



**Universidade de Aveiro**

Departamento de Química

2020

**Patrícia Daniela  
de Jesus Ribeiro**

**Desenvolvimento de novas formulações de  
snacks contendo clara de ovo**



**Patrícia Daniela  
de Jesus Ribeiro**

**Desenvolvimento de novas formulações de  
snacks contendo clara de ovo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Engenheira Cristina Fonseca, Diretora de Produção e Qualidade da empresa Fabridoce – Doces Regionais, Lda.

“Não importa se a estação do ano muda (...)  
Se o século vira, se o milénio é outro.  
Se a idade aumenta (...)  
Conserva a vontade de viver,  
Não se chega a parte alguma sem ela”

Fernando Pessoa

## **O Júri**

Presidente

**Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**

Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

**Prof. Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes**

Professor Auxiliar com Agregação da Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro (arguente)

**Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (orientador)

## **Agradecimentos**

Agradeço, em primeiro lugar, a todos os que, de uma forma geral, contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor Manuel António Coimbra, que orientou esta dissertação, acompanhando de perto o meu trabalho e transmitindo-me os seus sábios e experientes conhecimentos.

À Engenheira Cristina, à Engenheira Ana e à Engenheira Diana pelo excelente acolhimento na empresa, pela simpatia e motivação e por todos os conhecimentos e conselhos transmitidos no decorrer do estágio.

Ao Engenheiro Rui e à Dona Estela por me terem dado a oportunidade de efetuar esta dissertação em contexto empresarial e me terem feito sentir como parte da família Fabridoce.

Aos colaboradores da Fabridoce pela enorme simpatia e disponibilidade de ajuda. Em particular, à Gisela, à Clarinda, à Sandra, à Lúcia, à Alexandra, à Fátima, à Maria Cristina, à Vilma e à D. Licínia.

Aos meus amigos e colegas de curso, que fizeram com que o meu percurso académico fosse inesquecível.

Por último, mas não menos importante, aos meus familiares, principalmente aos meus pais, irmã e avós, que me apoiaram incondicionalmente durante o meu percurso académico e sempre me ajudaram a ultrapassar os momentos mais difíceis.

**Palavras-chave:** clara de ovo, desenvolvimento de produtos, *snacks*, aperitivos crocantes com clara e queijo, pastéis com clara, espinafres e pimentos, barra de sementes com clara

## **Resumo**

A presente dissertação de mestrado foi desenvolvida no âmbito do estágio curricular que decorreu na empresa Fabridoce – Doces Regionais, Lda. A Fabridoce utiliza maioritariamente gema para a preparação das várias gamas de produtos e pretende, no futuro, possuir autonomia para comprar ovos inteiros e dar uma utilização diferente à gema e à clara após a sua separação. No entanto, como a aplicação da gema é muito maior, este procedimento levará à acumulação de uma quantidade elevada de clara, para a qual ainda não tem uso. Deste modo, o objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de produtos com potencial de sucesso no mercado e que contivessem uma elevada quantidade de clara de ovo. Foram desenvolvidos três alimentos que se enquadram na categoria de *snacks*: 1) aperitivos crocantes com clara e queijo, 2) pastéis com clara, espinafres e pimentos e 3) barras de sementes com clara de ovo. Estes alimentos vão ao encontro dos produtos *ready-to-eat*, que são cada vez mais populares entre os consumidores devido à sua conveniência de consumo, facilidade de preparação e armazenamento.

Para o desenvolvimento dos produtos selecionados foi necessário compreender, em primeira instância, a composição, capacidade de formação de espumas, alergenicidade e despiste de contaminantes químicos e microbiológicos da clara de ovo. Foi realizado também um estudo de mercado para cada produto de forma a selecionar os ingredientes para a fase experimental.

Relativamente aos aperitivos crocantes com clara e queijo, foi possível desenvolver um produto sensorialmente apelativo, com uma textura crocante após produção e com a alegação nutricional “rico em proteína”. No entanto, os aperitivos ficaram ligeiramente duros após dois meses devido à retrogradação do amido. Concluiu-se que a formulação teria de ser modificada para inibir ou retardar este processo. Os pastéis com clara, espinafres e pimentos continham atributos sensoriais e nutricionais favoráveis, sendo aplicáveis as alegações nutricionais “rico em proteína” e “sem açúcares adicionados”. Contudo, o alimento possuía um prazo de validade bastante curto à temperatura de refrigeração, sendo a ultracongelação a solução mais viável para a sua conservação. No que diz respeito às barras de sementes com clara de ovo, conseguiu-se um produto consistente, sensorialmente satisfatório e com várias alegações nutricionais aplicáveis: “fonte em proteína/ rico em proteína”, “rico em fibra” e “baixo teor de sal”. Contudo, as barras ficaram secas, pois as formulações não ficaram equilibradas a nível do teor de proteína e gordura e apresentavam um prazo de validade demasiado curto tendo em conta a tipologia de produto. Em suma, os três produtos desenvolvidos têm potencial para virem a ser comercializados, tendo, no entanto, de ser melhorados.

**Keywords:** egg white, product development, snacks, egg white and cheese crispy appetizers, egg white, spinach and peppers pasties, egg white seed bars

**Abstract:** This master's Thesis was developed within an internship that took place at the company Fabridoce - Doces Regionais, Lda. Fabridoce uses yolk mainly for the preparation of several product ranges and intends, in the future, to have autonomy to buy whole eggs and give a different use of the yolk and the egg white after its separation. However, as the application of the yolk is much greater, this procedure will lead to the accumulation of a high amount of egg white, for which it has no use yet. Therefore, the aim of this project was the development of products with potential for success in the market and which contained a high amount of egg white. Three foods have been developed that fits into the category of snacks: 1) egg white and cheese crispy appetizers, 2) egg white, spinach and peppers pasties and 3) egg white seed bars. These foods are in concordance with ready-to-eat products, which are increasingly popular with consumers due to their convenience of consumption, easy preparation and storage.

For the development of the selected products it was necessary to understand, first of all, the composition, foaming capacity, allergenicity and screening of chemical and microbiological contaminants of egg white. A market study was also carried out for each product in order to select the ingredients for the experimental stage. Regarding egg white and cheese crispy appetizers, it was possible to develop a sensorially appealing product, with a crispy texture after production and with the “rich in protein” nutritional claim. However, the appetizers became slightly stiff after two months due to the starch retrogradation. It was concluded that the formulation would have to be modified to inhibit or delay this process. The egg white, spinach and peppers pasties contained favorable sensory and nutritional attributes, with the “rich in protein” and “no added sugars” nutritional claims being applicable. However, the food had a very short shelf life at refrigeration temperature, being deep-freezing the most viable solution for its conservation. Regarding egg white seed bars, a consistent and sensorially satisfactory product with several applicable “source of protein / rich in protein”, “rich in fiber” and “low salt content” nutritional claims was achieved. However, the bars were dry, because the formulations were not balanced in protein and fat content and showed a very short shelf life considering the product typology. In conclusion, the three products developed have the potential to be commercialized, however, they have to be improved.

# Índice

<b>Abreviaturas/Siglas .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. A Clara de Ovo (Albúmen).....</b>	<b>1</b>
1.1. Composição química .....	1
1.1.1. Proteínas .....	2
1.1.1.1. Principais proteínas.....	2
1.1.1.2. Proteínas minoritárias .....	5
1.1.2. Digestibilidade e qualidade das proteínas .....	9
1.1.3. Alergenicidade das proteínas.....	9
1.2. Propriedades .....	11
1.2.1. Emulsificação .....	11
1.2.2. Gelificação.....	11
1.2.3. Formação de espumas.....	13
1.3. Contaminantes e microrganismos.....	15
1.3.1. Contaminação química e microbiológica .....	15
1.3.2. Destruição de microrganismos .....	17
1.3.3. Minimização do crescimento microbiano.....	19
1.4. Produtos comerciais à base de clara de ovo .....	20
<b>2. Enquadramento do estágio .....</b>	<b>23</b>
2.1. Empresa Fabridoce – Doces Regionais, Lda. ....	23
2.2. Objetivo do estágio e atividades desenvolvidas .....	25
2.3. Produtos desenvolvidos, com vista a alegações nutricionais .....	26
2.3.1. Aperitivos crocantes com clara e queijo.....	27

2.3.2. Pastéis com clara, espinafres e pimentos.....	30
2.3.3. Barras de sementes com clara.....	31
2.3.4. Tempo de prateleira de um alimento .....	34
2.3.4.1. Embalagem com atmosfera modificada .....	34
2.3.4.2. Atividade de água .....	34
<b>3. Desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara e queijo .....</b>	<b>37</b>
3.1. Materiais e Métodos .....	37
3.1.1. Ingredientes .....	37
3.1.2. Produção .....	37
3.1.3. Análise sensorial preliminar .....	39
3.1.4. Determinação do tempo de prateleira.....	39
3.1.5. Medição da atividade de água e do nível de oxigénio.....	39
3.1.6. Análise nutricional.....	40
3.2. Resultados e discussão.....	40
3.2.1. Testes preliminares .....	40
3.3.2. Análise nutricional.....	53
3.3.3. Análise crítica do desenvolvimento do produto .....	56
<b>4. Desenvolvimento dos pastéis com clara, espinafres e pimentos .....</b>	<b>59</b>
4.1. Materiais e Métodos .....	59
4.1.1. Ingredientes .....	59
4.1.2. Produção .....	59
4.1.3. Análise sensorial preliminar .....	61
4.1.4. Determinação do tempo de prateleira.....	61
4.1.5. Medição da atividade de água e do nível de oxigénio.....	61
4.1.6. Análise nutricional.....	61

4.2. Resultados e discussão.....	62
4.2.1. Testes preliminares .....	62
4.2.2. Análise nutricional.....	70
4.2.3. Análise crítica do desenvolvimento do produto .....	72
<b>5. Novas formulações de barras de sementes com clara .....</b>	<b>75</b>
5.1. Materiais e Métodos .....	75
5.1.1. Ingredientes .....	75
5.1.2. Produção .....	75
5.1.3. Análise sensorial preliminar .....	75
5.1.4. Determinação do tempo de prateleira.....	76
5.1.5. Análise nutricional.....	76
5.2. Resultados e discussão.....	77
5.2.1. Testes preliminares .....	77
5.2.2. Análise nutricional.....	82
5.2.3. Análise crítica do desenvolvimento do produto .....	86
<b>6. Conclusão e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>89</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>91</b>

## **Abreviaturas/Siglas**

**Asp** – Ácido aspártico

**Asn** – Asparagina

**Atm. Modificada** – Atmosfera modificada

**BM** – Banho-Maria

**Cys** – Cisteína

**EAM** – Embalagem com atmosfera modificada

**ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**FAO** - *Food and Agricultural Organization*

**FC** – Farinha de coco

**FMI** – Farinha de milho integral

**Gal** – Galactose

**GlcNAc** - N-acetilglucosamina

**Gal d1** – Alergénio da ovomucoide

**Gal d2** – Alergénio da ovalbumina

**Gal d3** - Alergénio da ovotransferrina

**Gal d4** – Alergénio da lisozima

**Gln** – Glutamina

**Glu** – Glutamato

**HPP** – Processamento por Alta Pressão, do inglês, *High Pressure Processing*

**IFS** - *International Featured Standards*

**IgE** – Imunoglobulina E

**IGP** - Indicação Geográfica Protegida

**kDa** - kilodalton

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade, do inglês, *Low-density lipoprotein*

**Man** – Manose

**MFi** – Massa filo

**NeuNAc** - Ácido N-acetilneuramínico

**pI** – Ponto isoelétrico

**PEF** – Campo elétrico pulsado de alta voltagem, do inglês, *Pulsed Electric Field*

**SK** – Sorbato de potássio

**Temp. ambiente** – Temperatura ambiente

## **UV – Radiação ultravioleta**

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da estrutura do ovo.....	1
<b>Figura 2</b> - Efeito da carga proteica na gelificação térmica da clara de ovo.....	12
<b>Figura 3</b> – Mecanismo de formação de espumas de clara de ovo. 1 – Clara de ovo em cru, isto é, sem qualquer agitação. É composta por 90% de água e 10% de proteína. 2 – Grandes bolhas de ar no meio da clara de ovo, com a maior parte das proteínas desnaturadas. 3 – Formação completa da espuma, com as proteínas desnaturadas orientadas à volta de pequenas bolhas de ar.....	14
<b>Figura 4</b> – Logotipos das diferentes marcas da empresa Fabridoce.....	22
<b>Figura 5</b> – Efeito da atividade de água no crescimento dos microrganismos e nas reações enzimáticas e químicas que ocorrem nos alimentos.....	34
<b>Figura 6</b> – Fluxograma de produção dos aperitivos crocantes com clara. A sombreado azul e laranja está representado as etapas exclusivas do 1º e 2º procedimento, respetivamente. A sombreado cinzento está representado as etapas comuns de ambos os procedimentos.....	36
<b>Figura 7</b> – Equipamentos utilizados na medição da atividade de água (HygroPalm HP23-AW-A), à esquerda, e do nível de oxigénio (Oxybaby®), à direita, nas amostras.....	38
<b>Figura 8</b> – Esquematização das experiências 1 a 5 de desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara. 1 – Substituição dos ingredientes; 2 – Reajuste dos ingredientes com a diminuição do teor de alho; 3 – Alteração do queijo mozzarella por uma mistura de queijos e 4 – Otimização do sabor do aperitivo.....	39
<b>Figura 9</b> – Comparação da espessura dos aperitivos com clara de ovo da experiência 2 e da experiência 3.....	40
<b>Figura 10</b> – Diferenças de aspeto visual entre os aperitivos obtidos nas experiências 4 e 5.....	42
<b>Figura 11</b> – Descritivo sumário das experiências 6 a 8 de desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara.....	44
<b>Figura 12</b> – Esquematização das experiências 9 a 12 de desenvolvimento de aperitivos crocantes com clara, utilizando queijo em pó em vez de queijo ralado.....	46
<b>Figura 13</b> – Esquematização da experiência 13 de desenvolvimento de aperitivos crocantes com clara, com os vários tipos de queijo em pó como decoração.....	48

<b>Figura 14</b> - Esquematização da experiência 14 de desenvolvimento de aperitivos crocantes com clara, com o queijo cheddar e parmesão em pó como decoração, tendo este último sido o escolhido.....	50
<b>Figura 15</b> – Fluxograma de produção dos pastéis com clara, espinafres e pimentos. A sombreado azul e laranja está representado as etapas do recheio e do pastel, respetivamente. A sombreado cinzento está representado as etapas comuns de ambos os procedimentos.....	57
<b>Figura 16</b> – Descritivo sumário das experiências 1 a 3 de desenvolvimento dos pastéis com clara.....	59
<b>Figura 17</b> – Descritivo sumário das experiências 4 a 6 de desenvolvimento dos pastéis com clara.....	61
<b>Figura 18</b> – Esquematização do das experiências 7 e 8 de desenvolvimento dos pastéis com clara. O preparado da experiência 7 foi ao forno sem banho-maria, enquanto que o da experiência 8 foi em banho-maria.....	62
<b>Figura 19</b> – Recheios com clara, espinafres e pimentos cozidos no forno sem banho-maria (Experiência 7) e com banho-maria (Experiência 8) .....	63
<b>Figura 20</b> – Esquematização do das experiências 9 e 10 de desenvolvimento dos pastéis com clara. ....	63
<b>Figura 21</b> – Cobertura dos recheios com clara, espinafres e pimentos com massa folhada e filo e demonstração do seu aspeto visual após preparação.....	64
<b>Figura 22</b> – Fluxograma de produção das barras de sementes com clara. A sombreado cinzento está representado as etapas do procedimento e a sombreado laranja está representado os ingredientes que são adicionados numa dada etapa do processo.....	72
<b>Figura 23</b> – Esquematização da experiência controlo e das experiências 1 a 4 das barras de sementes com clara. 1 – Substituição das sementes de abóbora e cânhamo por quinoa branca; 2 –Substituição do sorbato de potássio por proteína de soja; 3 – Substituição da proteína de soja por óleo de girassol e lecitina de soja e 4 – Adição de proteína de soja novamente.....	74
<b>Figura 24</b> – Barras de sementes da <b>Experiência 1 – Controlo</b> (sombreadas a azul) e da Experiência 2 (sombreadas a verde) antes (A) e após o cozimento (B). É notável o contraste da quinoa com as restantes sementes.....	75

