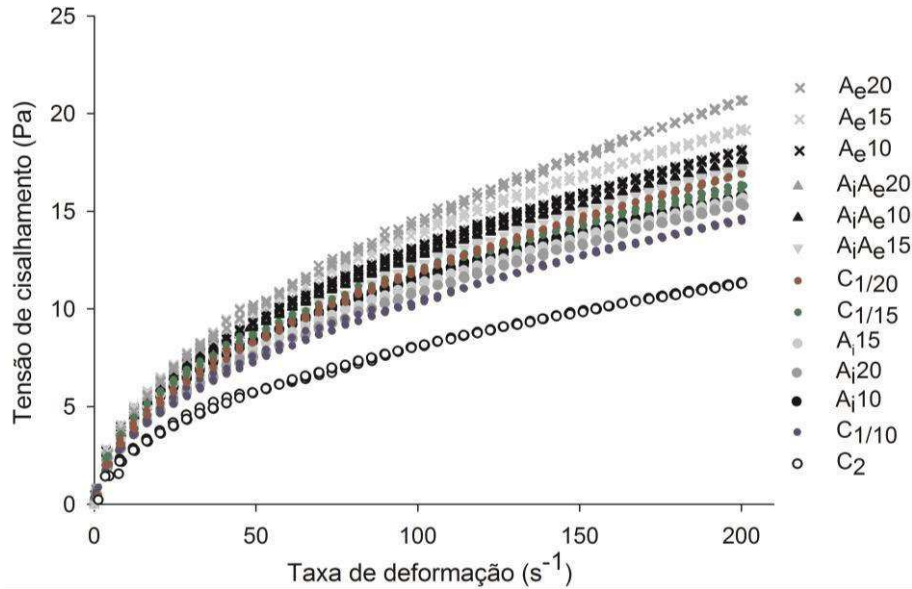


Figura 1.11. Reogramas com valores médios de tensão de cisalhamento (τ , Pa) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) para as emulsões $A_i/O/A_e$ e O/A_e (controle C_2), a 25 °C, no tempo de armazenamento de 1 dia.

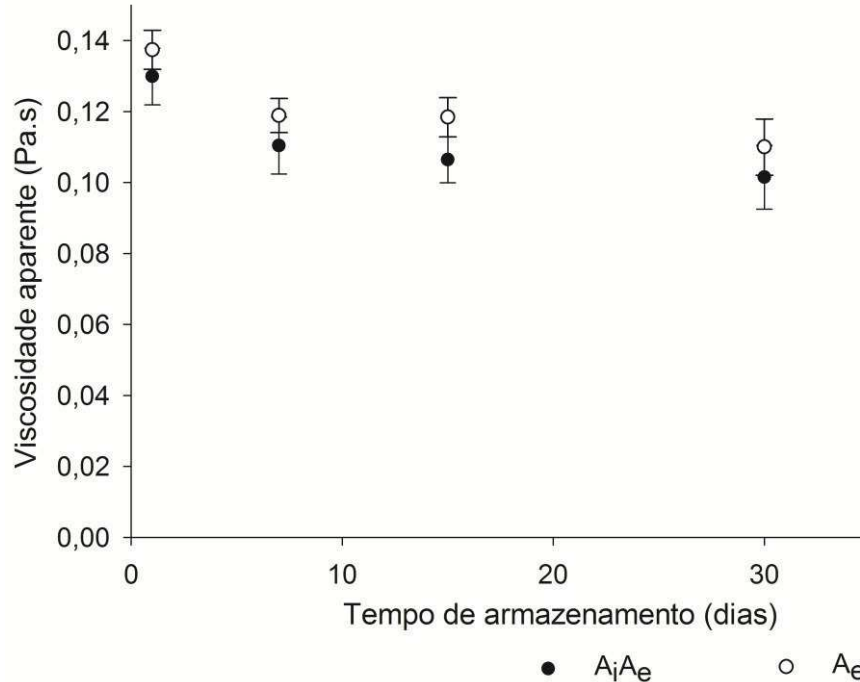


Figura 1.12. Viscosidade aparente (η_{100}), a 100 s⁻¹, em função do tempo de armazenamento, em dias, para emulsões contendo $FeSO_4$ na fase aquosa externa (A_iA_e e A_e).

Emulsões A/O/A como carreador de FeSO₄ em diferentes fases altera os limiares hedônicos em sobremesa láctea

1. INTRODUÇÃO

O procedimento de fortificação de alimentos com ferro é uma prática eficaz na prevenção da anemia ferropriva. Entretanto, os compostos de ferro de maior biodisponibilidade (como por exemplo, FeSO₄) são solúveis em água, podendo assim, reagir com os componentes do alimento. Na maioria das vezes, esta reação provoca alterações nas características sensoriais do produto adicionado de sais de ferro, como por exemplo, sabores indesejáveis e mudanças na coloração, afetando diretamente na aceitabilidade pelos consumidores (Hurrell, 2002).

Para a adição destes compostos em uma matriz alimentar, minimizando as alterações sensoriais do produto, recomenda-se o emprego de veículos carreadores, na forma de sistema coloidal, visando assim, “mascarar” as alterações sensoriais indesejáveis (Fricker et al., 2010). Dentre os principais sistemas estudados, a estrutura da emulsão dupla pode ser uma alternativa eficaz, uma vez que, substâncias podem ser incorporadas nas fases interna, intermediária e/ou externa, sendo veículos para compostos não-polares e polares. Desta forma, o uso de emulsões duplas em formulação de produtos alimentícios carreadores de compostos de interesse por alegações de saúde, é uma alternativa com grande potencial (Leal-Calderon et al., 2007; Dickinson, 2011; McClements, 2016; Muschiolik & Dickinson, 2017).

Um dos principais fatores relacionados com os potenciais de aplicação das emulsões duplas é o impacto direto que este sistema coloidal acarreta na percepção sensorial pelos consumidores, podendo assim comprometer na aceitabilidade ou até mesmo propiciar a rejeição sensorial ao ser incorporado em uma matriz alimentar. Para o sistema de emulsão dupla, coexistem na literatura pesquisadores que afirmam que a inserção de um determinado composto (estímulo) na fase aquosa interna tende a realçar a percepção sensorial em relação às características relacionadas ao sabor (Lad et al., 2012; Rocha-Selmi et al., 2013a;b; Santos et al., 2014; 2015; Chiu et al., 2015; Oppermann et al., 2016). E pesquisadores que acreditam que a incorporação de

compostos, na fase aquosa interna da emulsão dupla, tende a “mascarar” as alterações sensoriais provenientes destes compostos e que podem ser indesejáveis aos consumidores (Bonnet et al., 2009; Fang & Bhandari, 2010; Dickinson, 2011). Além disso, a literatura científica ainda não elucidou o efeito na percepção sensorial, quando compostos bioativos são incorporados somente na fase aquosa externa.

Entretanto, Prescott et al. (2005) afirmam que conhecer apenas a concentração mínima do estímulo, na qual os indivíduos irão perceber as primeiras alterações sensoriais (limiar de detecção), não implica necessariamente que estas primeiras alterações irão comprometer na aceitação sensorial do produto. Sendo assim, se faz necessário investigar a concentração mínima do estímulo na qual começa a ocorrer alteração significativa na aceitabilidade ou o ponto em que começa a acarretar na rejeição sensorial do produto (Lima Filho et al., 2015).

Diante deste contexto, o presente trabalho objetiva aplicar a metodologia dos limiares hedônicos proposta por Lima Filho et al. (2015) visando determinar qual a concentração máxima de FeSO_4 pode ser inserida na sobremesa láctea do tipo flan sabor morango, através do sistema de emulsão dupla, sem comprometer na aceitabilidade (LAC) e acarretar na rejeição sensorial pelos consumidores (LRH), estando o estímulo inserido nas diferentes fases aquosas que compõem o sistema de emulsão dupla (A/O/A).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil, pelo parecer de número 041414/2016. As avaliações foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da UFV, em cabines individuais e sob a luz branca.

A metodologia dos limiares hedônicos proposta por Lima Filho et al. (2015) foi aplicada em sobremesa láctea tipo flan sabor morango contendo emulsão dupla ($A_i/O/A_e$) carreadora de FeSO_4 , em diferentes localizações no sistema emulsionado.

Na prática, as emulsões $A_i/O/A_e$ foram incorporadas no flan sabor morango, com o intuito de determinar os limiares de aceitação comprometida (LAC) e rejeição hedônica (LRH), para concentração de FeSO_4 , quando o estímulo encontra-se

distribuído em diferentes locais no sistema, são estes: fase aquosa interna (A_i) e fase aquosa externa (A_e).

Adicionalmente, foram determinados os LAC's e LRH's para o FeSO_4 em flan de morango, estando o estímulo dissolvido na fase contínua da emulsão simples do tipo O/A e dissolvido apenas em água, com o intuito de verificar o efeito do sistema de emulsão dupla, ou seja, gotículas de água dispersas dentro de gotículas de óleo, nos limiares sensoriais hedônicos.

Foram realizados quatro ensaios sensoriais para determinar os limiares hedônicos do FeSO_4 em flan de morango, contendo o estímulo em diferentes sistemas: fase aquosa interna da emulsão dupla (ensaio 1), fase aquosa externa da emulsão dupla (ensaio 2), fase contínua da emulsão simples do tipo O/A (ensaio 3) e solução de FeSO_4 (ensaio 4).

Para cada tipo de sistema avaliado, a determinação do LAC e LRH foi conduzida utilizando diferentes equipes de consumidores. Desta forma, visou-se evitar possíveis efeitos de tendência por experiência prévia dos consumidores e/ou alterações dos resultados devido à fadiga sensorial. A faixa etária entre as diferentes equipes foi praticamente a mesma para evitar efeitos de variação na aceitabilidade sensorial, devido à diferença de idade.

As concentrações do FeSO_4 presente na sobremesa láctea do tipo flan sabor morango foram iguais em todos os ensaios, a fim de possibilitar a comparação direta entre os resultados obtidos.

2.1 Materiais

O sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi adquirido da Sigma-Aldrich. O emulsificante ésteres de poliglicerol de ácido polirricinoleico (PGPR) foi doado pela empresa Granolab/Granotec. Tween 80 (Sigma Aldrich, > 58% ácido oleico, CMC 0,012 mM (20-25°C), BHL 15,0). Os polímeros goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*, < 1% de cinzas) e gelatina (pele de porco, Tipo A, Bloom - 300) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais produtos químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas em água filtrada. A fração oleosa foi composta por óleo de girassol comprado em um supermercado da cidade de Viçosa-MG, Brasil. O leite condensado (marca Itambé), o creme de leite (17% de gordura, marca Itambé), a gelatina sabor morango (marca Royal) e a essência sabor morango (marca fine line) também foram comprados em um supermercado local.

2.1.1 Preparo das emulsões

As emulsões duplas do tipo $A_i/O/A_e$ (ensaios 1 e 2) carreadoras de $FeSO_4$ foram preparadas por meio do procedimento de dois passos. Primeiramente, foi preparada uma emulsão simples do tipo A_i/O (emulsão primária), em seguida, esta emulsão foi incorporada como “fase dispersa” em uma segunda fase aquosa (A_e). O sistema formado continha 15, 30 e 55% (m/m) de fase aquosa interna, fase oleosa e fase aquosa externa, respectivamente, totalizando 100%.

Para a elaboração das emulsões primárias (A_i/O), foi preparada uma solução aquosa por meio da dissolução de 0, 0,35, 6,32, 12,29, 18,26 ou 24,23 mg de $FeSO_4$ para cada 10 g de emulsão dupla, 0,75% (m/m) de gelatina e 0,05% (m/m) de sorbato de potássio em água filtrada a 90°C. A gelatina foi hidratada durante 10 min, seguido por agitação magnética durante 30 min (Sapei et al., 2012). A gelatina foi incorporada à fase aquosa interna com o intuito de melhorar a estabilidade cinética da emulsão, devido à tendência de retardar a coalescência das gotículas aquosa (Oppermann et al., 2015).

Para as emulsões contendo $FeSO_4$ localizados na fração aquosa externa (A_e), foram adicionados, à fase aquosa interna, uma concentração específica de lactose, com o intuito de equilibrar a pressão osmótica entre as fases aquosa interna e externa e, assim, minimizar a transferência de matéria entre as duas fases (Bonnet et al., 2009). As concentrações de lactose foram 0,046, 0,827, 1,607, 2,388 e 3,169 mmol/L, referente aos tratamentos em ordem crescente de concentração do estímulo, respectivamente.

A fração oleosa (O) foi preparada por meio da dissolução de 3% (m/m) de poli-ricinoleato de poliglicerol (PGPR) em óleo de girassol. Este sistema foi submetido a uma agitação magnética durante 30 min, a temperatura de 90 °C. A escolha da concentração de PGPR levou em consideração estudos anteriores, nos quais foi verificado a formação de emulsões contendo gotículas de menor tamanho e distribuição homogênea nessa concentração de PGPR (Márquez & Wagner, 2010; O'Reagan & Mulvihill, 2010).