## Índice de Tabelas

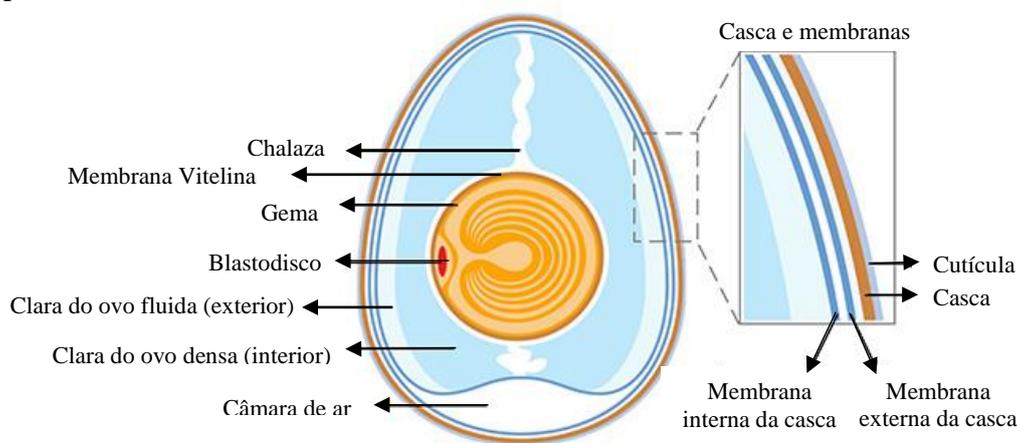
<b>Tabela 1</b> – Conteúdo de minerais e vitaminas presentes na clara de ovo (albúmen) em percentagem (%) .....	2
<b>Tabela 2</b> – Composição e resumo de algumas propriedades físico-químicas das proteínas presentes na clara de ovo.....	8
<b>Tabela 3</b> – Conteúdo de aminoácidos nas proteínas da clara de ovo.....	9
<b>Tabela 4</b> - Métodos que previnem e diminuem a contaminação de ovos para reduzir o risco de doenças transmitidas pelo consumo de ovos e derivados.....	19
<b>Tabela 5</b> – Gama de produtos comercializados pela Fabridoce.....	23
<b>Tabela 6</b> – Resumo das possíveis alegações nutricionais que um produto saudável com clara de ovo poderá conter.....	26
<b>Tabela 7</b> – Estudo de mercado relativo ao valor nutricional e ingredientes utilizados na formulação de <i>snacks</i> das marcas <i>Cheetos</i> , <i>Doritos</i> , <i>Sunbites</i> , <i>LesserEvil</i> e <i>Quevos</i> .....	28
<b>Tabela 8</b> - Possíveis ingredientes para o desenvolvimento dos aperitivos crocantes à base de clara de ovo. A sombreado encontram-se os ingredientes utilizados neste projeto....	27
<b>Tabela 9</b> – Estudo de mercado relativo ao valor nutricional e ingredientes utilizados na formulação do pastel de nata, da queijada e de muffins contendo clara de ovo das marcas Jimmy Dean Delights e Garden Lites. Os valores declarados são por 100g de alimento.....	29
<b>Tabela 10</b> – Estudo de mercado relativo ao peso, calorias, conteúdo de fibra e proteína e alegações nutricionais de barras saudáveis, e ingredientes utilizados nas suas formulações.....	32
<b>Tabela 11</b> – Valor nutricional e tempo de amadurecimento dos queijos utilizados nas formulações dos aperitivos crocantes com clara: ricota, mozzarella com baixo teor de humidade, emmental, gouda, cheddar e parmesão.....	41
<b>Tabela 12</b> – Medição da atividade de água, temperatura e nível de oxigénio dos aperitivos crocantes com clara da <b>Experiência 8</b> após a sua preparação e 24 horas, 1 semana e 1 mês a serem produzidos, embalados em atmosfera modificada.....	45
<b>Tabela 13</b> – Medição da atividade de água, da temperatura e o nível de oxigénio dos aperitivos das <b>Experiências 9 a 12</b> embalados em atmosfera modificada, após 2 semanas a sua produção.....	48
<b>Tabela 14</b> – Detecção da rigidez dos aperitivos crocantes com clara da <b>Experiência 13</b> , deixados abertos à temperatura ambiente.....	49

<b>Tabela 15</b> – Mistura de gases recomendada, temperatura de armazenamento, durabilidade possível e principais organismos e mecanismos de deterioração dos aperitivos crocantes com clara.....	50
<b>Tabela 16</b> – Declaração nutricional (por 100g de alimento) dos aperitivos crocantes com clara e queijo parmesão ( <b>Experiência 14</b> ) e dos <i>snacks</i> das marcas Cheetos, Sunbites e Lesser Evil, comercializados no mercado. Entre parêntesis está apresentado o ingrediente base que constitui cada produto.....	52
<b>Tabela 17</b> –Valores de atividade de água, temperatura e nível de oxigénio medidos após preparação dos recheios e após 24 horas, 1 semana, 1 mês e 3 meses de embalados em atmosfera modificada e armazenados à temperatura de refrigeração.....	65
<b>Tabela 18</b> – Mistura de gases recomendada para embalar os pastéis com clara, temperatura de armazenamento adequada, durabilidade do pastel com clara ao ar e em embalagem com atmosfera modificada e principais organismos e mecanismos de deterioração presentes neste tipo de produto.....	66
<b>Tabela 19</b> - Declaração nutricional (por 100g de alimento) do recheio com clara, espinafres e pimentos da <b>Experiência 10</b> , do pastel de nata, da queijada (doces típicos portuguesas) e do <i>muffin</i> de espinafres com clara da marca <i>Garden Lites</i> , comercializado no mercado.....	68
<b>Tabela 20</b> – Número de dias em que as barras de sementes com clara não demonstraram bolores visíveis, após selagem em saco de congelação, selagem envolvendo temperatura e embalamento em atmosfera modificada. FC – Farinha de coco; SK – Sorbato de potássio.....	76
<b>Tabela 21</b> – Declaração nutricional das barras de sementes da <b>Experiências 1 – Controlo</b> - 4 sementes: girassol, abóbora, cânhamo e chia; <b>Experiência 3</b> - proteína de soja; <b>Experiência 4</b> - óleo de girassol e a lecitina de soja e <b>Experiência 5</b> – proteína de soja, óleo de girassol e lecitina de soja.....	79
<b>Tabela 22</b> - Declaração nutricional (por 100g de alimento) das barras com clara de ovo das marcas NuGo e RXBAR e das barras de sementes das marcas NuGo e FiberOne, comercializados no mercado. Entre parêntesis está apresentado o ingrediente base que constitui cada produto.....	81



## 1. A Clara de Ovo (Albúmen)

O ovo apresenta três principais compartimentos: a gema (30-33%), a clara ou albúmen (60%) e a casca (9-12%).<sup>1,2</sup> A gema é rodeada pelo albúmen, que por sua vez, é envolvida por membranas e, finalmente, pela casca (**Figura 1**).<sup>3,4</sup> O ovo inteiro é constituído maioritariamente por água (75%), proteínas (12%), lípidos (12%), carboidratos e minerais. As proteínas presentes no ovo estão distribuídas entre a clara e a gema, enquanto os lípidos estão exclusivamente na gema.<sup>2</sup> Os minerais são o principal componente da casca de ovo.<sup>3</sup>



**Figura 1** – Representação esquemática da estrutura do ovo. (Adaptado de Sunwoo *et al.*<sup>5</sup>)

### 1.1. Composição química

A clara de ovo ou albúmen representa 60% do peso total do ovo<sup>6</sup> e consiste numa solução aquosa de proteínas, contendo minoritariamente carboidratos, minerais, vitaminas e lípidos.<sup>1,2,6,7</sup>

A clara do ovo contém 0,8% a 1% de carboidratos, que podem estar presentes na forma livre ou como oligossacarídeos em ligação N-glicosídica ou O-glicosídica a proteínas.<sup>3,4,8</sup> Os carboidratos na forma livre são monossacarídeos como a glucose (presente em maior quantidade), a manose, a galactose, a arabinose e a xilose.<sup>9</sup> Em relação ao teor lipídico, este encontra-se numa percentagem muito baixa no albúmen (0,03%), sendo o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e o ácido araquidónico (C20:4) os principais ácidos gordos presentes nos lípidos da clara de ovo.<sup>3,4</sup> O conteúdo mineral da clara de ovo é de 0,6%.<sup>9</sup> Os principais elementos minerais presentes são o potássio e o sódio. O fósforo, o cálcio e o magnésio são encontrados em quantidades mais baixas, assim como outros minerais. O

albúmen não possui vitaminas lipossolúveis, mas contém proporções significativas de vitaminas hidrossolúveis pertencentes ao complexo B.<sup>3,4</sup> O conteúdo de minerais e de vitaminas presente na clara de ovo está apresentado na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Conteúdo de minerais e vitaminas presente na clara de ovo (albúmen) em percentagem (%). (Adaptado de Belitz *et al.* <sup>9</sup>)

Minerais	Quantidade no albúmen (%)	Vitaminas	Quantidade no albúmen (%)
Enxofre	0,195	Riboflavina (B2)	0,270
Potássio	0,145-0,167	Niacina (B3)	0,100
Sódio	0,161-0,169	Ácido Pantoténico (B5)	0,140
Fósforo	0,015-0,030	Tiamina (B1)	0,022
Cálcio	0,008-0,020	Piridoxina (B6)	0,012
Magnésio	0,009	Ácido fólico (B9)	0,009
Ferro	0,0001-0,0002	Biotina (B7)	0,007

### 1.1.1. Proteínas

As proteínas correspondem a cerca de 10% da clara de ovo e são reconhecidas pelo seu elevado valor nutricional, elevada digestibilidade e pela presença na sua constituição de todos os aminoácidos essenciais necessários para a nutrição e desenvolvimento do organismo humano.<sup>7</sup> O albúmen contém mais de 50 proteínas, sendo a ovalbumina, a ovotransferrina, a ovomucoide, a ovomucina, a lisozima e as ovoglobulinas as mais abundantes.<sup>2,7</sup> Algumas das proteínas são enzimas, inibidores enzimáticos e agentes complexantes com coenzimas. As atividades biológicas podem estar relacionadas à proteção do ovo contra a deterioração microbiana.<sup>9</sup>

#### 1.1.1.1. Principais proteínas

A **ovalbumina** é a proteína da clara de ovo mais abundante, compreendendo 54% do total de proteínas.<sup>10</sup> É uma glicoproteína fosforilada constituída por três subunidades, juntamente com uma cadeia de carboidratos ligada ao terminal amina.<sup>7,11</sup> A massa molecular da ovalbumina é de 45 kDa e é composta por 386 aminoácidos, juntamente com dois polimorfismos genéticos observados nos resíduos 290 (Glu → Gln) e 312 (Asn → Asp).<sup>2,7</sup> Contém seis resíduos de cisteína com uma única ligação dissulfeto (Cys74 e Cys121), e é a única proteína da clara de ovo com grupos tiol (-SH) livres.<sup>6,12,13</sup> Na ovalbumina, metade dos resíduos de aminoácidos são hidrofóbicos e um terço são

aminoácidos ácidos, o que contribui para um ponto isoelétrico (pI) de 4,5.<sup>7,12</sup> Durante o armazenamento dos ovos, a N-ovalbumina é convertida em S-ovalbumina, que é uma forma mais estável ao calor. A taxa de conversão aumenta com a temperatura, com o pH do albúmen e com o tempo de armazenamento dos ovos, tendo os dois primeiros parâmetros um impacto maior na taxa de conversão.<sup>3,8</sup> A presença da S-ovalbumina coincide com a perda do valor funcional dos ovos, uma vez que os ovos com elevado teor de S-ovalbumina possuem o albúmen muito aquoso (*runny egg whites*). A S-ovalbumina passa a ter uma temperatura de desnaturação de 92,5°C ao invés de 84,5°C.<sup>14</sup> Esta proteína possui várias atividades biológicas: anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora.<sup>15</sup>

A **ovotransferrina**, também conhecida por conalbumina, é a segunda proteína mais abundante na clara de ovo, representando 12% do total de proteínas do albúmen.<sup>16,17</sup> É uma glicoproteína monomérica, que possui uma massa molecular de 78 kDa e 686 aminoácidos.<sup>18</sup> Consiste em dois domínios, designados C e N, cada um contendo um local de ligação específico para o ferro. O domínio N e C possuem seis e nove ligações dissulfeto, respetivamente, dando um total de 15 ligações dissulfeto.<sup>6,11</sup> Uma molécula de ovotransferrina consegue-se ligar reversivelmente a dois íons de ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) com dois aniões de bicarbonato.<sup>15</sup> O ferro,  $\text{Fe}^{3+}$ , pode ser facilmente ligado à ovotransferrina a pH superior a 7,0, no entanto, é libertado a pH inferior a 4,5.<sup>2</sup> É a proteína da clara de ovo que coagula a temperaturas mais baixas, mas a complexação com o ferro aumenta significativamente a sua estabilidade ao calor.<sup>6,9</sup> Essa propriedade contribui para a sua aplicação como ingrediente nutricional em produtos enriquecidos com ferro.<sup>16,19</sup> Além disso, a ovotransferrina possui propriedades antimicrobianas, antivirais e antioxidantes. O complexo ferro-transferrina pode impedir que bactérias gram-positivas ou gram-negativas que dependem do íon  $\text{Fe}^{3+}$  se desenvolvam em diferentes produtos alimentícios, por exemplo, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Bacillus cereus*.<sup>3,16,17</sup> A ovotransferrina pode assim ser usada como agente antimicrobiano nos alimentos.<sup>17</sup>

A **ovomucoide** é uma glicoproteína que consiste em 186 aminoácidos, possui uma massa molecular de 28 kDa e representa 11% do total de proteínas da clara de ovo.<sup>7</sup> Esta glicoproteína contém 9 ligações dissulfeto e é um inibidor de proteases.<sup>16,20</sup> Contém três domínios homólogos funcionais da família Kazal, caracterizados por diferentes locais reativos que interagem especificamente com o local ativo da protease. Essa interação resulta na hidrólise da ligação peptídica e na formação de um complexo enzima-

inibidor.<sup>19</sup> Devido a essa função de inibição enzimática, a ovomucoide é muito estável na presença de enzimas digestivas e também a elevadas temperaturas.<sup>8</sup> Esta glicoproteína pode ser aquecida a 100°C sob condições ácidas por longos períodos sem sofrer alterações significativas nas suas propriedades físico-químicas.<sup>8,18</sup> A ovomucoide é uma das proteínas da clara de ovo mais glicosilada, estando uma grande proporção dos carboidratos (25%) presentes nesta glicoproteína ligada à cadeia polipeptídica através de resíduos de asparagina.<sup>2,8,21</sup> A N-acetilglucosamina (GlcNAc), a manose (Man), a galactose (Gal) e o ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc) são os principais monossacarídeos presentes na ovomucoide.<sup>22</sup>

A **ovomucina** é uma glicoproteína sulfatada e fortemente glicosilada, que se encontra em menor quantidade na clara de ovo (3,5%).<sup>8</sup> É caracterizada pelo elevado peso molecular e pela capacidade de formar complexos com outras proteínas do albúmen, particularmente a lisozima e as globulinas.<sup>23</sup> Contém duas subunidades, a subunidade  $\alpha$  com baixo conteúdo de carboidratos (15%) e elevado teor de proteínas, e a subunidade  $\beta$  rica em carboidratos (50%).<sup>5,9</sup> A ovomucina é responsável por muitas das propriedades funcionais e biológicas da clara de ovo.<sup>7</sup> Desempenha funções físicas, como a manutenção da estrutura, viscosidade e características espessantes da clara de ovo, impedindo a propagação de microorganismos. Possui ainda boas propriedades emulsificantes e de formação e estabilidade de espumas. O conteúdo de ovomucina presente no albúmen está relacionado com a qualidade dos ovos.<sup>7</sup> Durante o armazenamento dos ovos, a clara de ovo fica com baixa viscosidade, denominada “*egg white thinning*”. As mudanças químicas durante este acontecimento natural da clara de ovo ainda não são totalmente compreendidas, mas as principais explicações apontam para a dissociação do complexo da ovomucina com outras proteínas e a redução ou oxidação das ligações dissulfeto.<sup>23,24</sup> Além disso, a ovomucina possui atividades biológicas, como as atividades antitumoral e antiviral (atribuída principalmente à subunidade rica em carboidratos) e de inibição da captação do colesterol.<sup>5,25</sup>

A **lisozima** ou ovoglobulina G1 é produzida por vírus, bactérias, plantas, fungos e animais, incluindo os tecidos e fluidos de aves, mamíferos e insetos.<sup>16,26</sup> Representa 3,5% do total de proteínas presentes no albúmen e é constituída por um único polipéptido de 14,3 kDa.<sup>7,8,26</sup> A lisozima presente na clara de ovo é única, pois é facilmente solúvel e estável em comparação com a lisozima presente noutros alimentos.<sup>2,7</sup> Além disso, é singular comparativamente às principais proteínas da clara do ovo devido a possuir um ponto isoelétrico alcalino (10,7), o que significa que pode formar complexos com

moléculas carregadas negativamente como a ovomucina, a ovalbumina e a ovotransferrina.<sup>11</sup> Possui 4 ligações dissulfeto, que estabilizam a sua estrutura terciária, contribuindo duas das quatro pontes dissulfeto para a elevada estabilidade térmica, sendo as outras duas responsáveis pela sua atividade enzimática.<sup>7,16</sup> Esta proteína é uma hidrolase, tendo a capacidade de catalisar reações de hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -(1-4) entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina da peptidoglicana das paredes celulares das bactérias, nomeadamente das bactérias gram-negativas.<sup>2,25,27</sup> Por essa razão, a lisozima é bastante usada na indústria farmacêutica e alimentar pelas suas atividades antibacterianas e antivirais, mas também devido a ser um agente anti-inflamatório e imunomodulador.<sup>15,19</sup>

A **ovoglobulina** inclui as proteínas ovoglobulina G2 e ovoglobulina G3, cada uma constituindo 4% das proteínas do albúmen do ovo.<sup>3</sup> A ovoglobulina G2 e G3 são similares em muitas propriedades, incluindo o seu peso molecular (49-50 kDa), a composição de aminoácidos e carboidratos.<sup>3,7,8</sup> É constituída por 13,6% de manose e galactose na proporção 2:1, 13,8% de glucosamina e 3% de ácido N-acetilneuramínico.<sup>5</sup> As ovoglobulinas G2 e G3 são de interesse para a indústria alimentar, pois desnaturam rapidamente e, portanto, podem ter mais efeito na formação e estabilização de espumas da clara do ovo do que outras proteínas mais abundantes presentes no albúmen.<sup>5,8,9</sup>

#### 1.1.1.2. Proteínas minoritárias

Para além das proteínas maioritárias presentes no albúmen do ovo, existem outras proteínas em menor quantidade e que merecem destaque pelo papel crucial que desempenham na determinação das propriedades físico-químicas e estruturais do ovo.