As emulsões primárias foram preparadas a partir da dispersão lenta de 1,5 g de solução aquosa (A_i) em 3 g de fração oleosa (O), sob agitação constante, em homogeneizador de alta velocidade (Homogenizador T18 Basic Ultra Turrax – IKA) operando a 20000 rpm durante 4 min. As emulsões resultantes foram arrefecidas à 4 °C, durante uma hora, para assegurar uma completa gelificação da gelatina (Schuster et al., 2012).

Para a elaboração das emulsões duplas ($A_i/O/A_e$), primeiramente, foi preparado uma solução aquosa externa (A_e) pela dissolução de 0, 0,35, 6,32, 12,29, 18,26 ou 24,23 mg de $FeSO_4$ para cada 10 g de emulsão dupla, 3% (m/m) de tween 80, 0,75% (m/m) de goma guar e 0,05% (m/m) de sorbato de potássio. Este sistema foi submetido a uma agitação magnética, durante 30 min à 50°C. A goma guar foi utilizada com o intuito de aumentar a viscosidade da fase aquosa externa, logo, melhorar a estabilidade dos sistemas.

Para as emulsões contendo Fe^{2+} localizados na fração aquosa interna foram adicionados, na fase aquosa externa, uma concentração específica de lactose para cada emulsão, com o intuito de equilibrar a pressão osmótica entre as fases aquosas (interna e externa) e, assim, minimizar a transferência de matéria entre as duas fases (Bonnet et al., 2009). As concentrações de lactose foram 0,153, 3,031, 5,894, 8,757 e 11,620 mmol/L, referente aos tratamentos em ordem crescente de concentração do estímulo, respectivamente.

As emulsões duplas foram preparadas a partir da dispersão lenta 4,5 g da emulsão primária (A_i/O) em 5,5 g de solução aquosa externa (A_e). Este sistema foi agitado em homogeneizador de alta velocidade, operando a 18000 rpm durante 4 min. As emulsões formadas foram armazenadas à 4 °C.

A Figura 2.1 é uma representação esquemática das etapas de preparo das emulsões duplas.

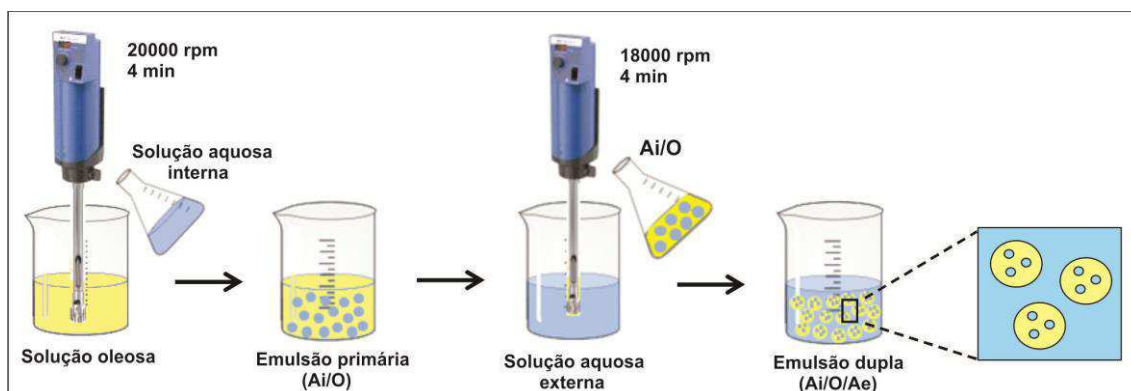


Figura 2.1. Fluxograma do procedimento de preparo das emulsões duplas.

No preparo da emulsão simples (O/A) (ensaio 3), 3 g de óleo foi disperso lentamente em 7 g de fase aquosa, contendo 0,35, 6,32, 12,29, 18,26 ou 24,23 mg de $FeSO_4$ para cada 10 g de emulsão, 3% (m/m) de tween 80, 0,75% (m/m) de goma guar e

0,05% (m/m) de sorbato de potássio. Este sistema foi agitado em homogeneizador de alta velocidade operando a 18000 rpm durante 4 min. As emulsões formadas foram armazenadas à 4 °C.

Para os diferentes tipos de sistemas emulsionados ($A_i/O/A_e$ e O/A), foram preparadas emulsões sem adição do estímulo ($FeSO_4$). Estes sistemas foram posteriormente utilizados na elaboração dos flans sabor morango, classificados como amostras controle.

2.1.2 Preparo do flan

Os flans sabor morango foram compostos por leite condensado (35%), água (34,5%), creme de leite (17,5%), emulsão $A_i/O/A_e$ ou O/A (10%), gelatina sabor morango (3%) e essência sabor morango (1%, m/m). Para o preparo, inicialmente a gelatina foi solubilizada em água fervente e, em seguida, adicionada sob agitação à mistura formada pelo leite condensado e creme de leite. Por último, foram adicionados a emulsão e a essência, seguido por uma homogeneização durante 1 min e armazenado a aproximadamente 8 °C até a realização dos testes sensoriais.

As amostras de flan sem adição do sistema emulsionado (ensaio 4) foram constituídas por leite condensado (35%), creme de leite (35%), água (27%), gelatina sabor morango (3%), essência sabor morango (1%, m/m) e 0, 0,07, 1,27, 2,47, 3,67 ou 4,87 mg de $FeSO_4$ para cada 100 g de flan. As condições de processo foram similares às mencionadas anteriormente. A quantidade de creme de leite foi estimada de forma a manter o mesmo teor de gordura para as amostras de flan sem e com adição de emulsão.

2.2 Limiar de aceitação comprometida (LAC) e limiar de rejeição hedônica (LRH)

O procedimento para a determinação do LAC e do LRH para o $FeSO_4$ adicionado no flan sabor morango através de diferentes sistemas físico-químicos foi baseado na metodologia proposta e validada por Lima Filho et al. (2015; 2017).

Para a cada tipo de ensaio experimental, cada equipe de consumidores realizaram cinco sessões do teste de aceitação, uma para cada concentração de $FeSO_4$. Em cada sessão, foram apresentados aos consumidores duas formulações de flan de morango, uma com a inserção de $FeSO_4$ (estímulo) e outra sem a inserção de $FeSO_4$ (controle) (Figura 2.2). As formulações foram codificadas com número de três dígitos aleatórios. Os consumidores foram instruídos a provar as amostras e avaliar a

aceitabilidade sensorial, utilizando a escala hedônica de nove pontos (variando de “desgostei extremamente” nota 1 a “gostei extremamente” nota 9).

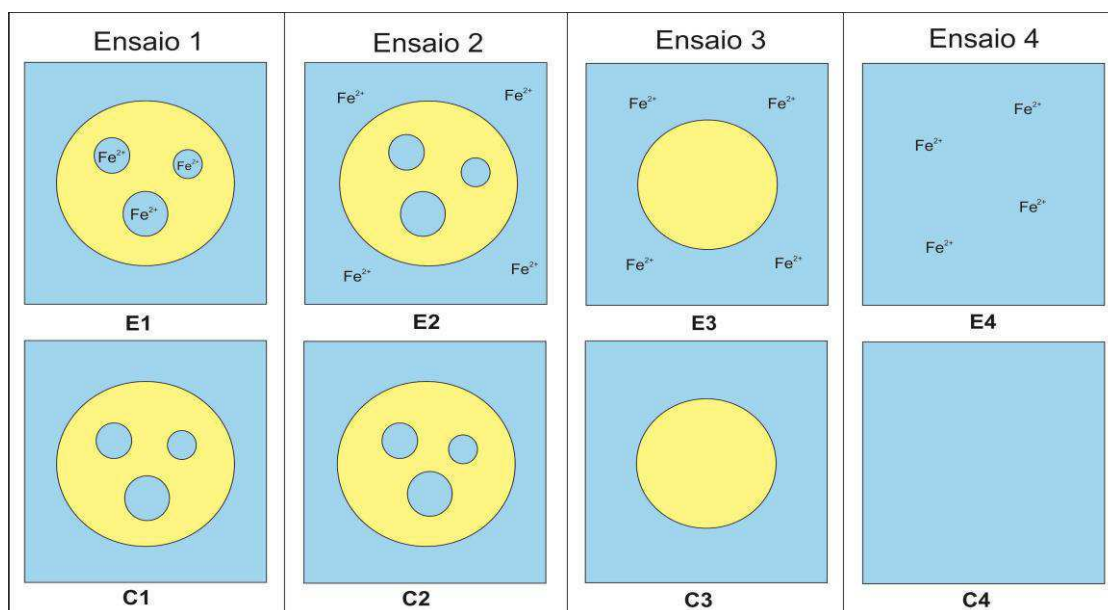


Figura 2.2. Representação esquemática dos sistemas emulsionados e da solução de FeSO_4 inserida no flan sabor morango, em cada ensaio experimental.

*E: estímulo; C: controle.

As concentrações de FeSO_4 foram apresentadas em ordem crescente e a posição das formulações foi aleatorizada dentro de cada sessão. As equipes foram constituídas por 97 consumidores de ambos os sexos, com idade variando de aproximadamente 18 a 55 anos, em todos os ensaios. Todas as formulações foram apresentadas aos consumidores na mesma temperatura ($\sim 8^\circ\text{C}$).

Para a análise estatística dos resultados e determinação do LAC de cada ensaio experimental, para cada sessão, foi calculada a diferença entre as notas hedônicas da formulação controle e da formulação estímulo, em seguida realizou-se o teste t de amostras pareadas. Com os valores de t obtidos, foi elaborado um gráfico do valor t de cada sessão (eixo Y_1) em função da concentração de FeSO_4 (eixo X). O ponto de corte, ou seja, onde começa a ocorrer diferença significativa entre as formulações, em relação à aceitação foi representado no gráfico por uma linha tracejada, referente ao valor t tabelado, ao nível de 5% de probabilidade ($t = 1,98$). A fim de determinar o ponto exato no qual começa a ocorrer diferença significativa entre as formulações, ajustou-se um modelo de regressão nos pontos do gráfico. Para a seleção do modelo que melhor se ajuste aos dados, foram avaliados a significância dos coeficientes de regressão e do

coeficiente de determinação R^2 ($SQ_{regressão}/SQ_{total}$) (Lima Filho et al., 2015). As análises para ajuste de modelo proposto foi realizada utilizando o software SAS[®] (Statistical Analysis System – SAS), versão 9.3, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

A partir da equação do modelo obtido, foi calculada a concentração de $FeSO_4$ correspondente ao ponto em que o valor de t calculado se torna igual ao valor de t padrão ($p = 0,05$), isto é, o ponto em que começa a ocorrer alteração significativa na aceitabilidade sensorial do flan de morango, devido às alterações sensoriais ocasionadas pela inserção do $FeSO_4$.

Para determinar o LRH de ensaio experimental, foi plotado um segundo gráfico referente à pontuação média hedônica das amostras de flan de morango contendo o $FeSO_4$ (eixo Y_2) em função da concentração de $FeSO_4$ (eixo X). O ponto de corte do eixo Y_2 foi representado no gráfico por uma linha tracejada referente à nota hedônica 5 (termo hedônico "indiferente"), indicando o ponto de transição entre a aceitação e a rejeição sensorial do produto (Della Lucia et al., 2013; 2014).

Para determinar a concentração mínima de $FeSO_4$ suficiente para acarretar em alterações indesejáveis nas características sensoriais do flan, como por exemplo, aparecimento de sabor metálico, levando à rejeição sensorial do produto, um modelo de regressão foi ajustado aos pontos do gráfico. Os critérios de seleção do modelo que melhor se ajustou aos dados foi o mesmo utilizado para a determinação do LAC.

A partir da equação do modelo obtido, calculou-se a concentração mínima de $FeSO_4$ correspondente ao ponto em que os consumidores atribuíram ao flan de morango, nota hedônica igual a 5, representando o valor do LRH.

Com este estudo foi possível estimar qual a concentração mínima de $FeSO_4$, estando este incorporado em diferentes localizações no sistema emulsionado, poderá ser adicionado em uma determinada matriz alimentar, especificamente sobremesa láctea, sem comprometer na aceitação pelos consumidores (LAC) e resultar na rejeição sensorial (LRH) do produto contendo ferro.