A **ovoinibidor** é uma glicoproteína da clara de ovo, com massa molecular de 49 kDa e 447 resíduos de aminoácidos.<sup>5</sup> Compreende sete domínios homólogos do tipo Kazal, com porções de carboidratos ligados covalentemente e 21 ligações dissulfeto.<sup>11,19,21</sup> Tal como a ovomucoide, a ovoinibidor é um inibidor específico de proteases de serina, como tripsina, quimotripsina, subtilisina, elastase suína, bem como de proteases bacterianas e fúngicas.<sup>3,21,28</sup> O domínio I é um potente inibidor da tripsina, mas é desprovido de atividade inibidora contra a quimotripsina e elastase, e os domínios VI e VII possuem uma metionina na posição 1, tornando-os propensos a inibir a quimotripsina e a elastase.<sup>19</sup> A existência de vários domínios pode explicar a múltipla especificidade inibitória da ovoinibidor, sendo uma vantagem, pois uma vasta gama de

proteases pode ser inibida e, assim, proporcionar uma medida de maior proteção contra microorganismos.<sup>11</sup>

A **ovoglicoproteína** é uma glicoproteína ácida, com um ponto isoelétrico de 3,9, uma massa molecular de 20,3 kDa e uma glicosilação de 30%.<sup>5,19</sup> Representa cerca de 1% da proteína da clara do ovo.<sup>15</sup> É uma glicoproteína estável, permanecendo solúvel mesmo após tratamento térmico ou tratamento com ácido.<sup>3</sup>

A **ovoflavoproteína**, também conhecida como ovoflavina ou proteína de ligação à riboflavina, é uma fosfoglicoproteína que está presente na gema e na clara de ovo em iguais quantidades.<sup>5,7</sup> É constituída por 219 aminoácidos, uma massa molecular de 32 kDa e um local de ligação à riboflavina (vitamina B2) de elevada afinidade.<sup>11,19</sup> O conteúdo de carboidratos na ovoflavoproteína é aproximadamente de 15%, consistindo maioritariamente em fucose, manose, galactose, N-acetilglucosamina e ácido N-acetilneuramínico.<sup>5</sup> A proteína possui um total de oito grupos fosfato que, juntamente com os resíduos de aminoácidos ácidos e o ácido N-acetilneuramínico contribuem para o seu baixo pI de 4,0.<sup>11</sup> A ovoflavoproteína liga-se à riboflavina a pH acima de 4,3 com uma constante de associação de  $7,9 \times 10^8$  M.<sup>5</sup> Com um valor de pH abaixo de 4,0, a constante de associação diminui rapidamente, e a riboflavina dissocia-se da ovoflavoproteína, formando a apoproteína e a riboflavina livre.<sup>19,29</sup> A ovoflavoproteína fornece as quantidades necessárias de vitamina riboflavina à gema e à clara de ovo, para sustentar o desenvolvimento do embrião até a eclosão.<sup>7,30</sup>

A **ovomacroglobulina**, também conhecida como ovostatina, é constituída por quatro subunidades, cada com um peso molecular de 175 kDa, com pares de subunidades unidas por ligações dissulfeto.<sup>3,5,31</sup> É a segunda maior glicoproteína presente no albúmen, após a ovomucina.<sup>5,15</sup> A ovomacroglobulina possui atividade inibitória contra diversas enzimas proteolíticas, entre elas as proteases de serina e de cisteína e as metaloproteases.<sup>3,15,19</sup>

A **avidina** é uma glicoproteína tetramérica alcalina (pI 10,5) do albúmen do ovo, com uma única ligação dissulfeto.<sup>7,11,32</sup> Os quatro monómeros da proteína são capazes de se ligar à biotina, formando o complexo avidina-biotina, e estabelecer uma forte interação, com uma constante de dissociação de  $1,3 \times 10^{-15}$  mol.<sup>7,9,32</sup> Esta é a interação não covalente mais forte relatada entre proteína e ligando.<sup>5,25</sup> A função da avidina não está relacionada com o transporte de biotina, uma vez que uma elevada proporção de avidina presente na clara de ovo não possui biotina ligada, mas sim com a proteção contra ataques bacterianos e fúngicos.<sup>11</sup> A biotina desempenha um papel importante no crescimento de

microrganismos como fungos e bactérias. Devido ao complexo estável entre a avidina e biotina, o crescimento desses microrganismos é eficientemente inibido.<sup>16</sup> No entanto, o complexo avidina-biotina possui outras aplicações vantajosas para a indústria de biotecnologia, como a seleção de células ativadas por fluorescência e a técnica de ELISA.<sup>16</sup> Além disso, a avidina contém resíduos terminais de N-acetilglucosamina e manose que se ligam a algumas lectinas. Como as lectinas são expressas em vários níveis na superfície das células tumorais, a conjugação de agentes citotóxicos com glicoproteínas como a avidina, que são reconhecidas pelas lectinas, pode ser útil no tratamento de tumores.<sup>3,7,33</sup>

A **cistatina** é membro de uma “superfamília” de cistatinas, sendo que a cistatina da clara de ovo pertence às cistatinas do tipo 2.<sup>21</sup> A superfamília foi subdividida com base na homologia de sequência e na presença e posição de ligações de dissulfeto.<sup>34</sup> A cistatina da clara de ovo possui 115 aminoácidos e as duas ligações dissulfeto próximas ao terminal carboxilo, mas não contém carboidratos.<sup>3</sup> A cistatina tem uma massa molecular de 12,7 kDa e contém duas formas isoelétricas principais, que diferem pela ocorrência de fosforilação da serina na posição 80.<sup>9,19</sup> O pI da cistatina fosforilada é de 5,6, enquanto que para a forma não fosforilada é de 6,5.<sup>3,7</sup> A cistatina inibe a maioria das proteases de cisteína com estequiometria 1:1, incluindo ficina, papaína e catepsinas B, H e L, quimopapaína e actinidina.<sup>5,19,35</sup> Além da sua atividade como inibidor de proteases, a cistatina possui outras propriedades bioativas, como atividade antibacteriana, antiviral e imunomoduladora.<sup>7,13,25</sup> As bactérias *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia coli*, *Oligella sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* são altamente sensíveis a baixas concentrações de cistatina.<sup>34</sup> A sua atividade é afetada pela idade da galinha poedeira, tendo maior atividade quando a galinha tem cerca de 40 a 50 semanas de vida. Com menos de 30 semanas e com mais de 60 semanas, a cistatina perde atividade. Além disso, o tempo de armazenamento dos ovos e os tratamentos térmicos causam a diminuição da atividade desta enzima.<sup>3,7</sup>

**Tabela 2** – Composição e resumo de algumas propriedades físico-químicas das proteínas presentes na clara de ovo. (Adaptado de Campbell *et al.*<sup>36</sup> e completado com Froning *et al.*<sup>37</sup>, Guha *et al.*<sup>7</sup>, Sharif *et al.*<sup>15</sup> e Mine (2007)<sup>25</sup>)

Proteínas	Quantidade no Albúmen (%)	Ponto isoelétrico (pI)	Massa Molecular (kDa)	Temperatura de Desnaturação (°C)	Propriedades
<b>Proteínas Principais</b>					
Ovalbumina	54	4,5	45	84,5	Atividade anti-mutagénica, imunomoduladora, antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana
Ovotransferrina	12	6,1	78	61,1	Atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, imunomoduladora
Ovomucoide	11	4,1	28	79,0	Atividade imunomoduladora, inibidor de proteases de serina
Ovomucina	3,5	4,5-5,0	5500-8300	-	Atividade antiviral, anti-tumoral, imunomoduladora
Lisozima	3,5	10,7	14,3	75,0	Atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, imunomoduladora e anti-tumoral
Globulina G2	4	5,5	49	92,5	Propriedades tensioativas
Globulina G3	4	4,8	50	-	Propriedades tensioativas
<b>Proteínas minoritárias</b>					
Ovoinibidor	1,5	5,1	49	69-72	Inibidor de proteases de serina, da tripsina e quimotripsina
Ovoglicoproteína	1,0	3,9	20,3	69-72	
Ovoflavoproteína	0,8	4,0	32	69-72	Transportador de riboflavina
Ovomacroglobulina	0,5	4,5	769	69-72	Inibidor de proteases de serina
Avidina	0,05	10,5	68,3	85	Atividade antimicrobiana
Cistatina	0,05	5,1	12,7	80-100	Inibidor de proteases de cisteína, atividade antibacteriana, imunomoduladora e inibição da invasão de tumores

### 1.1.2. Digestibilidade e qualidade das proteínas

A eficiência nutricional de uma proteína está relacionada com a sua digestibilidade e qualidade. O termo “digestibilidade proteica” refere-se à utilização de proteínas no organismo, o que é importante na avaliação da qualidade das proteínas como fonte nutricional de aminoácidos. Assim, a quantidade de proteínas necessárias à dieta depende principalmente da digestibilidade das proteínas e da disponibilidade de aminoácidos essenciais: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.<sup>38-40</sup>

A proteína de clara de ovo crua é geralmente considerada menos digerível que a tratada termicamente, com 51,35% e 90,9%, respectivamente. A baixa digestibilidade proteica da clara de ovo crua parece estar relacionada com a proteína ovomucoide, que atua como um inibidor de tripsina. A elevada digestibilidade da proteína da clara de ovo aquecida é devida às alterações estruturais das proteínas induzidas pela desnaturação, o que facilita o acesso das enzimas digestivas às ligações peptídicas.<sup>41</sup> Considera-se que as proteínas da clara de ovo possuem os melhores perfis de aminoácidos para nutrição humana (**Tabela 3**).

**Tabela 3** – Conteúdo de aminoácidos nas proteínas da clara de ovo. (Adaptado de Li-Chan *et al.*<sup>3</sup>)

Aminoácidos	Conteúdo (g/100g do albúmen)	Aminoácidos	Conteúdo (g/100g do albúmen)
Triptofano	0,125	Valina	0,809
Treonina	0,449	Arginina	0,648
Isoleucina	0,661	Histidina	0,290
Leucina	1,016	Alanina	0,704
Lisina	0,806	Ácido aspártico/ Asparagina	1,220
Metionina	0,399	Ácido glutâmico/ Glutamina	1,550
Cistina	0,287	Glicina	0,413
Fenilalanina	0,686	Prolina	0,435
Tirosina	0,457	Serina	0,798

### 1.1.3. Alergenicidade das proteínas

As reações alérgicas são respostas imunes mediadas principalmente pela imunoglobulina (Ig) E, causando um estado de hipersensibilidade.<sup>42</sup> O ovo é o segundo alimento mais comum causador de alergias, afetando especialmente bebês e

aproximadamente 0,5% a 2,5% de crianças, e é responsável pelos sintomas mediados por IgE, incluindo urticária, erupção cutânea, eczemas, asma, vômitos, náuseas, dor abdominal, entre outros.<sup>43-45</sup> Os principais alergénios do ovo estão localizados no albúmen e incluem a ovomucoide (Gal d1), a ovalbumina (Gal d2), a ovotransferrina (Gal d3) e a lisozima (Gal d4).<sup>16,46</sup> Os maiores alergénios são a ovomucoide e a ovalbumina, enquanto a ovotransferrina e a lisozima contribuem em menor grau.<sup>42</sup>

A ovomucoide é o alergénio mais dominante e desempenha um papel crucial na patogénese das reações alérgicas mediadas por IgE.<sup>47</sup> Esse potencial alergénico pode ser atribuído à sua elevada estabilidade em relação à digestão gastrointestinal e ao tratamento térmico.<sup>7,19</sup> A ovalbumina, embora seja a proteína mais abundante na clara de ovo, a sua alergenicidade é muito menor do que a da ovomucoide. Devido ao elevado número de grupos tiol na forma livre, a ovalbumina é extremamente sensível à desnaturação pelo calor, resultando na perda de alergenicidade.<sup>19,46</sup> A ovotransferrina e a lisozima são mais termolábeis, e, conseqüentemente são antigénios mais fracos, no entanto, também podem produzir reações alérgicas quando consumidos mais ou menos crus.<sup>42</sup> A lisozima é comumente usada como conservante de alimentos devido às suas propriedades antibacterianas, em alguns produtos farmacêuticos e alimentos.<sup>48</sup> Assim sendo, a sensibilização à IgE específica da lisozima pode ser responsável por reações alérgicas a medicamentos ou alimentos produzidos com esta proteína.<sup>42</sup> Menos comumente, a ovotransferrina produz reações alérgicas em pacientes alérgicos ao ovo que recebem tratamentos via oral com ferro.<sup>42</sup>

Existem diversas formas de processamento que têm potencial para alterar ou reduzir a alergenicidade das proteínas da clara de ovo. Esses métodos incluem tratamento térmico, hidrólise enzimática e novos métodos de processamento, como a alta pressão, radiação gama, ultrassons e pulsos elétricos.<sup>16,44</sup> O objetivo da indústria é usar estas técnicas de processamento de alimentos para produzir produtos hipoalergénicos. No entanto, no caso da ovomucoide, foram conduzidos inúmeros estudos para alterar a composição e a estrutura dos epítomos desta glicoproteína responsáveis pela alergenicidade, entre eles: irradiação gama juntamente com aquecimento, desglicosilação utilizando as enzimas endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidases e modificações genéticas. Neste caso, nenhuma dessas modificações fez alterações significativas nos epítomos alérgicos da ovomucoide, sugerindo que os epítomos são extremamente resistentes a quaisquer modificações.<sup>7</sup>

A maneira mais prevalente de evitar alergia aos ovos é não consumir os produtos que contêm o ovo como ingrediente. Pelas razões descritas acima é muito importante a rotulagem adequada dos alimentos, especialmente quando existe a probabilidade de incorporar alergénios no produto durante o seu processamento e embalagem.<sup>8</sup>

## **1.2. Propriedades**

As proteínas representam mais de 90% da matéria seca da clara do ovo e são proteínas predominantemente globulares.<sup>49</sup> Algumas delas são muito sensíveis ao calor, explicando as suas propriedades funcionais exclusivas como emulsificantes, de gelificação/coagulação e de formação de espumas.<sup>49,50</sup> Estas propriedades são importantes no desenvolvimento e na preparação de uma larga gama de produtos, contribuindo para as características desejáveis de um alimento e do seu comportamento físico durante a preparação, a transformação e o armazenamento.<sup>51,52</sup>

### 1.2.1. Emulsificação

A propriedade emulsificante do ovo é principalmente associada à gema devido ao seu teor lipídico, nomeadamente às lipoproteínas de baixa densidade (LDL).<sup>53</sup> No entanto, a clara de ovo também possui propriedades emulsificantes, que têm vindo a ser aprimoradas nos últimos anos através do aquecimento a seco, que leva à desnaturação parcial de proteínas e à reação de *Maillard*, formando conjugados de proteína-polissacarídeos. Estes conjugados provenientes da reação de Maillard mimetizam o caráter das lipoproteínas presentes na gema de ovo, aumentando assim as propriedades de emulsão das proteínas do albúmen.<sup>54</sup>