3. RESULTADOS

3.1 Limiar de aceitação comprometida (LAC) e limiar de rejeição hedônica (LRH)

A Figura 2.3 representa os valores de t calculados (eixo Y_1) em função da concentração de $FeSO_4$ (eixo X) das amostras estímulo para todos os sistemas avaliados (ensaios 1 a 4). Para o conjunto de dados relacionados aos valores de t, o modelo de segunda ordem foi ajustado adequadamente quanto à significância dos parâmetros de regressão ($p \leq 0,05$) em todos os ensaios experimentais, apresentando coeficiente de determinação superior ou igual a 88,40% (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Modelos de regressão para os valores de t calculados (Y_1) em função da concentração de $FeSO_4$ (X, mg/100g de flan de morango) para cada tipo de ensaio experimental, seus coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p)

Ensaio	Localização $FeSO_4$	Modelo de regressão	R^2	p(F)
1	Fase aquosa interna da emulsão $A_i/O/A_e$	$Y_1 = 4,944 + 1,704 X - 0,037 X^2$	0,979	0,020
2	Fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$	$Y_1 = - 10,637 + 2,229 X - 0,043 X^2$	0,996	0,049
3	Fase contínua da emulsão O/A	$Y_1 = 2,009 X - 0,050 X^2$	0,962	0,021
4	Solução	$Y_1 = 2,084 X - 0,048 X^2$	0,884	0,048

Substituindo, em cada equação quadrática apresentada na Tabela 2.1, o valor de t (Y_1) por 1,98, encontrou-se o LAC de 6,46, 0,99 e 0,97 mg de $FeSO_4$ por 100g de flan de morango, para os sistemas contendo o estímulo na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$ (Figura 2.1B, ensaio 2), fase contínua da emulsão O/A (Figura 2.1C, ensaio 3) e para o sistema contendo apenas a solução de $FeSO_4$ (Figura 2.1D, ensaio 4), respectivamente. Os LAC's obtidos para cada ensaio experimental representam a concentração mínima do $FeSO_4$, na qual a aceitação sensorial da sobremesa láctea tipo flan sabor morango começa a ser comprometida. Desta forma, a adição de qualquer concentração de $FeSO_4$ inferior ao valor obtido do LAC, referente a cada tipo de sistema, não altera a aceitabilidade sensorial do flan de morango.

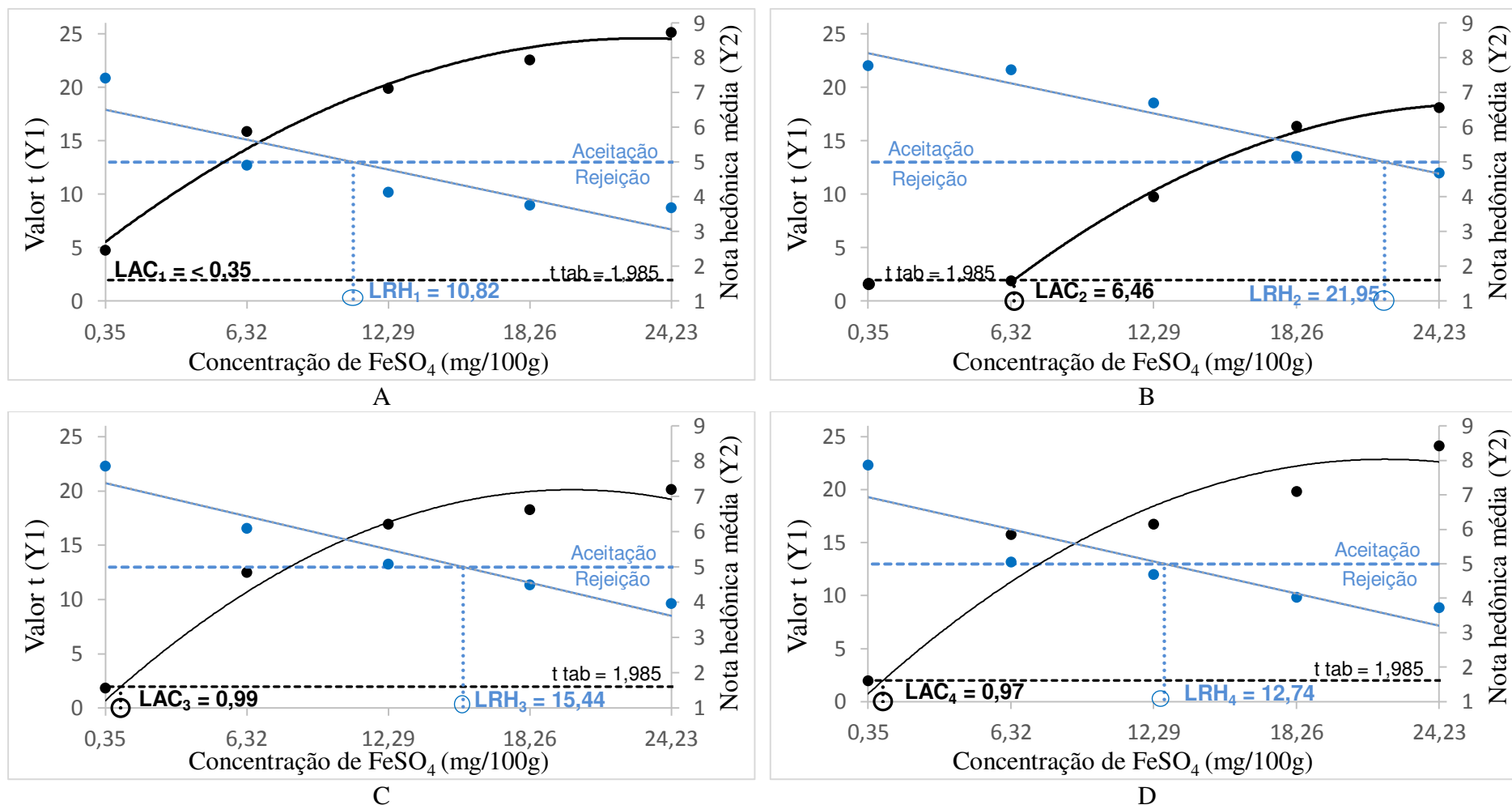


Figura 2.3. Valores de t calculados e notas hedônicas médias em função das concentrações de FeSO₄ das amostras estímulo referente a cada sistema.

Linhas tracejadas preta e azul representam o valor t tabelado a 5% de significância para 96 graus de liberdade ($t=1,985$) e a nota hedônica média 5, referente ao termo hedônico “indiferente”, respectivamente. A: fase aquosa interna da emulsão dupla (ensaio 1); B: fase aquosa externa (ensaio 2); C: fase contínua da emulsão simples do tipo O/A (ensaio 3) e D: solução de FeSO₄ (ensaio 4).

Para os flans contendo FeSO₄ na fase aquosa interna da emulsão A_i/O/A_e (ensaio 1), verificou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a amostra estímulo, contendo a menor concentração de FeSO₄ (0,35 mg de FeSO₄/100g), e a amostra controle (sem adição de FeSO₄), pelo teste de t pareado. Isto indica que, para este sistema específico, a menor concentração avaliada do estímulo foi suficiente para comprometer a aceitabilidade sensorial do flan de morango, não sendo possível determinar o valor exato do LAC₁, sendo este inferior a 0,35 mg de FeSO₄ por 100g de flan (Figura 2.3A).

As diferentes localizações do estímulo na emulsão A_i/O/A_e (ensaios 1 e 2) acarretou em diferença na magnitude da aceitabilidade sensorial das amostras de flans de morango. Para o sistema contendo FeSO₄ na fase aquosa interna da emulsão A_i/O/A_e, verificou-se que o termo hedônico médio do flan de morango, com a menor concentração avaliada de FeSO₄, visto a não obtenção do valor exato do LAC (LAC₁ < 0,35 mg de FeSO₄/100g) foi entre os termos “gostei ligeiramente” (nota hedônica 6) e “gostei moderadamente” (nota hedônica 7). Já o sistema contendo FeSO₄ dissolvido na fase aquosa externa, o termo hedônico médio do flan de morango com concentração de FeSO₄ referente ao LAC₂ (6,46 mg de FeSO₄/100g) foi entre “gostei moderadamente” (nota hedônica 7) e “gostei muito” (nota hedônica 8) (Figura 2.3A e B, eixo Y₂).

Ainda na Figura 2.3, a influência da concentração do FeSO₄ (estímulo) na aceitabilidade sensorial dos flans sabor morango, representado pela média das notas hedônicas (eixo Y₂), também foi modelada estatisticamente. O modelo de primeira ordem foi ajustado adequadamente quanto à significância dos parâmetros de regressão ($p < 0,05$) em todos os ensaios (1 a 4), apresentando coeficiente de determinação superior ou igual a 77,20% (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Modelos de regressão para as notas hedônicas médias (Y₂) em função da concentração de FeSO₄ (X, mg/100g de flan de morango) para cada tipo de ensaio experimental, seus coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p)

Ensaio	Localização FeSO₄	Modelo de regressão	R²	p(F)
1	Fase aquosa interna da emulsão A _i /O/A _e	$Y_1 = 6,562 - 0,144 X$	0,772	0,049
2	Fase aquosa externa da emulsão A _i /O/A _e	$Y_1 = 8,189 - 0,145 X$	0,94	0,007
3	Fase contínua da emulsão O/A	$Y_1 = 7,437 - 0,158 X$	0,932	0,008
4	Solução	$Y_1 = 6,989 - 0,156 X$	0,798	0,041

Para os diferentes tipos de sistemas avaliados (ensaios 1 a 4) foi possível obter os LRH's substituindo em cada equação linear apresentada na Tabela 2.2, o valor de Y_2 por 5 (termo hedônico "indiferente"). Desta forma, o LRH para o FeSO_4 em sobremesa láctea tipo flan sabor morango foi de 10,82, 21,95, 15,44 e 12,74 mg de FeSO_4 por 100g de flan, referente aos sistemas contendo o estímulo na fase aquosa interna da emulsão $A_i/O/A_e$ (Figura 2.3A, ensaio 1), fase aquosa externa (Figura 2.3B, ensaio 2), fase contínua da emulsão O/A (Figura 2.3C, ensaio 3) e para o sistema contendo apenas a solução de FeSO_4 (Figura 2.3D, ensaio 4), respectivamente. Estes valores representam a concentração mínima de FeSO_4 necessária para ocorrer a rejeição sensorial do flan de morango.

4. DISCUSSÃO

As diferentes localizações do FeSO_4 na emulsão $A_i/O/A_e$ (ensaios 1 e 2) e os diferentes tipos de sistemas avaliados (ensaios 1 a 4) acarretaram em valores distintos dos limiares hedônicos (LAC e LRH) em flan sabor morango.

Dentre os ensaios estudados, as amostras de flans contendo o estímulo na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$ (ensaio 2) propiciaram a obtenção de maior valor do LAC (6,46 mg de FeSO_4 por 100g de flan). Sendo este valor aproximadamente 6 vezes maior, comparado com os LAC's obtidos para os sistemas contendo FeSO_4 dissolvido na fase contínua da emulsão simples do tipo O/A (ensaio 3) e para os flans contendo apenas a solução de FeSO_4 (ensaio 4). Isto indica que o tipo de sistema carreador do estímulo influencia diretamente na percepção sensorial, e consequentemente na aceitabilidade pelos consumidores. Além disso, ao incorporar FeSO_4 na fase aquosa externa da emulsão dupla, uma maior concentração do estímulo pode ser adicionado, sem comprometer na aceitação sensorial do flan.

De acordo com Dickinson (2011) sistemas complexos, como por exemplo emulsão dupla, podem ser utilizados para influenciar na percepção sensorial do alimento, uma vez que tendem a modificar a extensão em que a fase aquosa, contendo o estímulo sensorial, irá interagir com as superfícies orais.

Para as amostras de flans nas quais o FeSO_4 foi inserido na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$, o maior valor obtido do LAC, pode ser resultado da menor

percepção dos consumidores em relação às alterações sensoriais na sobremesa láctea (como por exemplo, coloração marrom, gosto amargo e sabor metálico), provavelmente causadas pela inserção do FeSO_4 . Estas alterações são, na maioria das vezes, indesejáveis aos consumidores, comprometendo na aceitabilidade dos alimentos adicionados de FeSO_4 ou até mesmo conferindo a rejeição sensorial pelos consumidores. Esta menor percepção provavelmente resultou da liberação contínua dos cátions de Fe^{2+} . Segundo Mosca et al. (2010), a estimulação prolongada e contínua dos receptores do gosto tende a diminuir a percepção sensorial, devido à menor atividade nervosa.

Comparando os valores obtidos dos LAC's referentes aos sistemas contendo FeSO_4 na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$ ($\text{LAC}_2 = 6,46 \text{ mg}/100\text{g}$) e dissolvido na fase contínua da emulsão O/A ($\text{LAC}_3 = 0,99 \text{ mg}/100\text{g}$) verificou-se que a presença das gotículas de água dispersas na fração oleosa também favoreceu na redução da percepção sensorial dos atributos característicos do FeSO_4 , visto o maior valor do LAC_2 . Uma possível explicação para essa redução na percepção sensorial pode ser devido ao procedimento de mastigação, o qual levou à coalescência das gotículas oleosas, com posterior liberação e coalescência das gotículas de água, ocasionando a diluição do FeSO_4 ao entrar em contato com as papilas gustativas.