### 1.2.2. Gelificação

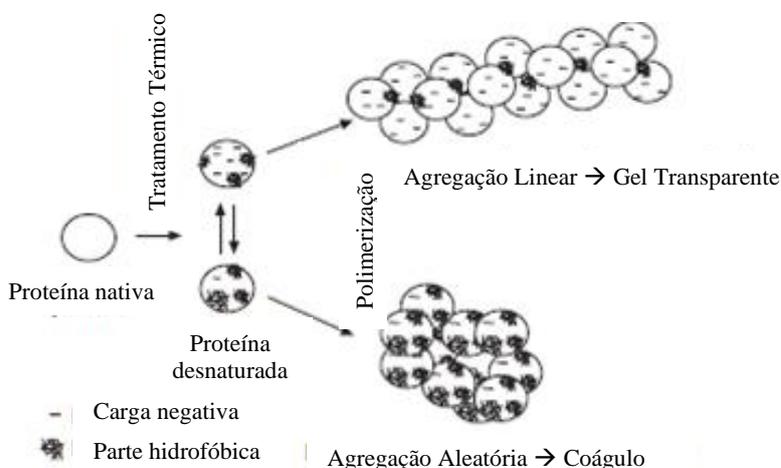
A gelificação pode ser induzida por uma variedade de métodos diferentes, como temperatura, pressão, concentração de sal (força iónica) e pH ou pela adição de agentes desnaturantes ou de reticulação.<sup>55,56</sup> O gel de clara de ovo é normalmente produzido por tratamento térmico.<sup>52,57</sup>

A gelificação ocorre quando a estabilidade das proteínas na solução é modificada, isto é, quando o equilíbrio entre forças atrativas (*van der Waals*) e repulsivas (eletrostáticas) é quebrado. O tratamento térmico usado na indústria alimentar pode modificar a estrutura das proteínas com efeitos resultantes sobre estas forças repulsivas e atrativas.<sup>49</sup> Este é um fenómeno que se dá em duas etapas: primeiro ocorre a desnaturação

das proteínas nativas, expondo-se a sua estrutura interna hidrofóbica e em segundo, as proteínas desnaturadas interagem para formar agregados de elevado peso molecular, resultando num gel tridimensional.<sup>52</sup> Nos géis das proteínas da clara de ovo induzidos pelo calor, as interações envolvidas são predominantemente hidrofóbicas e eletrostáticas. No entanto, podem ser observadas algumas interações altamente energéticas, como as ligações de dissulfeto, ou reações que envolvem grupos tiol e amina que são realmente altamente reativos, especialmente em condições alcalinas.<sup>49</sup>

Dependendo do pH e da força iónica, é possível formar vários tipos de géis de clara de ovo sob desnaturação térmica.<sup>49</sup> Quando o pH está próximo do ponto isoelétrico (pI) das proteínas em solução (o pI da maioria das proteínas da clara de ovo varia entre 4 e 5) ou a força iónica é elevada, as proteínas desnaturadas agregam-se aleatoriamente por meio de interações hidrofóbicas (**Figura 2**).<sup>6,8</sup> Um aumento na concentração de sal, independente do pH, também diminui as forças repulsivas entre as proteínas, pois cargas negativas são protegidas pelos iões  $\text{Na}^{2+}$ , levando ao aumento das interações hidrofóbicas proteína-proteína.<sup>6,8</sup> Essas condições produzem um gel opaco e turvo, pois os agregados tendem a possuir elevado tamanho e espessura.<sup>6,8</sup> Assim, a rede de gel contém uma rigidez reduzida, bem como a sua elasticidade e capacidade de retenção de água reduzidas, pois é composta por agregados de grande tamanho ligados por meio de ligações de hidrogénio e pontes de dissulfeto.<sup>49</sup>

Quando o pH está mais distante do pI (acima ou abaixo) ou existe baixa força iónica, elevadas repulsões eletrostáticas atrasam a agregação.<sup>6,8,49</sup> Finalmente, a agregação adicional envolve regiões hidrofóbicas e induz agregados poliméricos lineares, formando um gel mais transparente (**Figura 2**).<sup>6</sup>



**Figura 2** - Efeito da carga proteica na gelificação térmica da clara de ovo. (Adaptado de Lechevalier *et al.*<sup>49</sup>)

A ovalbumina e a ovotransferrina são os principais contribuintes para a gelificação térmica da clara do ovo. A ovalbumina pode estabelecer ligações covalentes com outras proteínas da clara de ovo através de ligações dissulfeto, o que é importante para a gelificação térmica, uma vez que produz ligações covalentes cruzadas envolvendo e estabilizando a matriz de gel.<sup>49,52</sup> A ovotransferrina é considerada o iniciador da gelificação, pois é a primeira proteína da clara de ovo a desnaturar termicamente (61,1°C), sendo um fator limitante considerando as propriedades de gelificação.<sup>56</sup> A eliminação desta proteína foi considerada, no entanto, a ovotransferrina é mais estável em pH alcalino, com elevada força iônica e quando íons metálicos, como os de ferro, alumínio e cobre se ligam a ela. Assim, a temperatura de gelificação da clara de ovo pode ser significativamente aumentada por modificação desses parâmetros e, principalmente, pela adição de Fe<sup>3+</sup> ou Al<sup>3+</sup>.<sup>8,52</sup>

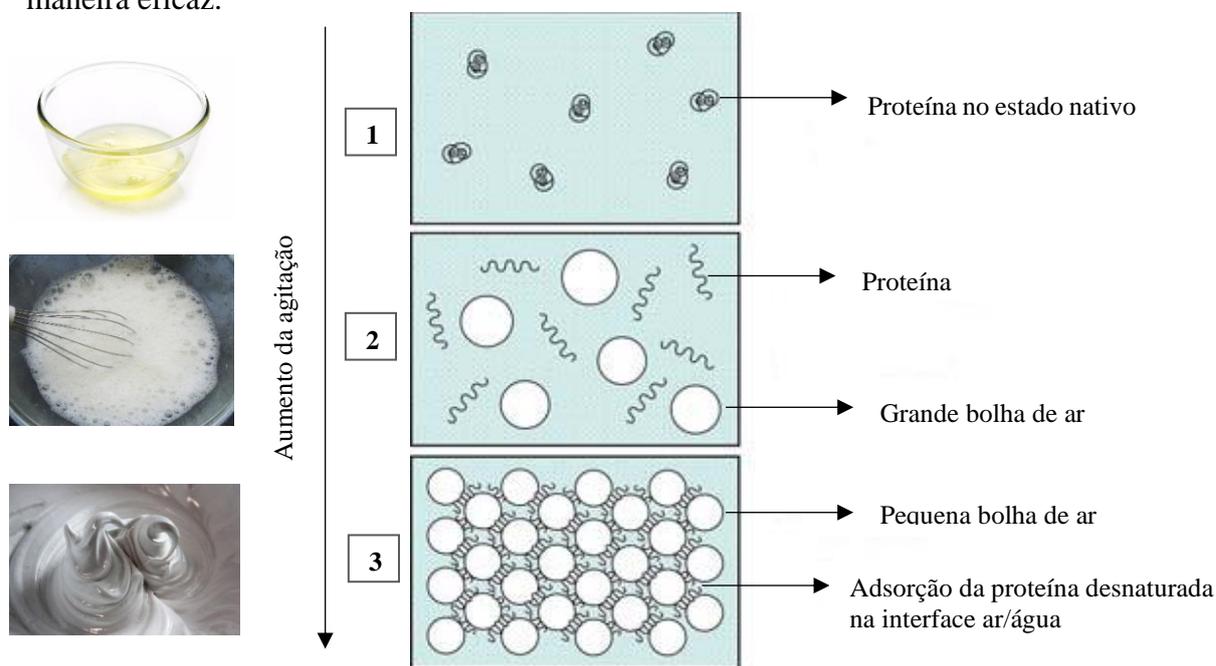
### 1.2.3. Formação de espumas

Espumas são "sistemas coloidais termodinamicamente instáveis nos quais um gás é transitoriamente mantido como uma fase dispersa distinta numa matriz líquida".<sup>58</sup> A capacidade de uma solução proteica, como a clara de ovo, de formar espumas depende da estrutura e conformação das proteínas, nomeadamente da capacidade de uma proteína ser adsorvida na interface ar-água e sofrer uma rápida alteração conformacional.<sup>6,49</sup>

A formação de espuma envolve vários princípios e modificações estruturais das moléculas de proteína como: i) a adsorção de proteínas na interface ar-água, ii) o desdobramento e reorientação (rearranjo) de proteínas adsorvidas na interface, que direciona os grupos hidrofóbicos para a fase gasosa e os grupos hidrofílicos para a fase aquosa e iii) a interação de proteínas adsorvidas com as moléculas de proteínas vizinhas para formar um filme coeso e denso em torno da superfície da espuma, através de pontes de hidrogénio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (**Figura 3**).<sup>36,50,59</sup> As interações moleculares das proteínas na interface ar-água dependem das propriedades das proteínas e das condições dominantes da solução, que por sua vez determinam a formação e a estabilidade da espuma. Isso implica que, durante a formação da espuma, as proteínas sejam submetidas à desnaturação interfacial. No entanto, é importante que a desnaturação induzida ocorra numa extensão limitada, pois a desnaturação excessiva leva à agregação e coagulação de proteínas, desestabilizando a espuma.<sup>6,52,60</sup>

A formação da espuma da clara do ovo depende das propriedades químicas individuais de uma ampla gama de proteínas (peso molecular, pI, glicosilação,

fosforilação e teor de ligações dissulfeto/grupos tiol livres).<sup>61</sup> As principais proteínas da clara de ovo que determinam a capacidade e as propriedades de formação de espuma, por ordem de importância, são as ovoglobulinas, a ovalbumina, a ovotransferrina, a lisozima, a ovomucoide e a ovomucina.<sup>8,36,50</sup> As ovoglobulinas contribuem para a elevada viscosidade e diminuem as tensões superficiais, que são especialmente úteis na fase inicial da formação da espuma. A perda de tensão superficial promove a formação de pequenas bolhas de ar e proporciona uma textura suave.<sup>49</sup> A ovalbumina desempenha um papel central na capacidade de formação de espumas de clara de ovo. Sendo a única proteína com grupos tiol livres, as espumas produzidas com ovalbumina tendem a ser mais estáveis devido às ligações dissulfeto.<sup>6</sup> A ovotransferrina aumenta a hidrofobicidade da superfície, o que é importante para a estabilidade da espuma, e contribui para a sinergia da mistura de proteínas durante a formação de espumas por meio de agregados covalentes na superfície ar-água, pois é a proteína mais desnaturada durante a formação de espuma. Na interface, a lisozima carregada positivamente interage por ligações eletrostáticas com outras proteínas carregadas negativamente, principalmente a ovomucina, reduzindo assim as interações repulsivas eletrostáticas no filme de proteínas e estabilizando a espuma de maneira eficaz.<sup>8,49,50</sup>



**Figura 3** – Mecanismo de formação de espumas de clara de ovo. 1 – Clara de ovo em cru, isto é, sem qualquer agitação. É composta por 90% de água e 10% de proteína. 2 – Grandes bolhas de ar no meio da clara de ovo, com a maior parte das proteínas desnaturadas. 3 – Formação completa da espuma, designada de “claras em castelo”, com as proteínas desnaturadas orientadas à volta de pequenas bolhas de ar. (Adaptado)<sup>62</sup>

Além das propriedades físico-químicas das proteínas, existem outros parâmetros que afetam a formação de espumas de clara de ovo, incluindo, entre outros, a concentração de sal, o teor de açúcar, o pH, a temperatura, o tempo de armazenamento e as condições de processamento.<sup>52</sup> A adição de NaCl aumenta a capacidade de formação de espuma, aumentando conseqüentemente o volume de espuma. O sal aumenta as interações proteína-proteína (repulsão eletrostática), permitindo que elas se desenvolvam mais rapidamente e sejam incorporadas na interface ar-água, aumentando assim a capacidade de formação de espuma. A adição de açúcar à clara de ovo geralmente diminui o volume da espuma, mas aumenta a estabilidade desta devido a um aumento na viscosidade.<sup>6,61</sup> A estabilidade da espuma é elevada a um pH de 8,6 e diminui com a alteração do pH, sendo o volume de espuma maior a pH 4,8 e menor a pH 10,7.<sup>59</sup> À temperatura ambiente, a formação de espuma começa rapidamente e é atingido um volume maior do que à temperatura de refrigeração. Isto resulta da elevada tensão superficial do albúmen à temperatura mais baixa. A estabilidade da espuma da clara de ovo diminui quando se utilizam ovos com maior tempo de armazenamento, dada a transformação da N-ovalbumina em S-ovalbumina. Como a S-ovalbumina é mais hidrofílica, interfere na formação de um filme coeso na interface ar-água.<sup>59</sup> A contaminação da gema também diminui a capacidade de formação de espuma, pois os componentes da gema podem complexar com a ovomucina.<sup>60</sup> A pasteurização também diminui a capacidade de formação de espuma da clara de ovo devido à formação de um complexo ovomucina-lisozima. É necessária a remoção deste complexo para recuperar as propriedades de formação de espumas adequadas.<sup>59</sup>

A capacidade de formação e estabilidade de espumas pode ser melhorada pela adição de proteínas de soro de leite e caseínas, de hidrocolóides, como a goma xantana e a pectina que aumentam a viscosidade da espuma, pela hidrólise parcial dos oligossacarídeos presentes nas glicoproteínas ligadas às proteínas da clara de ovo e por tratamento com amilases.<sup>8,9,59,63</sup> A partir da informação descrita anteriormente, pode-se concluir que as proteínas da clara de ovo oferecem uma ampla gama de aplicações possíveis de formação de espuma em conceitos inovadores de alimentos.<sup>8</sup>

### **1.3. Contaminantes e microrganismos**

#### **1.3.1. Contaminação química e microbiológica**

Os ovos podem ser a causa de toxicidade e causar doenças de origem alimentar devido à contaminação química ou microbiana. Os contaminantes químicos são

originários de resíduos de tratamentos que envolvam medicamentos veterinários ou aditivos para a alimentação animal ou contaminantes de origem ambiental, como dioxinas, furanos ou policlorobifenilos. Além disso, as galinhas podem consumir ração ou água contaminadas. Estes compostos tóxicos também podem ser pesticidas aplicados em culturas e solos.<sup>15,64</sup>

Os contaminantes microbianos dos ovos são geralmente bactérias entéricas, sendo a *Salmonella enteritidis* a maior ameaça.<sup>65-68</sup> Na Europa, 90% das doenças transmitidas pelo consumo de ovos ou ovoprodutos são devidas à *Salmonella*.<sup>69</sup> O conteúdo dos ovos é frequentemente um meio adequado para o crescimento bacteriano. Portanto, o risco de contaminação dos ovos por bactérias patogénicas, especialmente *S. enteritidis*, é uma grande preocupação para as indústrias de produção e fabricação de ovos.<sup>64</sup>

Os ovos podem ser contaminados externamente, na sua casca, e internamente, isto é, durante o desenvolvimento.<sup>69</sup> As cascas dos ovos podem estar em contacto com os microrganismos fecais da galinha ou com outros microrganismos presentes no ambiente e provenientes de fontes como animais roedores, gado e dos tratadores de galinhas. Deste modo, a *Salmonella* pode penetrar na clara do ovo através dos poros presentes na casca.<sup>15,67-70</sup> No entanto, é possível a contaminação direta da gema, do albúmen e da casca de ovo antes da oviposição, originada pela infeção dos órgãos reprodutivos da galinha com *Salmonella enteritidis*.<sup>67,68,70</sup> Após a oviposição, a sobrevivência e crescimento de *Salmonella* na superfície externa da casca dos ovos é facilitada pela presença de excrementos de galinha e outros materiais orgânicos.<sup>68</sup>

Embora a *Salmonella* seja o microrganismo contaminante mais associado a esta tipologia de alimento, este não é o único, dado que podem existir outras bactérias no ovo, como *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Aeromonas spp.*, entre outros.<sup>68,70,71</sup> Além da contaminação bacteriana, as micotoxinas produzidas por fungos e vírus, como os vírus da gripe aviária e os vírus da doença de *Newcastle*, podem potencialmente contaminar ovos e ovoprodutos, através da sua presença no conteúdo interno do ovo ou nas fezes em contacto com a casca.<sup>68</sup>