Para os flans de morango contendo FeSO_4 na fase aquosa interna da emulsão $A_i/O/A_e$ (ensaio 1), a não obtenção do LAC, sendo este inferior à $0,35 \text{ mg}$ de FeSO_4 por 100g de flan (Figura 2.3A), indicou que este sistema específico, comparado com os demais em estudo, realçou a percepção dos consumidores, em relação às alterações sensoriais no flan (coloração marrom, gosto amargo e sabor metálico), provavelmente causadas pela inserção do FeSO_4 . Estas alterações são, na maioria das vezes, indesejáveis aos consumidores, podendo comprometer na aceitabilidade dos alimentos adicionados de sais de ferro ou até mesmo conferir a rejeição sensorial. Como nestes sistemas a liberação do estímulo depende da coalescência das gotículas oleosas e aquosas e/ou da difusão dos cátions Fe^{2+} para o meio externo, o contato do cátion com as papilas gustativas será descontínuo. Desta forma, a cada pulso de liberação do estímulo, o efeito da percepção do atributo sensorial será acumulativo, e com intensidade aparentemente maior, acarretando no comprometimento da aceitabilidade sensorial do flan de morango (Busch et al., 2009, Burseg et al., 2010a, 2010b e 2011).

Resultados similares foram obtidos por Lad et al. (2012), Chiu et al. (2015) e Oppermann et al. (2016) ao avaliarem a eficácia da emulsão dupla na redução do teor de

sódio. Todos os autores verificaram uma maior percepção do gosto salgado para as emulsões contendo NaCl aprisionado na fase aquosa interna.

A concentração mínima de FeSO_4 responsável por conferir a rejeição sensorial do flan de morango também foi obtida para cada tipo de ensaio experimental (1 a 4), e está representado pelos LRH's (Figura 2.3, conjunto de dados em azul). O sistema contendo FeSO_4 na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$ (ensaio 2) apresentou LRH igual a 21,95 mg de FeSO_4 por 100 g de flan (Figura 2.3B), sendo este valor aproximadamente 2 vezes maior do que o LRH obtido para o flan de morango contendo o estímulo na fase aquosa interna (Figura 2.3A), e aproximadamente 1,5 vezes maior do que os valores dos LRH's encontrados para os sistemas contendo emulsão O/A como veículo carreador do estímulo (Figura 2.3C) e para o flan contendo apenas a solução de FeSO_4 (Figura 2.3D).

Os valores do LRH obtidos para cada tipo de ensaio experimental corroboram com os resultados dos LAC's, realçando a suposição apresentada em relação às diferentes percepções sensoriais pelos consumidores, quando o estímulo encontra-se localizado em diferentes fases na emulsão $A_i/O/A_e$ e pelos diferentes tipos de sistemas carreadores de FeSO_4 .

A inserção do FeSO_4 na fase aquosa externa da emulsão dupla permitiu adicionar uma maior concentração do estímulo, comparado com os demais sistemas experimentais, sem comprometer a aceitação (LAC) e resultar na rejeição sensorial do flan pelos consumidores (LRH).

Desta forma, os limiares hedônicos obtidos mostraram que é possível manipular a percepção sensorial dos atributos característicos do FeSO_4 e, conseqüentemente permitir o desenvolvimento de alimentos adicionados de ferro, especificamente sobremesa láctea do tipo flan sabor morango, sem comprometer a aceitabilidade sensorial pelos consumidores, a partir do local em que o FeSO_4 será inserido e das diferenças estruturais do sistema emulsionado.

5. CONCLUSÃO

As diferentes localizações do FeSO_4 na emulsão $A_i/O/A_e$ e os diferentes tipos de sistemas emulsionados acarretaram em valores distintos dos limiares hedônicos (LAC e

LRH) em flan sabor morango. A inserção de FeSO_4 na fase aquosa interna da emulsão $A_i/O/A_e$ realçou a percepção sensorial das alterações indesejáveis no flan, comprometendo a aceitabilidade sensorial da sobremesa láctea. Já a adição do estímulo na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$ proporcionou a obtenção dos maiores valores dos limiares hedônicos, comparado com os demais ensaios avaliados. Portanto, concluiu-se que este sistema contribuiu na redução da percepção dos consumidores, em relação às alterações sensoriais no flan, e conseqüentemente favoreceu na aceitabilidade pelos consumidores.

A partir dos valores obtidos dos limiares afetivos, verificou-se que o FeSO_4 pode ser carregado na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$, até uma determinada concentração (LAC), sem afetar na qualidade sensorial da sobremesa. Para este sistema específico, qualquer adição de FeSO_4 inferior à 6,46 mg/100g de flan ou 21,95 mg/100g de flan, não irá comprometer na aceitabilidade sensorial ou acarretar na rejeição pelos consumidores, respectivamente. Desta forma, o sistema de emulsão dupla apresenta potencial de aplicação no setor de fortificação de alimentos com FeSO_4 , quando veiculado na fase aquosa externa da emulsão $A_i/O/A_e$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bonnet, M.; Cansell, M.; Berkaoui, A.; Ropers, M.H.; Anton, M.; Leal-Calderon, F. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.92–101, 2009.

Burseg, K.M.M.; Brattinga, C.; Kok, P.M.T.; Bult, J.H.F. Sweet taste enhancement through pulsatile stimulation depends on pulsation period not on conscious pulse perception. *Physiology & Behavior*. v.100, n.4, p.327-331, 2010a.

Burseg, K.M.M.; Camacho, S.; Knoop, J.; Bult, J.H.F. Sweet taste intensity is enhanced by temporal fluctuation of aroma and taste, and depends on phase shift. *Physiology & Behavior*. v.101, n.5, p.726-730, 2010b.

Burseg, K.M.M.; Camacho, S.; Bult, J.H.F. Effects of Pulsation Rate and Viscosity on Pulsation-Induced Taste Enhancement: New Insights into Texture–Taste Interactions *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.59 n.10, p.5548–53, 2011.

Busch, J.L.H.C.; Tournier, C.; Knoop¹, J.E.; Kooyman G. e Smit, G. Temporal Contrast of Salt Delivery in Mouth Increases Salt Perception. *Chemical Senses*, v.34, p.341–348, 2009

Chiu, N.; Hewson, L; Fisk, I.; Wolf, B. Programmed emulsions for sodium reduction in emulsion based foods. *Food & Function*, v. 6, p. 1428-1434.

Della Lucia, S.M.; Minim, V.P.R.; Silva, C.H.O.; Minim, L.A.; Cipriano, P.A. Ordered probit regression analysis of the effect of brand name on beer acceptance by consumers. *Food Science and Technology*, v.33, n.3, p.586–591, 2013.

Della Lucia, S.M.; Minim, V.P.R.; Silva, C.H.O.; Minim, L.A.; Cipriano, P.A. Use of relative risk test to evaluate the influence of the brand on beer acceptability. *Semina: Ciências Agrária*, v.35, n.1, p.267–276, 2014.

Dickinson, E. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, v.6, p. 1–11, 2011.

Fang, Z.X.; Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols e a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 510-523, 2010.

Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharmaceutical Research*, v. 27, p. 1469–1486, 2010.

Hurrell, R.F. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutrition Reviews*, v. 60, p.7–15, 2002.

Kilcast, D.; Angus, F. *Reducing salt in foods: Practical strategies*. 1 st.ed. CRC Press, 2007. 383p.

Lad, M.; Hewson, L.; Wolf, B. Enhancing saltiness in emulsion based foods. *Flavour*. p.1-13, 2012.

Leal-Calderon, F.; Thivilliers, F.; Schmitt, V. Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v. 12, n. 4-5, p. 206-212, 2007.

Lima Filho, T.; Minim, V.P.R.; Silva, R.C.S.N.; Della Lucia, S.M.; Minim, L.A. Methodology for determination of two new sensory thresholds: Compromised acceptance threshold and rejection threshold. *Food Research International*, v.76, p. 561–566, 2015.

Lima Filho, T.; Della Lucia, S.M.; Minim, L.A.; Silva, R.C.S.N.; Silva, A.N.; Minim, V.P.R. Validation of the hedonic threshold methodology in determining the compromised acceptance threshold. *Journal of Sensory Studies*, v. 01, p.e12255, 2017.

Marquez, A.; Wagner, J. Rheology of double (W/O/W) emulsions prepared with soybean milk and fortified with calcium. *Journal of Texture Studies*. v. 41, p. 651- 671, 2010.

McClements, D.J. *Food emulsions: principles, practice and techniques*. 3 rd.ed. CRC Press, 2016.

Mosca AC, van de Velde F, Bult JHF, van Boekel MAJS, Stieger M. Enhancement of sweetness intensity in gels by inhomogeneous distribution of sucrose. *Food Quality and Preference* v. 21, p. 837–842, 2010.

Muschiolik, G., Dickinson, E. Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.16, p. 532-555, 2017.

O'regan, J.; Mulvihill, D.M. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: encapsulation and stability. *Food Research International*. v. 43, p. 224–231, 2010.

Oppermann, A.K.L.; Piqueras-Fiszman, B.; Graaf, C.; Scholten, E.; Stieger, M. Descriptive sensory profiling of double emulsions with gelled and non-gelled inner water phase. *Food Research International*. v. 85, p. 215-223, 2016.

Oppermann, A.K.L.; Renssena, M.; Schuchc, A.; Stiegerb, M.; Scholtena, E. Effect of gelation of inner dispersed phase on stability of (w1/o/w2) multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*. v. 48, p. 17–26, 2015.

Prescott, J., Norris, L.; Kunst, M.; Kim, S. Estimating a consumer rejection threshold for cork taint in white wine. *Food Quality and Preference*, v. 16, n. 1, p. 345-349, 2005.

Rocha-Selmi, G.A., Theodoro, A.C., Thomazini, M., Bolini, H.M.A., Favaro-Trindade, C.S. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. *Journal Food Engineering*, v. 119, p.28–32, 2013a.

Rocha-Selmi, G.A., Bozza, F.T., Thomazini, M., Bolini, H.M.A., Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. *Food Chemistry*, v.139, p.72–79, 2013b.

Santos, M.G., Carpinteiro, D.A., Thomazini, M., Rocha-Selmi, G.A., Cruz, A., Rodrigues, C.E.C., Favaro-Trindade, C.S. Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by complex coacervation and microcapsule application in chewing gum. *Food Research International*, v. 66, p.454–462, 2014.

Santos, M.G., Bozza, F.T., Thomazini, M., Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chemistry*, v.171, p.32–39, 2015.

Sapei, L.; Naqvi, M.A.; Rousseau, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 316–323, 2012.

Schuster, S.; Bernewitza, R.; Guthausenb, G.; Zappc, J.; Greinerd, A.M.; Köhlera, K.; Schuchmanna, H.P. Analysis of W1/O/W2 double emulsions with CLSM: Statistical image processing for droplet size distribution. *Chemical Engineering Science*. v. 81, p. 84–90, 2012.

CONCLUSÃO GERAL

Emulsões duplas (A/O/A) carreadoras de FeSO_4 em diferentes distribuições no sistema foram desenvolvidas e caracterizadas. As diferentes proporções de fase aquosa interna e externa e as localizações do FeSO_4 influenciaram na estrutura dos sistemas emulsionados, logo, afetaram as propriedades físico-químicas. A inserção de FeSO_4 na fase aquosa externa proporcionou menor valor (em módulo) do potencial ζ . Entretanto, esta redução na magnitude de cargas presentes na superfície das gotículas oleosas, e consequente redução na intensidade da força eletrostática de repulsão, não foram suficientes para ocasionar a desestabilização do sistema, durante 30 dias de armazenamento. Além disso, a estabilidade cinética foi favorecida pela predominância do caráter elástico.

A distribuição do FeSO_4 nas diferentes localizações na emulsão A/O/A acarretou em diferença na intensidade de percepção sensorial da cor branca e do sabor metálico. A inserção de FeSO_4 somente na fase aquosa externa propiciou reduzir ou até mesmo “mascarar” a percepção do sabor metálico. Já os tratamentos contendo FeSO_4 na fase aquosa interna apresentaram maior intensidade do sabor metálico, comparado com as demais emulsões A/O/A em estudo.

As diferentes localizações do cátion Fe^{2+} na emulsão A/O/A e os diferentes tipos de sistemas emulsionados também influenciaram na aceitabilidade sensorial da matriz alimentar em avaliação (sobremesa láctea tipo flan sabor morango), contendo emulsão carreadora de FeSO_4 .

A inserção de FeSO_4 na fase aquosa interna da emulsão A/O/A realçou a percepção sensorial das alterações indesejáveis no flan, comprometendo a aceitabilidade sensorial da sobremesa láctea. Já a adição do estímulo na fase aquosa externa da emulsão A/O/A proporcionou a obtenção dos maiores valores dos limiares hedônicos, comparado com os demais ensaios avaliados. Portanto, concluiu-se que este sistema contribuiu na redução da percepção dos consumidores, em relação às alterações sensoriais no flan sabor morango, e consequentemente favoreceu na aceitabilidade pelos consumidores.

A partir da associação das características físicas das emulsões e dos valores obtidos dos limiares hedônicos (LAC e LRH), verificou-se que o FeSO_4 pode ser carreado na fase aquosa externa da emulsão A/O/A, com menor risco de perda da

qualidade sensorial do produto. Desta forma, o sistema de emulsão dupla apresenta potencial de aplicação no setor de fortificação de alimentos com ferro, especificamente FeSO_4 , quando veiculado na fase aquosa externa da emulsão dupla.