Após a contaminação da superfície da casca, o ovo possui dois mecanismos de defesa para impedir a invasão microbiana: a casca e a clara do ovo.<sup>69</sup> A cutícula, a casca e as membranas da casca são barreiras que impedem a penetração de microrganismos da superfície para o conteúdo do ovo, sendo o principal mecanismo de defesa. A cutícula contém mucoproteínas, sendo resistente à água e à penetração de microrganismos; a casca

representa uma barreira física desvantajosa devido à possível passagem de microrganismos através dos seus poros, no entanto, contém fatores antimicrobianos, como a lisozima e a ovotransferrina. A clara de ovo representa uma linha de defesa importante contra bactérias invasoras, através de um amplo espectro de moléculas e mecanismos antimicrobianos. Os principais fatores antimicrobianos presentes no albúmen são a lisozima, que tem efeito bactericida, a avidina e a ovotransferrina. No entanto, existem outras proteínas que estão envolvidas na atividade antimicrobiana da clara de ovo, embora o seu papel seja menos relevante, como a cistatina, a ovostatina e a ovoflavoproteína.<sup>15,66,69</sup>

A idade da galinha é um parâmetro importante na taxa de contaminação microbiana dos ovos, sendo a resistência à *Salmonella* maior com a idade do animal.<sup>68,69</sup> Também a alimentação da galinha e o estado de saúde e sanitário do ambiente reprodutivo influenciam as espécies de bactérias encontradas e o nível de contaminação.<sup>69</sup> A contaminação também pode ocorrer durante o transporte e/ou embalagem de ovos. Por todos os motivos descritos acima, controlar os fatores que influenciam a contaminação da casca de ovo é essencial para impedir a disseminação de microrganismos.<sup>69</sup>

O “Código de Práticas Higiênicas para Ovos e Ovoprodutos (CAC/RCP 15–1976)”, adotado em 1976, revisto em 2007, recomenda práticas para produção primária, classificação, processamento, armazenamento, transporte e distribuição de ovos para consumo humano. No geral, este documento trata dos principais aspetos de higiene no controlo e prevenção da contaminação de ovos e derivados. Os produtores devem garantir, portanto, que o produto comercializado esteja em conformidade com os regulamentos que regem a segurança de produtos alimentícios.<sup>64</sup>

### 1.3.2. Destruição de microrganismos

Muitos métodos têm sido utilizados para destruir microrganismos em ovos e ovoprodutos, sendo o tratamento térmico o mais aplicado.<sup>69</sup> A pasteurização do ovo visa destruir a maioria dos microrganismos vegetativos (5 a 6 reduções decimais), incluindo alguns patogêneos, especialmente a *Salmonella* e outras bactérias Gram-negativas, mas é ineficaz contra as bactérias formadoras de esporos. Algumas bactérias gram-positivas como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* podem sobreviver após a pasteurização.<sup>15,49,69,72</sup> Os procedimentos de pasteurização adotados por vários países variam nos binómios temperatura-tempo.<sup>71</sup> As recomendações americanas apontam para 5 reduções decimais de *Salmonella* no ovo inteiro e na gema, com binómios de tempo-

temperatura de 3,5 minutos a 60,0°C e de 2,5 minutos a 61,1°C. Na Europa, o tratamento térmico tem a duração de 5 a 6 minutos, a 65°C.<sup>49,73</sup> Os tratamentos térmicos são mais suaves para a clara de ovo, entre 55 e 57°C, durante 2 a 6 minutos, devido à maior sensibilidade térmica das proteínas do albúmen.<sup>49,69,72</sup>

Para um tratamento térmico eficiente da clara de ovo devem ser considerados parâmetros de pH, temperatura e tempo. O pH da clara de ovo varia, normalmente, entre 8,4 e 9,2, devendo estes valores permanecer durante o tratamento térmico, aliado a um binómio de tempo-temperatura.<sup>73</sup> Existem três processos usados para pasteurizar a clara de ovo líquida: o processo com ácido láctico-sulfato de alumínio, o processo com peróxido de hidrogénio e o processo a vácuo.<sup>37,73</sup> A pasteurização com ácido láctico-sulfato de alumínio depende do uso de uma faixa de temperatura de 60 a 62°C durante 3,5 a 4 minutos. A estabilização da clara do ovo é realizada adicionando ácido láctico e uma solução de sulfato de alumínio antes do aquecimento. O ácido láctico permite que a ovalbumina, a ovomucoide e a lisozima se tornem mais resistentes ao calor e a adição de sais de alumínio formam um complexo com a ovotransferrina, estável ao calor. Quando se dá a pasteurização, o pH do albúmen líquido deve ser aproximadamente 7. Para o processo com peróxido de hidrogénio (agente bactericida), a clara de ovo líquida é aquecida a 52-53°C durante 3,5 minutos. O albúmen é arrefecido e é adicionada a catalase para decompor o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, produzindo uma clara de ovo pasteurizada segura que também possui boa capacidade de formação de espuma. O método de pasteurização a vácuo consiste num método para pasteurizar claras de ovos a 57°C, com uma duração de apenas 3,5 minutos. Para isso, usa-se uma câmara de vácuo e, de seguida, a clara de ovo é aquecida.<sup>37,60,73</sup>

Embora a pasteurização por calor seja eficiente para controlar o crescimento de *Salmonella*, esse método pode afetar as propriedades funcionais dos componentes do ovo.<sup>70</sup> De modo a superar as limitações da pasteurização, existem métodos alternativos para substituir ou complementar o tratamento térmico convencional, como a radiação ultravioleta (UV), a irradiação, os ultrassons, o campo elétrico de alta voltagem (PEF), a alta pressão hidrostática (HPP), entre outros.<sup>68,70</sup> Os principais métodos de descontaminação de ovos para reduzir o risco de doenças transmitidas pelo consumo deste alimento e dos seus derivados são apresentados na **Tabela 4**.

Nos últimos anos têm-se realizado estudos com abordagens naturais, ecológicas e biológicas para a prevenção e diminuição da contaminação de microrganismos e micotoxinas, assim como forma de diminuir o uso de antibióticos. Um exemplo desta

abordagem é a quitosana, um polissacarídeo extraído dos crustáceos com capacidade de formar filmes ou revestimentos e com propriedades antimicrobianas, que foi incorporada como um revestimento eficaz para reduzir *S. enteritidis* nos ovos. Outro exemplo são os fitoquímicos, compostos produzidos por plantas que demonstram possuir atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. O carvacrol e o eugenol são fitoquímicos que mostraram eficiência na redução da bactéria *S. enteritidis* e dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em ovos.<sup>68</sup>

**Tabela 4** - Métodos que previnem e diminuem a contaminação de ovos para reduzir o risco de doenças transmitidas pelo consumo de ovos e derivados. (Adaptado de O'Brayan *et al.*<sup>70</sup> e de Upadhyaya *et al.*<sup>68</sup>)

<b>Métodos Químicos</b>	Água eletrolisada
	Ozono
<b>Métodos Físicos</b>	Pasteurização
	Radiação Ultravioleta (UV)
	Irradiação
	Microondas
	Ultrassons
	Campo elétrico pulsado de alta voltagem (PEF)
	Alta pressão hidrostática (HPP)
<b>Métodos Biológicos</b>	Probióticos
	Quitosana
	Fitoquímicos
	Ácidos orgânicos

### 1.3.3. Minimização do crescimento microbiano

Uma recomendação para restringir o crescimento de *Salmonella* e outros contaminantes em ovos é a refrigeração imediata a temperaturas que não permitam o crescimento desses patógenos e das suas toxinas.<sup>37,68,70</sup> A refrigeração é responsável pela seleção dos microrganismos psicotróficos, sendo as espécies *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* as principais responsáveis por doenças transmitidas pelo consumo de ovos e dos seus derivados. No que se refere à deterioração alimentar, os géneros *Pseudomonas* são predominantes, mas também são descritos os géneros *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Micrococcus*. Uma temperatura de 2°C impede o crescimento dessas bactérias e, portanto, representa um controlo eficaz. Um baixo aumento de

temperatura pode, no entanto, representar um risco, pois as atividades metabólicas destes microrganismos podem ser observadas a 4°C, mesmo que as taxas de crescimento sejam mínimas. A produção de toxinas é interrompida em temperaturas de refrigeração para a maioria dos microrganismos.<sup>69</sup> No entanto, uma vez contaminados por micotoxinas, o processamento térmico dos ovos não é eficaz na destruição dessas toxinas, pelo que impedir a contaminação dos ovos após a colheita é a medida de controlo mais eficaz.<sup>68</sup> A refrigeração retarda a deterioração da membrana da gema. Uma membrana de gema forte é importante na quebra de ovos, especialmente ao separar a clara de ovo dos restantes componentes.<sup>37</sup> Outros métodos recomendados são a congelação dos ovoprodutos, que torna a água indisponível para as bactérias devido à sua solidificação e a desidratação, que produz um pó com uma atividade de água entre 0,2 e 0,3, inibindo qualquer desenvolvimento microbiano. As estratégias descritas anteriormente são comumente usadas no setor alimentar e a expansão das práticas de refrigeração melhorou a qualidade e o prazo de validade dos produtos alimentícios.<sup>69,70</sup>

As embalagens de atmosfera modificada usando gases como CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub> são frequentemente aplicadas para prolongar o prazo de validade dos alimentos, inibindo a deterioração química, enzimática e microbiana. O embalamento de ovoprodutos numa atmosfera com elevado teor de CO<sub>2</sub> mantém as propriedades funcionais do ovo, especialmente dos fatores presentes no albúmen responsáveis pela formação e estabilidade das espumas.<sup>37,70</sup>

#### **1.4. Produtos comerciais à base de clara de ovo**

A clara de ovo possui a vantagem de não conter colesterol e de ser rica em proteínas. A proteína do ovo é amplamente considerada a proteína de qualidade nutricional mais elevada de todas as fontes alimentares, fornecendo todos os aminoácidos essenciais em quantidades que atendem às necessidades humanas. Assim sendo, a proteína do ovo oferece benefícios nutricionais consideráveis.<sup>74</sup> Além disso, a clara de ovo é isenta de odores e sabores desagradáveis (*off-flavours*), não afetando negativamente as propriedades organoléticas dos alimentos e é um ingrediente importante na formação de espumas e na gelificação.<sup>64,74-76</sup> Deste modo, é usada numa grande variedade de produtos alimentícios, como em produtos de pastelaria, massas, molhos doces ou salgados - a clara de ovo é usada cada vez mais para clarear espumas de peixe ou de legumes -, sobremesas (*macarrons*, suspiros, *marshmallows*, mousses, *soufflés*), produtos de carne, *snacks*, suplementos alimentares para desportistas ou grávidas, entre outros.<sup>49,64,75,77,78</sup>

A clara de ovo tem sido estudada para a obtenção de novas texturas das proteínas por hidrólise enzimática, com o intuito de diversificar as suas aplicações na indústria alimentar. A hidrólise enzimática de proteínas melhora em grande parte as propriedades dos alimentos, como a digestibilidade (maior disponibilidade de aminoácidos), a qualidade nutricional e sensorial, e proporciona benefícios à saúde devido à formação de peptídeos bioativos e redução de alergénios. A inclusão de hidrolisados de clara de ovo com as propriedades tecno-funcionais ideais pode levar ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios com novos atributos de textura, sabor, propriedades reológicas, estabilidade e aparência, que são particularmente adequados para indivíduos com problemas de digestão, de obesidade e com alergias, intolerâncias ou doenças específicas a produtos lácteos.<sup>79</sup>

A clara de ovo encontra-se à venda na forma líquida (pasteurizada ou não), congelada e em pó.<sup>75,77,80</sup> Como a clara de ovo é constituída por 90% de água, a indústria alimentar recorre à desidratação para reduzir os custos de transporte e armazenamento, assim como para aumentar o seu tempo de prateleira.<sup>2,77,80</sup>



## 2. Enquadramento do estágio

### 2.1. Empresa Fabridoce – Doces Regionais, Lda.

A Fabridoce – Doces Regionais, Lda. foi fundada no centro de Aveiro no ano de 1989, como uma pastelaria especializada em doces conventuais, sendo os Ovos Moles a sua imagem de marca. Com o aumento da produção, a entrada dos produtos na cadeia de hipermercados, e com o objetivo de melhorar as práticas relacionadas com a segurança alimentar, a empresa foi translocada para a zona industrial de Cacia em 1992, onde se situa atualmente. Em 2010 conseguiu o cumprimento de requisitos da especificação Indicação Geográfica Protegida (IGP) relativamente à produção dos Ovos Moles, passando a serem designados “Ovos Moles de Aveiro” e, em 2012 conseguiu o certificado *International Featured Standards* (IFS) – Food, uma norma internacional que reconhece a segurança e qualidade dos processos e produtos. Na última década, a empresa foi alargando a diversidade de produtos, possuindo atualmente uma vasta gama disponível (**Tabela 5**): a gama Conventual, a gama Biscoitos, a gama Pastéis, a gama Sobremesas e a gama Gelados de Portugal. Dependendo do tipo de produto, a empresa possui diferentes marcas: Fabridoce, Gelados de Portugal, Oficina do Doce e Sabores com Tradição (**Figura 4**).<sup>81</sup>



**Figura 4** – Logotipos das diferentes marcas da empresa Fabridoce.

Para além da empresa, a Fabridoce possui a loja “Sabores com Tradição” no centro de Aveiro, desde 2008, onde divulga os seus produtos com estatuto *gourmet* e algum artesanato local e regional. Esta loja foi uma aposta num novo nicho de mercado para chegar a um maior número de clientes. Em 2009 criou-se o espaço interativo e de exposição designado “Oficina do Doce”, que tem como objetivo divulgar a história dos doces tradicionais da região, nomeadamente através da demonstração do fabrico dos Ovos Moles. No ano de 2013 surgiu a gelataria “Gelados de Portugal”, com a ideia de incorporar o sabor do produto que é a imagem de marca da empresa, os Ovos Moles de Aveiro, e de outros sabores de doces tradicionais portugueses. Estes gelados artesanais destacam-se pela sua cremosidade e por não recorrerem a corantes ou quaisquer aditivos alimentares sintéticos, resultando em sabores genuínos e intensos.

**Tabela 5** – Gama de produtos comercializados pela Fabridoce. (Adaptado)<sup>81</sup>

<b>Gama Conventual</b>	<b>Gama Biscoitos</b>	<b>Gama Sobremesas</b>	<b>Gama Gelados de Portugal</b>
Ovos Moles de Aveiro	Raivas de Aveiro	Pudim de Leite Condensado	Ovos Moles de Aveiro
Moliceiros com Ovos Moles	Línguas da Sogra Gourmet	Pudim de Ovos	Leite Creme
Creme de Ovos Moles	Beijinhos de Pombal	Pão de Ló Conventual Individual	Requeijão com Doce de Abóbora
Pão de Ló Conventual	Telhas de Amêndoa Gourmet	Pão de ló de Chocolate Individual	Mirtilo com Framboesas e Chocolate
Fios de Ovos	Bolos de Gema Gourmet	Mini Cheesecake de Frutos Silvestres	Banana da Madeira
Lampreia de Ovos	Mós de Chocolate	Mini Cheesecake de Caramelo Salgado	Chocolate com Suspiros
Trouxas de Ovos	Suspiros	Tartelete de Mousse de Chocolate	Pastel de Nata
Truffas com Ovos Moles	Bolinhos de Amendoim	Tartelete de Lima	Bolacha Maria com Creme de Leite
Queijinhos de Amêndoa com Ovos Moles	Cavacas de Pombal	Molotof Individual com Caramelo	Sorvete com Ananás dos Açores e Hortelã
Castanhas de Ovos	Risonhas	Pudim Abade de Priscos Individual	Sorvete de Framboesa
Pecados com Ovos Moles de Aveiro	<b>Gama Pastéis</b>		Castanha e Vinho do Porto
Quindins	Tortas de Azeitão		Iogurte com Doce de Figo
	Pastéis de Águeda		Caramelo com Flor de Sal
	Pastéis de Vouzela		Limão com Mel de Rosmaninho
	Pastéis de Torres Vedras		Sorvete de Chocolate
	Salame de Chocolate		Nata com Chocolate
	Tartes de Amêndoa		Maracujá
			Laranja do Algarve
			Morango
			Baunilha

## 2.2. Objetivo do estágio e atividades desenvolvidas

A presente dissertação de mestrado foi desenvolvida nas instalações da empresa Fabridoce – Doces Regionais, Lda., no âmbito de um estágio curricular do Mestrado em Biotecnologia Alimentar da Universidade de Aveiro. Este estágio teve como objetivo o desenvolvimento de produtos com a incorporação de uma elevada quantidade de clara de ovo que permitisse a atribuição de alegações nutricionais. Deste modo foi definido um plano de trabalho que incluiu as seguintes fases: i) compreensão da composição química, propriedades, contaminantes e processos de destruição de microorganismos da clara de ovo, parâmetros que são essenciais na preparação de vários produtos alimentares que utilizam a clara de ovo como ingrediente; ii) investigação de produtos no mercado à base de clara e de outros que pudessem incorporar uma elevada quantidade deste ingrediente na sua formulação, levando a poder incluir alegações nutricionais e iii) desenvolvimento desses produtos e otimização de formulações já desenvolvidas em ambiente empresarial, servindo como forma de escoamento de uma matéria-prima obtida como subproduto da desclaração do ovo.

A Fabridoce utiliza maioritariamente gema para a preparação das várias gamas de produtos, nomeadamente da gama Conventual (**Tabela 5**). A gema utilizada como matéria-prima é rececionada desclarada, podendo ser pasteurizada ou fresca. O único produto que utiliza gema fresca na sua formulação são os Ovos Moles de Aveiro. Além da gema, a empresa também adquire ovos inteiros e clara pasteurizada.

No ano de 2016, a Fabridoce comprou 43 toneladas de gema fresca para a produção de Ovos Moles, o que equivale a aproximadamente a 2,9 milhões de ovos. Em 2018 houve um crescimento de 24% na compra de gema fresca relativamente ao ano de 2016, tendo a empresa adquirido 54 toneladas nesse ano, equivalendo a 3,6 milhões de ovos. Caso esta última quantidade de ovos fosse desclarada no local, esse valor corresponderia a cerca de 91 toneladas de clara de ovo. A empresa tem como objetivo estudar a viabilidade do processo de compra de ovos inteiros e proceder à separação da gema e da clara de ovo no local, permitindo-lhe autonomia em relação ao único fornecedor que efetua a desclaração de ovos para Ovos Moles de Aveiro IPG, em Portugal. No entanto, ao efetuar este procedimento, a empresa acumulará uma quantidade elevada de clara, para a qual ainda não tem uso. De forma a justificar a viabilidade económica do novo processo é conveniente desenvolver um ou mais produtos que incorporem uma percentagem significativa de clara de ovo, com o intuito de escoar esta

matéria-prima e de forma a que estes produtos se enquadrem no âmbito da empresa e tenham sucesso no mercado.

A produção e o consumo mundial de ovos e ovoprodutos tem aumentado bastante nos últimos 20 anos.<sup>82</sup> De acordo com a *Food and Agricultural Organization* (FAO), em 2015 foram produzidos 72 milhões de toneladas de ovos a nível mundial, e prevê-se que sejam produzidos 89 milhões de toneladas em 2030.<sup>64,83</sup> Devido ao aumento expectável de produção e consumo de ovos e derivados no futuro, às propriedades nutricionais e funcionais da clara de ovo e ao aumento de indivíduos que têm optado por uma alimentação mais saudável e/ou vegetariana<sup>27,74</sup>, é pertinente que exista interesse por parte da empresa em desenvolver produtos que contenham clara de ovo, abrangendo um novo nicho de mercado.

Apesar do objetivo da dissertação ser o desenvolvimento de produtos com clara de ovo, o estágio curricular foi muito mais abrangente, proporcionando a participação noutra tipo de tarefas que estavam a decorrer na empresa, no âmbito dos procedimentos de Gestão e Qualidade. Foi realizado o acompanhamento de projetos internos, nomeadamente na otimização do protocolo/receita dos fios de ovos (produto já comercializado pela empresa) e no desenvolvimento de produtos na área da inovação.

### **2.3. Produtos desenvolvidos, com vista a alegações nutricionais**

De acordo com o *website Nosh*<sup>84</sup>, a clara de ovo possui várias características que os consumidores procuram num alimento, como o elevado teor de proteína, a sua elevada digestibilidade, o facto de ser livre de colesterol e de não ter um sabor intenso, o que significa que pode ser incorporada em diversos perfis de sabor.

Devido ao facto de a clara de ovo conter um elevado teor de proteína, os produtos finais poderão ter como alegação nutricional “fonte de proteínas” ou “rico em proteínas”. Segundo a legislação em vigor, Regulamento (CE) N.º 1924/2006, relativa a alegações nutricionais e de saúde sobre alimentos, o conceito “fonte de proteínas” corresponde a “uma alegação de que um alimento é uma fonte de proteínas, ou qualquer alegação que possa ter o mesmo significado para o consumidor, só pode ser feita quando, pelo menos, 12 % do valor energético do alimento for fornecido por proteínas”. Já o conceito “rico em proteínas” é mais restrito, pois a alegação só poderá ser feita quando, pelo menos 20% do valor energético do alimento for fornecido por proteínas.<sup>85</sup> O produto final poderá conter outro tipo de alegação nutricional consoante os ingredientes selecionados (**Tabela 6**).

**Tabela 6** – Resumo das possíveis alegações nutricionais que um produto saudável com clara de ovo poderá conter. (Adaptado do Regulamento (CE) N.º 1924/2006 <sup>85</sup>)

Alegações nutricionais	Condições a que se aplica
Baixo teor de gordura	Sólidos – até 3g de gordura/100g
Baixo teor de gordura saturada	Sólidos – até 1,5g/100g (*)
Baixo teor de açúcares	Sólidos – até 5g de açúcares/100g
Sem adição de açúcares	Não contém quaisquer monossacarídeos ou dissacarídeos adicionados, nem qualquer outro alimento utilizado pelas suas propriedades edulcorantes. Caso os açúcares estejam naturalmente presentes no alimento, o rótulo deve também ostentar a seguinte indicação “Contém açúcares naturalmente presentes”
Baixo teor de sal	Sólidos - até 0,12g/100g
Fonte de fibra	Mínimo, 3g de fibra/100g ou, pelo menos, 1,5g de fibra/100 kcal
Alto teor em fibra	Mínimo, 6g de fibra/100g ou, pelo menos, 3g de fibra/100 kcal

(\*) soma dos ácidos gordos saturados e dos ácidos gordos trans, não pode fornecer mais de 10% do valor energético.

### 2.3.1. Aperitivos crocantes com clara e queijo

Segundo o *website Health Line*<sup>86</sup>, em 2018, o mercado de *snacks* foi avaliado em 23,05 mil milhões de dólares. O crescente foco do consumidor nos valores nutricionais do produto, como o elevado teor de proteínas, baixo teor calórico, aliado à crescente necessidade de produtos *ready-to-eat*<sup>87</sup>, tem favorecido o crescimento deste mercado. Os alimentos *ready-to-eat* são cada vez mais populares entre os consumidores, principalmente devido à sua conveniência de consumo, facilidade de preparação e armazenamento, aparência e textura atraentes.<sup>87</sup>

Para a escolha dos ingredientes dos aperitivos crocantes com clara foi realizado um estudo de mercado, que consistiu em analisar os ingredientes e o valor nutricional de alguns *snacks* crocantes vendidos no mercado (**Tabela 7**). Após a análise global desse estudo, foram selecionados possíveis ingredientes para o desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara tendo em conta o valor nutricional, as propriedades funcionais e organolépticas dos ingredientes, bem como o seu custo.

Os *snacks* crocantes *Cheetos* e *Doritos* utilizam nas suas formulações substâncias aromatizantes artificiais e corantes, o que não vai ao encontro dos produtos comercializados pela Fabridoce, pois estes não utilizam nem corantes nem conservantes. Relativamente ao *snack* Sunbites, este utiliza 58% de grãos integrais, o que se reflete no elevado teor de fibra. Os *snacks* LesserEvil e Quevos contêm clara de ovo como ingrediente e possuem um elevado teor de proteína, o que leva a considerar que à partida o produto desenvolvido terá também uma elevada quantidade de proteína. A proteína de clara de ovo é normalmente combinada com outras proteínas animais ou vegetais, como proteínas do leite (caseína, proteína de soro de leite), proteína de soja, proteína de trigo, proteínas de sementes oleaginosas. Essas proteínas, dependendo do seu teor, podem ser designadas como isolados ou como concentrados.<sup>74</sup> Os isolados têm um conteúdo de proteína igual ou superior 90% e os concentrados possuem um conteúdo de proteína inferior a 90%.<sup>74</sup> Os *snacks* apresentados possuem um “padrão” de ingredientes, isto é, contêm um ingrediente base, sêmola de milho/grãos integrais/claras de ovos; um tipo ou misturas de farinhas, para estabilizar a estrutura do *snack* e atribuir-lhe crocância; especiarias para dar sabor; aromas (queijo, sal marinho); óleo vegetal e reguladores de acidez (ácido láctico e/ou ácido cítrico). Cada produto possui ainda ingredientes diferenciadores como forma de os destacar no mercado.

Tendo por base este estudo de mercado e o levantamento de literatura realizado, encontram-se na **Tabela 8** as opções de ingredientes para o desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara de ovo.

**Tabela 8** – Possíveis ingredientes para o desenvolvimento dos aperitivos crocantes à base de clara de ovo. A sombreado encontram-se os ingredientes utilizados neste projeto.

<b>Especiarias</b>	<b>Farinhas</b>	<b>Queijos ralados</b>	<b>Queijos em pó</b>	<b>Reguladores de acidez</b>	<b>Outros ingredientes</b>
Ervas de Provence	Milho integral	Mozzarella	Ricotta	Ácido cítrico	Óleo vegetal
Alho em pó	Trigo	Gouda	Gouda	Ácido láctico	Fibra de trigo
Salsa picada	Arroz	Cheddar	Cheddar		Proteína de ervilha
Mistura de pimentas	Aveia	Emmental	Parmesão		
Flor de Sal					

**Tabela 7** – Estudo de mercado relativo ao valor nutricional e ingredientes utilizados na formulação de *snacks* das marcas *Cheetos*, *Doritos*, *Sunbites*, *LesserEvil* e *Quevos*.

Marca	Calorias (kcal)/100g	Lípidos (g)	Carboidratos (g)	Proteína (g)	Fibra (g)	Ingredientes
Cheetos	484	24,3 (3,3 saturados)	59,4 (4,9 açúcares)	5,6	2,7	Sêmola de milho, óleo vegetal, aroma a queijo (lactose, glutamato monossódico), substâncias aromatizantes naturais e artificiais, concentrado de proteína de soro de leite, ácido láctico, ácido cítrico, corante (extrato de pimentão), sal.
Doritos	503	26,4 (3,3 saturados)	62,1 (2,3 açúcares)	6,5	4,9	Milho, óleos vegetais, condimento preparado com sabor a queijo (soro de leite em pó, farinha de trigo, sal, queijo em pó, tomate em pó, cebola em pó, manteiga em pó, intensificador de sabor (glutamato monossódico), alho em pó, reguladores de acidez (ácido láctico, ácido cítrico), corantes naturais, especiarias.
Sunbites	480	21,6 (2,2 saturados)	60,7 (7,3 açúcares)	7,5	6,6	Grãos integrais (milho e trigo integral, farinha integral de aveia), óleo de girassol, farinha de arroz, açúcar, aroma a sal marinho (especiarias, sal marinho, ervas aromáticas, ácido cítrico).
Lesser Evil	464	17,9 (1,79 saturados)	50	21,4	3,6	Claras de ovos, farinha de mandioca, amido de tapioca, óleo de abacate, sólidos de tapioca, sal do cristal do Himalaia, levedura nutricional, <i>flavour</i> natural, extrato de levedura, alho em pó, cebola em pó, ácido láctico, mostarda, especiarias (todos os ingredientes são orgânicos).
Quevos	452	25,8 (6 saturados)	29 (3 açúcares)	32,3	19,4	Claras de ovos, proteína de ervilha, farinha de amêndoa, amido de tapioca, cebola em pó, sal, especiarias, extrato de levedura, açúcar (mel), pimenta, tomate em pó, paprika, sumo de limão, vinagre destilado, ácido láctico, ácido cítrico, óleo de abacate, sementes de chia, lecitina, manteiga de vaca, prebióticos.

### 2.3.2. Pastéis com clara, espinafres e pimentos

Atualmente não existem pastéis que contenham clara de ovo como ingrediente principal, sendo uma oportunidade de abranger um novo nicho de mercado. Os únicos alimentos semelhantes a esta proposta de produto, são os *muffins* à base de clara de ovo da marca *Garden Lites*, com diversos sabores e as sanduíches com salsicha, clara de ovo e queijo da marca *Jimmy Dean Delights*. Ambos os produtos encontram-se à venda na forma ultracongelada, sendo práticos de preparar e possuindo a vantagem de se retirar apenas a quantidade que se pretende consumir. No entanto, a maioria dos pastéis comercializados, principalmente em Portugal, contêm gema e/ou ovo inteiro, como é o caso do pastel de nata e da queijada. Estes produtos foram analisados em termos de valor nutricional e dos ingredientes que os constituem, de forma a selecionar os ingredientes para o desenvolvimento dos pastéis (**Tabela 9**).

**Tabela 9** – Estudo de mercado relativo ao valor nutricional e ingredientes utilizados na formulação do pastel de nata, da queijada e de *muffins* contendo clara de ovo das marcas Jimmy Dean Delights e Garden Lites. Os valores declarados são por 100g de alimento.

Marca/ Tipo de pastel	Valor energético (kcal)	Lípidos (g)	Hidratos de carbono (g)	Proteína (g)	Ingredientes
Pastel de nata	218	7,3	33,6	4,5	Leite, açúcar, farinha de trigo, ovo, gema, canela, casca de limão, massa folhada.
Queijada	375	14,8	54,1	8,5	Leite, açúcar, ovos, farinha de trigo, creme vegetal, canela, casca de limão.
Jimmy Dean Delights	193	6,2	22,1	11,7	<i>Muffin</i> de clara de ovo: clara de ovo, amido de tapioca modificado, carragenina, aromas naturais, sal, lecitina de soja. *
Garden Lites	123	7,0	8,8	8,8	Espinafre, tomate, cebola, pimento vermelho, clara de ovo, queijo mozzarella, óleo de canola, açúcar, amido de milho, alho em pó, sal, aroma natural a queijo, pimenta preta.

“\*” – Apenas estão apresentados os ingredientes do *muffin* de clara e não da sanduíche na sua totalidade.

Tendo por base o estudo de mercado, o objetivo foi desenvolver um produto que contivesse massa folhada ou massa filo na parte exterior e uma mistura de clara de ovo, espinafres e pimentos no interior, podendo ser consumidos como sobremesa, lanche ou pequeno-almoço.

### 2.3.3. Barras de sementes com clara

De acordo com os dados recolhidos no mercado, os consumidores aceitam a proteína da clara de ovo em novos formatos, sendo as barras a forma mais comercializada. No que diz respeito a barras saudáveis, a proteína da clara do ovo foi responsável por 115,2 milhões de dólares em 2019, um aumento de 379,9% em relação ao ano de 2018, segundo o grupo de pesquisa de mercado SPINS.<sup>84</sup>

As barras de cereais/sementes são produtos obtidos pela mistura de ingredientes secos e de aglutinantes, que se completam mutuamente conferindo o sabor, a textura e as propriedades físicas às barras.<sup>88</sup> Os aglutinantes consistem numa mistura à base de açúcares, cujas funções são adoçar o produto e manter os ingredientes secos unidos. Podem também conter humectantes, gordura e emulsificantes em pequenas quantidades, visando macieza, brilho, melhor *mouthfeel* e o controlo da humidade pela formação de um filme na superfície.<sup>89</sup> Elevados teores de humidade em barras de cereais são indesejados por reduzirem a crocância característica e favorecerem as reações de escurecimento não enzimático e o crescimento microbiano.<sup>88,89</sup> Os aglutinantes mais utilizados na formulação de barras são a sacarose, o xarope de glucose/frutose, maltodextrina, polióis, manteigas, óleos vegetais, lecitina de soja (emulsificante) e glicerina (humectante).<sup>89,90</sup> Os ingredientes secos incorporados nas barras de cereais são geralmente grãos, sementes e frutos. É nesta fração que ocorrem a maior diferenciação entre os produtos.<sup>88</sup>

Tal como para os aperitivos crocantes com clara e queijo e os pastéis com clara, espinafre e pimentos, também foi realizado um estudo de mercado para as barras de sementes com clara de ovo (**Tabela 10**). O objetivo deste estudo foi correlacionar os ingredientes usados com o teor de proteína e de fibra de cada barra. O uso de isolados ou concentrados de proteína animal e/ou vegetal como ingrediente principal, que é o caso das barras Pure Protein e EvoBars, traduz-se num elevado teor de proteína, com a alegação nutricional de “rico em proteína”. Pelo contrário, quando nos ingredientes constam grãos ou farinhas de cereais, as barras contêm um elevado teor de fibra, possuindo a alegação nutricional de “rico em fibra”, que é o caso das barras da marca NuGo e FiberOne. As duas primeiras barras listadas na **Tabela 10** contêm como ingrediente principal a clara de ovo e possuem as alegações nutricionais “rico em proteína” e “rico em proteína e fonte de fibra”, respetivamente. Estas barras utilizam na sua formulação apenas 5 ingredientes. Se se adicionar ingredientes com alto teor de fibra,

como cereais/pseudocereais/sementes, a alegação nutricional poderá alterar-se para “rica em fibra”, ao invés de “fonte de fibra”.

Os principais aspectos a ter em consideração na elaboração deste tipo de produtos são a escolha dos cereais/pseudocereais/sementes e a seleção dos hidratos de carbono.<sup>88</sup> Tendo em conta o custo, o valor nutricional e as funcionalidades de vários cereais/pseudocereais/sementes foram selecionados a quinoa, a chia, as sementes de abóbora, as sementes de girassol e as sementes de sésamo para o desenvolvimento de barras com clara de ovo.

A quinoa (*Chenopodium Quinoa*) é um pseudocereal e é constituída por 61-74% de hidratos de carbono, 12-19% de proteína, 10-13% de água, 5-10% de lípidos e 3% de minerais.<sup>91</sup> Em relação à proteína, contém albuminas e globulinas (proteínas citoplasmáticas) e prolaminas e glutelinas (proteínas de armazenamento), sendo que contém uma excelente composição de aminoácidos essenciais, como a lisina, metionina e cisteína, limitados em muitas plantas. A quinoa é considerada um grão isento de glúten devido à pouca quantidade de prolaminas na sua constituição (0,5%-7,0%).<sup>91,92</sup>

A chia (*Salvia hispanica L.*) é uma das culturas mais antigas do México.<sup>93</sup> As sementes de chia são compostas por 15-25% de proteína, 30-33% de lípidos, 26-41% de carboidratos, 18-30% de fibra dietética e 4-5% de cinzas. Estas sementes são ricas em várias vitaminas, minerais e antioxidantes.<sup>93,94</sup>

As sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) contêm aproximadamente 25,2-37,0% de proteína, 37,8-45,4% de lípidos, 16,8% de fibra e 4,6% de cinza. São ricas em lípidos insaturados, nomeadamente em ácido linoleico (C18:2) e ácido oleico (C18:1). Possuem ainda vitaminas, minerais e antioxidantes.<sup>95</sup>

As sementes de girassol são conhecidas pelas suas propriedades funcionais e nutricionais. São constituídas por 20,8% de proteínas, 51,5% de lípidos, 20% de carboidratos, sendo que 8,6% corresponde a fibra e 3% de cinzas. São uma boa fonte de minerais, como selénio, cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio, zinco e cobre.<sup>96</sup>

As sementes de sésamo (*Sesamum indicum L.*) desempenham um papel importante na nutrição humana desde há 5000 anos. A composição química do sésamo demonstra que a semente é uma fonte importante de lípidos (44-58%), proteína (18-25%), carboidratos (13,5%) e cinzas (5%).<sup>97,98</sup>

Para o desenvolvimento das barras, de forma a adquirir alegações nutricionais e não encarecer demasiado o produto, o objetivo foi utilizar no máximo três sementes/pseudocereais com propriedades funcionais no desenvolvimento das barras,.

**Tabela 10** – Estudo de mercado relativo ao peso, calorias, conteúdo de fibra e proteína e alegações nutricionais de barras saudáveis, e ingredientes utilizados nas suas formulações.

Marca	Sabor	Peso (g)	Calorias (kcal)	Proteína (g)	Fibra (g)	Alegações nutricionais	Ingredientes
NuGo	Mirtilos	50	180	12	2	Rico em proteína	Clara de ovo, caju, amêndoa, sal marinho, <i>flavours</i> naturais.
RXBAR	Manteiga de amendoim	52	200	12	5	Fonte de Fibra Rico em proteína	Clara de ovo, amendoins, tâmaras, sal marinho, <i>flavours</i> naturais.
Pure Protein	Chocolate	50	180	21	2	Rico em proteína	Mistura proteica (isolado de proteínas do leite, concentrado de proteína de soro do leite, isolado de proteínas de soro do leite), sabor a chocolate, colagénio hidrolisado, glicerina, cacau em pó, xarope de maltitol, farinha de amendoim, sabores naturais, lecitina de soja, manteiga de amêndoa, sucralose.
EvoBars	Brownie	60	226	19	-	Rico em proteína	Cobertura de chocolate com leite e maltitol, camada de caramelo com adoçante, proteína de leite, colagénio hidrolisado, glicerol, água, isolado de proteína de soja, óleo de coco, cacau em pó, aroma.
NuGo	Coco	45	160	3	12	Rico em fibra	Mistura de fibra (aveia em flocos, farinha de trigo integral, farelo de trigo, psílio, linho), inulina, sumos de frutas, dextrinas de arroz, coco orgânico, ameixas, óleo de canola, amêndoas, arroz, aromas naturais, isolado de proteínas do trigo, fermento em pó, sal.
FiberOne	Chocolate e aveia	40	140	2	9	Rico em fibra	Extrato de raiz de chicória, aveia integral, chocolate amargo, xarope de milho, farinha de arroz, flocos de cevada integral, açúcar, glicerina vegetal, óleo de canola, óleo de palma, lecitina de soja, fibra de cana de açúcar, cacau, sal, frutose, extrato de malte de cevada, goma de celulose, leite em pó, aroma natural.

#### 2.3.4. Tempo de prateleira de um alimento

O tempo de prateleira de um alimento é o tempo durante o qual o produto permanece seguro, retém as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas desejáveis e está de acordo com os dados nutricionais declarados no rótulo quando armazenado e manuseado de acordo com as condições recomendadas. A durabilidade de um produto é influenciada por vários fatores, tais como o pH ou acidez, a salinidade, a atividade de água, uso de conservantes e condições de armazenamento. Combinações destes fatores são muitas vezes utilizadas em conjunto para obter estabilidade.<sup>99</sup>

No desenvolvimento deste projeto, os protótipos em estudo foram analisados ao nível da atividade de água, da temperatura e do embalamento em atmosfera modificada, considerando serem os parâmetros mais relevantes numa fase preliminar de produção dos produtos em questão.

##### 2.3.4.1. Embalagem com atmosfera modificada

A embalagem com atmosfera modificada (EAM) pode ser definida como “o invólucro de produtos alimentícios em materiais com barreira de gás, nos quais o ambiente gasoso foi alterado”. A EAM utiliza principalmente três gases, o dióxido de carbono, o azoto e o oxigénio.<sup>100</sup>

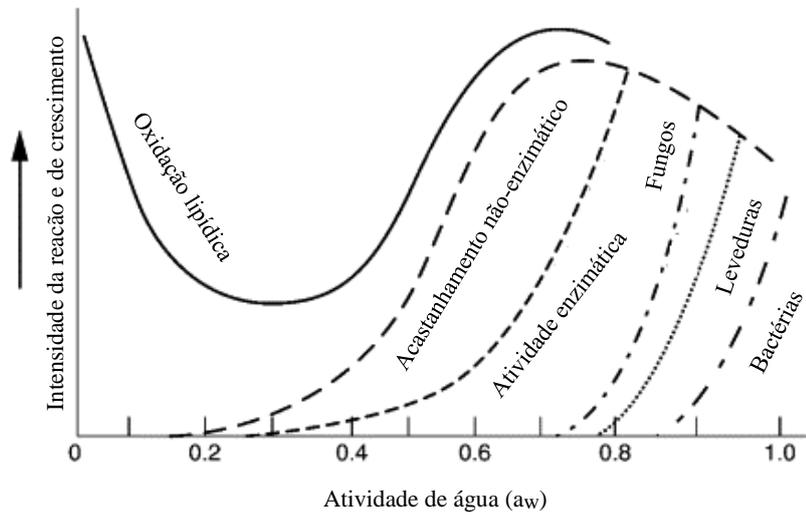
O embalamento em atmosfera modificada aumenta o tempo de prateleira e a qualidade dos alimentos, reduz o seu desperdício e a necessidade de conservantes artificiais, o que vai ao encontro dos produtos comercializados pela Fabridoce. Normalmente combinada com temperaturas mais baixas, é um método altamente eficaz de aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. A durabilidade pode ser prolongada com a criação de um vácuo na embalagem (embalagens a vácuo).<sup>99</sup>

##### 2.3.4.2. Atividade de água

O crescimento e o metabolismo dos microrganismos nos alimentos e as reações enzimáticas e químicas que ocorrem durante o armazenamento dependem da presença de água numa forma disponível.<sup>99,101</sup> A medida da atividade de água ( $a_w$ ) é relativa à água disponível para a atividade microbiana, enzimática ou química, expressa numa escala de 0 a 1, em que a  $a_w=1$  significa que toda a água se encontra no estado livre.<sup>102</sup>

O efeito da atividade de água ( $a_w$ ) nas reações bioquímicas e microbiológicas é mostrado na **Figura 5**. Praticamente toda a atividade microbiana é inibida abaixo de  $a_w=0,6$ , a maioria dos fungos, das leveduras e das bactérias é inibida abaixo de  $a_w=0,7$ ,

$a_w=0,8$  e  $a_w=0,9$ , respectivamente.<sup>101</sup> Os produtos acima descritos são ricos em clara de ovo, que por sua vez é constituída maioritariamente por água. Deste modo, possuem uma atividade de água elevada, sendo suscetíveis ao crescimento de microrganismos, nomeadamente fungos e leveduras.



**Figura 5** – Efeito da atividade de água no crescimento dos microrganismos e nas reações enzimáticas e químicas que ocorrem nos alimentos. (Adaptado de P. Fellows<sup>101</sup>)



### 3. Desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara e queijo

#### 3.1. Materiais e Métodos

##### 3.1.1. Ingredientes

Para o desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara utilizaram-se as seguintes matérias-primas: clara de ovo líquida pasteurizada, queijos ralados (mozzarella, cheddar, gouda e emmental), queijos em pó (queijo fundido ralado, ricota, cheddar, gouda e parmesão), farinha de milho integral, farinha de trigo e especiarias (ervas de Provence, alho em pó, salsa picada, mistura de pimentas, flor de sal e sal).

##### 3.1.2. Produção

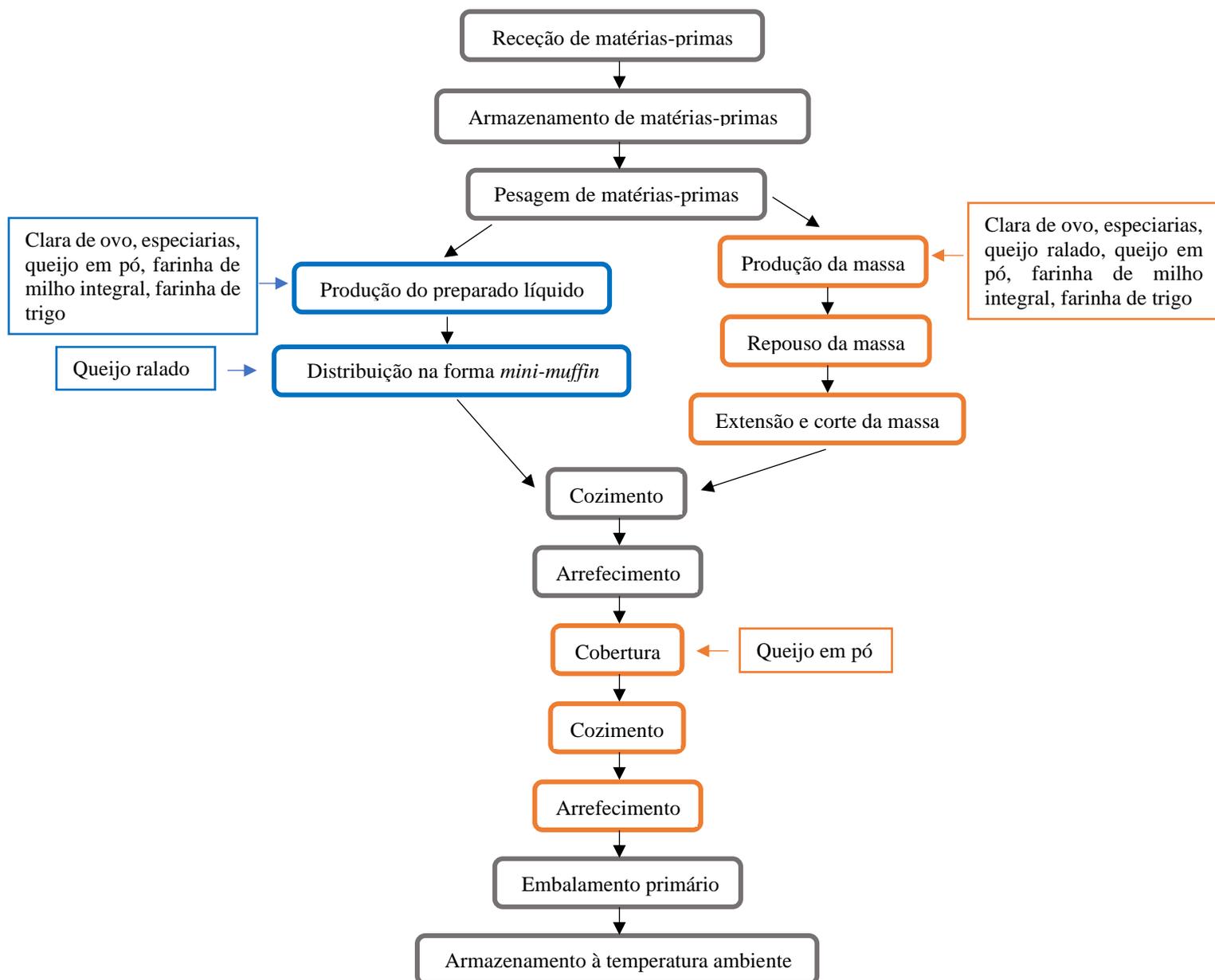
As matérias-primas foram rececionadas e armazenadas em condições cujo controlo garantisse a proteção contra contaminação e reduzissem ao mínimo as perdas na qualidade nutricional ou deteriorações. Posteriormente, foram efetuadas as pesagens dos ingredientes com recurso a uma balança digital de precisão de 0,5 g. As várias experiências foram realizadas em pequena escala (< 1 kg).

Para o desenvolvimento deste produto foram realizados dois procedimentos diferentes, em que o primeiro consistia num preparado líquido e o segundo numa massa consistente e moldável. No primeiro procedimento, adicionou-se a clara de ovo numa taça de inox e agitou-se com a ajuda de uma vara de arames até se formarem pequenas bolhas de ar (**fase 2 - Figura 3**). Posteriormente, juntaram-se as especiarias, as farinhas e o queijo em pó à clara de ovo, e mexeu-se bem até obter uma mistura líquida bem homogeneizada. Distribuiu-se uniformemente numa forma *mini-muffin* previamente untada com spray antiaderente. Em cima da mistura adicionou-se o queijo ralado e levou-se o preparado ao forno durante 10 minutos, a 200°C. Por fim, retiraram-se os aperitivos do forno, deixou-se arrefecer cerca de 10 minutos e foram removidos com ajuda de uma espátula. Os *snacks* foram armazenados à temperatura ambiente em embalagens de atmosfera modificada (80% de N<sub>2</sub>, 20% de CO<sub>2</sub> e uma percentagem residual (< 1%) de O<sub>2</sub>).

Relativamente ao segundo procedimento, misturaram-se clara de ovo, especiarias, queijo ralado/queijo em pó e farinhas até formar uma massa consistente e ao mesmo tempo moldável. Deixou-se repousar a massa pelo menos 20 minutos no frio. Após esse tempo, trabalhou-se a massa com o auxílio de um rolo até ficar com a espessura desejada

e em pedaços iguais. De seguida, levou-se o preparado ao forno a 175°C, durante 15 minutos. Retiraram-se os aperitivos do forno para arrefecerem ligeiramente, adicionou-se o queijo em pó como cobertura e levou-se novamente ao forno durante 3 minutos, à mesma temperatura. Após arrefecerem, os *snacks* foram armazenados como descrito anteriormente, à temperatura ambiente, num local seco e sem exposição solar direta.

Em ambos os casos, os aperitivos com clara estão prontos a ser consumidos após a cozedura no forno e posterior arrefecimento.



**Figura 6** – Fluxograma de produção dos aperitivos crocantes com clara. A sombreado azul e laranja está representado as etapas exclusivas do 1º e 2º procedimento, respetivamente. A sombreado cinzento está representado as etapas comuns de ambos os procedimentos.

### 3.1.3. Análise sensorial preliminar

Os aperitivos crocantes com clara foram provados de forma informal de modo a aferir o potencial e a viabilidade da formulação em questão. O produto foi avaliado em termos de aparência, odor, textura (crocância), sabor e cor, tendo sido retiradas conclusões sobre esses parâmetros, nomeadamente da crocância.

Como a metodologia de desenvolvimento de um novo produto envolve algumas alterações e retrocessos, inerentes ao decorrer do projeto, até se conseguir alcançar o objetivo inicialmente proposto, a formulação foi sendo alterada ou rejeitada caso os parâmetros mínimos de aceitabilidade sensorial não fossem cumpridos.

### 3.1.4. Determinação do tempo de prateleira

No desenvolvimento de novos produtos, a determinação do tempo de prateleira médio é um ponto de referência para testar a viabilidade e verificar a necessidade de modificação da formulação. O prazo de validade de um alimento pode ser determinado através de avaliações bioquímicas, microbiológicas e sensoriais.<sup>99</sup> Na primeira fase de desenvolvimento do produto procedeu-se a avaliações bioquímicas simples, como a medição da atividade de água, da temperatura e do nível de oxigénio na embalagem com atmosfera modificada, e sensoriais. Relativamente às avaliações sensoriais, o produto foi avaliado em termos de aparência, odor, textura (crocância), sabor e cor, para ter uma estimativa da sua durabilidade.

### 3.1.5. Medição da atividade de água e do nível de oxigénio

Para a determinação da atividade de água, as amostras foram colocadas em pequenas células de análise ocupando aproximadamente 2/3 do seu volume, tendo estas de se encontrar absolutamente secas. De seguida, inseriu-se a amostra na câmara de medição do aparelho HygroPalm HP23-AW-A (**Figura 7**), sem interferir na amostra, pois tal pode resultar em leituras erradas. Fechou-se a câmara de medição através da colocação da cabeça de medição que contém o sensor de humidade, aguardou-se a estabilização da amostra com a atmosfera envolvente e registou-se a atividade de água e a temperatura.

Para determinar o nível de oxigénio em embalagens de atmosfera modificada utilizou-se o analisador de gás portátil Oxybaby®. Este equipamento possui uma agulha muito fina na ponta, que tem como função perfurar a embalagem para a leitura da

percentagem de oxigénio existente nesta. A leitura é rápida e precisa, demorando apenas 20 segundos.



**Figura 7** – Equipamentos utilizados na medição da atividade de água (HygroPalm HP23-AW-A), à esquerda, e do nível de oxigénio (Oxybaby®), à direita, nas amostras.

### 3.1.6. Análise nutricional

O conteúdo da análise nutricional do produto incluiu o teor de lípidos e ácidos gordos saturados, hidratos de carbono e açúcares, proteínas, fibra, sal e o valor energético. Os valores nutricionais declarados são valores médios estabelecidos a partir da análise do género alimentício efetuada pelo fabricante, do cálculo efetuado a partir dos valores médios conhecidos ou reais relativos aos ingredientes usados e do cálculo efetuado a partir de dados geralmente estabelecidos e aceites.<sup>103</sup> Neste caso, recorreu-se a valores reais declarados pelos fabricantes das matérias-primas.

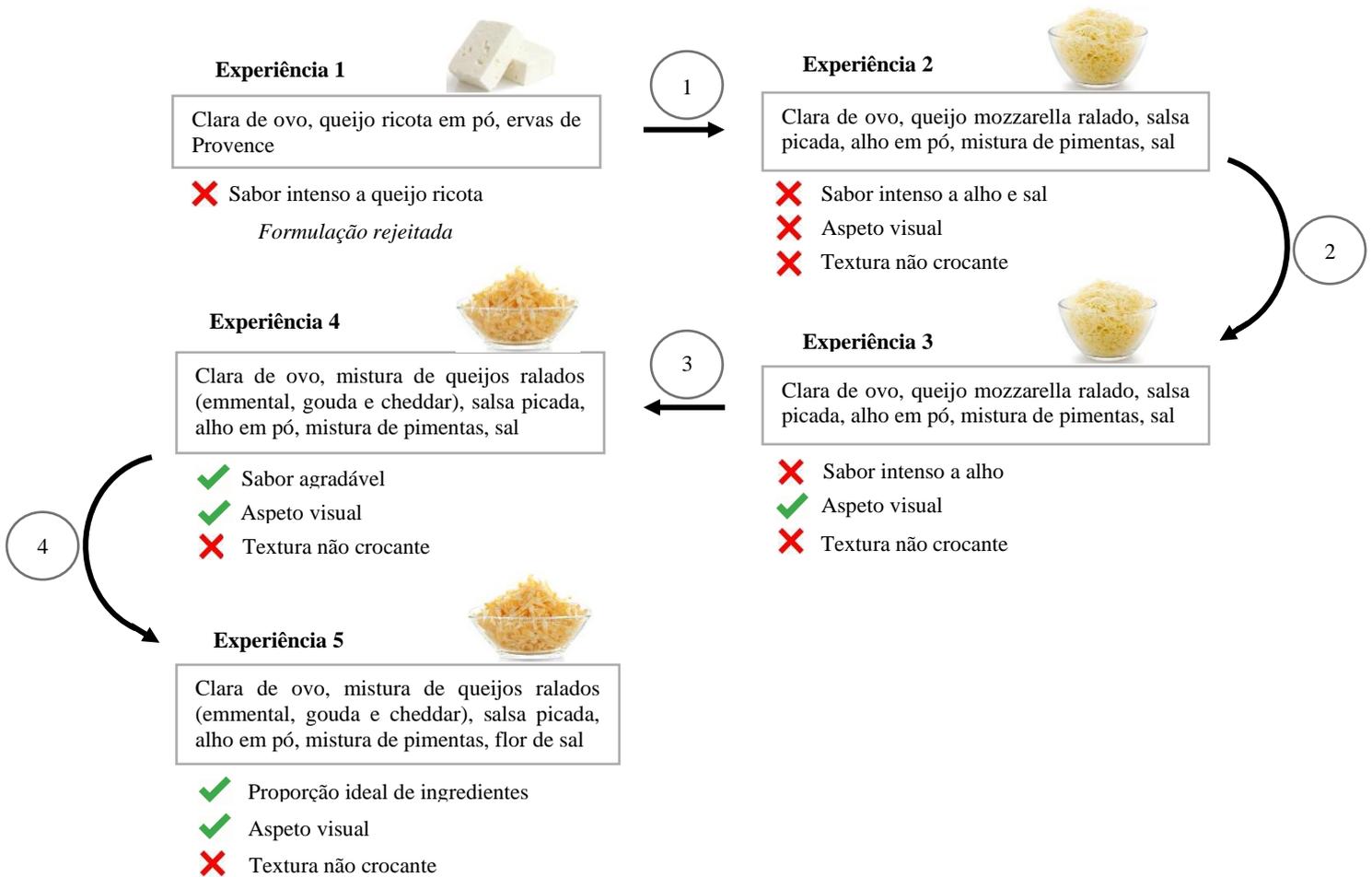
## **3.2. Resultados e discussão**

### 3.2.1. Testes preliminares

As formulações desenvolvidas tiveram em consideração uma linha condutora. Numa primeira fase, foram realizadas experiências que se focaram no sabor, cor, odor e aparência do alimento. Após se alcançar a formulação adequada referente a esses parâmetros, avançou-se para experiências em que o foco passou a ser textura, nomeadamente a crocância. Além disso, para o desenvolvimento deste produto foram realizados dois procedimentos diferentes, como descrito na **secção 3.1.2.**, em que o primeiro consistia num preparado líquido (experiências 1 a 12) e o segundo numa massa consistente e moldável (experiências 13 e 14).

O desenvolvimento dos aperitivos com clara iniciou-se pela preparação de uma receita base, **Experiência 1**, contendo apenas três ingredientes: clara de ovo, queijo ricota em pó e ervas de Provence. O motivo para a escolha do queijo ricota em pó numa primeira instância, em detrimento de outros tipos de queijo (em pó ou ralado), foi devido à

disponibilidade imediata desta matéria-prima pela empresa, visto ter sido um ingrediente utilizado no desenvolvimento do gelado de requeijão e doce de abóbora. Os aperitivos apresentavam um sabor e um odor bastante intenso a queijo ricota, não sendo perceptível o sabor às ervas de Provence, que consistem numa mistura de tomilho, alecrim, segurelha, orégãos e alfavaca e possuem um sabor apimentado. Tinham uma textura macia, característica dos bolos e biscoitos e não dos *snacks* crocantes comercializados no mercado. O sabor intenso a queijo ricota pode ser explicado pelo facto de se ter utilizado este queijo na forma desidratada, ou seja, em pó. O queijo ricota é um tipo de requeijão não amadurecido, que contém uma elevada percentagem de água na sua composição (72,1%).<sup>104,105</sup> Ao ser desidratado, o uso de uma pequena quantidade em receitas culinárias terá um efeito intenso no sabor do produto. Deste modo, testou-se uma nova formulação (**Experiência 2**).

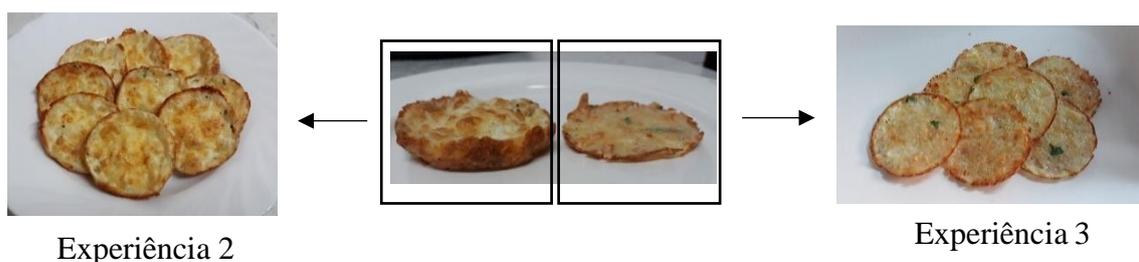


**Figura 8** – Esquematização das experiências 1 a 5 de desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara e queijo. 1 – Substituição dos ingredientes; 2 – Reajuste dos ingredientes com a diminuição do teor de alho; 3 – Alteração do queijo mozzarella por uma mistura de queijos e 4 – Otimização do sabor do aperitivo.

A **Experiência 2** foi adaptada de uma receita caseira, substituindo-se o queijo ricota em pó por queijo mozzarella ralado com baixo teor de humidade e as ervas de Provence por alho em pó, salsa picada, mistura de pimentas e sal. O queijo mozzarella com baixo teor de humidade é produzido através da acidificação da mozzarella fresca, possuindo um sabor mais salgado, um teor de humidade inferior a 52% e, portanto, um tempo de prateleira mais extenso.<sup>106,107</sup> As suas principais características são as suas propriedades físico-químicas, principalmente a capacidade de fusão e elasticidade<sup>106</sup>, importantes no desenvolvimento deste produto.

Ao nível de sabor/aroma/cor, os aperitivos eram satisfatórios, apresentando um sabor agradável comparativamente à experiência anterior. No entanto, possuíam um sabor forte a alho e sal, sendo necessário o reajuste destes ingredientes. Em relação ao aspeto visual e à textura, encontravam-se volumosos e espessos, o que, consequentemente, influenciou a crocância negativamente.

Na **Experiência 3** realizou-se um reajuste dos ingredientes utilizados na **Experiência 2**, aumentando o teor de clara de ovo líquida pasteurizada e diminuindo o teor de especiarias, nomeadamente de alho em pó e sal. Os resultados indicaram novamente um sabor intenso a alho, sendo necessário diminuir ainda mais a quantidade deste ingrediente. Os aperitivos tinham um aspeto visual mais apelativo, tendo sido encontrada a espessura ideal do *snack* (**Figura 9**). Além disso, já possuíam uma textura mais interessante, mas não totalmente crocante.



**Figura 9** – Comparação da espessura dos aperitivos com clara de ovo e queijo da experiência 2 e da experiência 3.

Testou-se uma nova formulação (**Experiência 4**) com uma composição semelhante à **Experiência 3**, mas substituindo o queijo mozzarella ralado por uma mistura de queijos ralados, que incluía os queijos emmental, gouda e cheddar, na proporção 50%, 30% e 20%, respetivamente. Com base na análise sensorial preliminar, verificou-se que os aperitivos ficaram bastante saborosos com a mistura dos três queijos.

Apresentavam um sabor mais intenso, sobrepondo-se ao sabor das especiarias, ao contrário das receitas que continham queijo mozzarella. Porém, o sabor combinado do queijo ralado e das especiarias estava equilibrado. A diferença de intensidade do sabor observada poderá ser explicada pelo queijo mozzarella ser um queijo *soft* e apresentar um período de amadurecimento de 7 a 21 dias<sup>108</sup>, enquanto o queijo gouda, cheddar e emmental possuem um tempo de cura de 2 a 3 meses, 3 a 24 meses e 4 a 24 meses, respetivamente, sendo considerados queijos semi-duros/duros<sup>107,109</sup> (**Tabela 11**). O amadurecimento envolve uma série de processos bioquímicos, que podem ser agrupados amplamente em metabolismo de lactose e ácido cítrico, proteólise e lipólise. Devido a estas reações, os queijos maduros contêm inúmeros compostos voláteis que, em concentrações adequadas e no balanço correto, são responsáveis pelo *flavour* característico de cada variedade de queijo. Normalmente, estes compostos voláteis aumentam com o tempo de amadurecimento do queijo.<sup>110</sup> Deste modo, é conveniente que o *flavour* da mistura dos três queijos ralados seja mais pronunciado. Esta foi a mistura de queijos escolhida para prosseguir nas experiências seguintes. Relativamente à textura, os *snacks* estavam crocantes, mesmo depois de arrefecidos, como o pretendido, no entanto, a crocância era perdida após algumas horas.

Nesta formulação, os aperitivos saíram mais escuros nas margens, pois foram deixados no forno durante 12 minutos, ao invés de 10 minutos. Para aferir se o escurecimento nas extremidades dos *snacks* era devido à mistura de queijos utilizada ou do tempo extra em que estiverem no forno repetiu-se a experiência novamente (**Experiência 5**).

**Tabela 11** – Valor nutricional e tempo de amadurecimento dos queijos utilizados nas formulações dos aperitivos crocantes com clara: ricota, mozzarella com baixo teor de humidade, emmental, gouda, cheddar e parmesão. (Adaptado de O'Brien & O'Connor<sup>105</sup>, Legg *et al.*<sup>108</sup>, McSweeney *et al.*<sup>107</sup> e Barbieri *et al.*<sup>109</sup>)

<b>Tipo de queijo</b>	<b>Água (g)</b>	<b>Proteína (g)</b>	<b>Lípidos (g)</b>	<b>Carboidratos (g)</b>	<b>Tempo de amadurecimento</b>
Ricota	72,1	9,4	11,0	2,0	0
Mozzarella com baixo teor de humidade	49,8	25,1	21,0	-	7-21 dias
Emmental	35,7	28,7	29,7	-	4-24 meses
Gouda	40,1	24,0	31,0	-	2-3 meses
Cheddar	36,0	25,5	34,4	0,1	3-24 meses
Parmesão	18,4	39,4	32,7	-	16-24 meses

A **Experiência 5** foi realizada para corrigir o escurecimento das margens dos *snacks*, mas também para otimizar o sabor/aroma do aperitivo. A proporção alho em pó: salsa foi alterada e o sal foi substituído por flor de sal. A técnica funcionou, tendo os aperitivos um sabor bastante agradável e de certa forma viciante. Desta forma, foi encontrada a proporção ideal de clara de ovo: queijo ralado: especiarias. Além disso, os *snacks* com clara ficaram extremamente apetitivos visualmente, concluindo-se que o problema do escurecimento das margens dos aperitivos da **Experiência 4** tinha sido devido ao tempo extra no forno (**Figura 10**). Assim sendo, é muito importante ter em atenção o tempo em que os aperitivos se encontram no forno, pelo facto de serem finos e terem tendência a escurecer nas extremidades.



Experiência 4



Experiência 5

**Figura 10** – Diferenças de aspeto visual entre os aperitivos obtidos nas experiências 4 e 5.

Todavia, não se conseguiu obter uma textura totalmente crocante. Este objetivo foi o mais difícil de atingir, pois o alimento ficava crocante após sair do forno, mas ia amolecendo com o tempo. Posto isto, as formulações seguintes focaram-se na textura do alimento, especialmente na crocância. De acordo com o estudo de mercado realizado na **secção 2.3.1.**, verifica-se a existência de um padrão de ingredientes nos *snacks* comercializados: um ingrediente base, neste caso a clara de ovo, um ou mais tipos de farinhas, especiarias, aromas, óleo e reguladores de acidez. Desta forma, na formulação seguinte (**Experiência 6**) adicionou-se uma farinha (farinha de milho integral) para atribuir maior estabilidade ao *snack* e contrariar o sucedido.

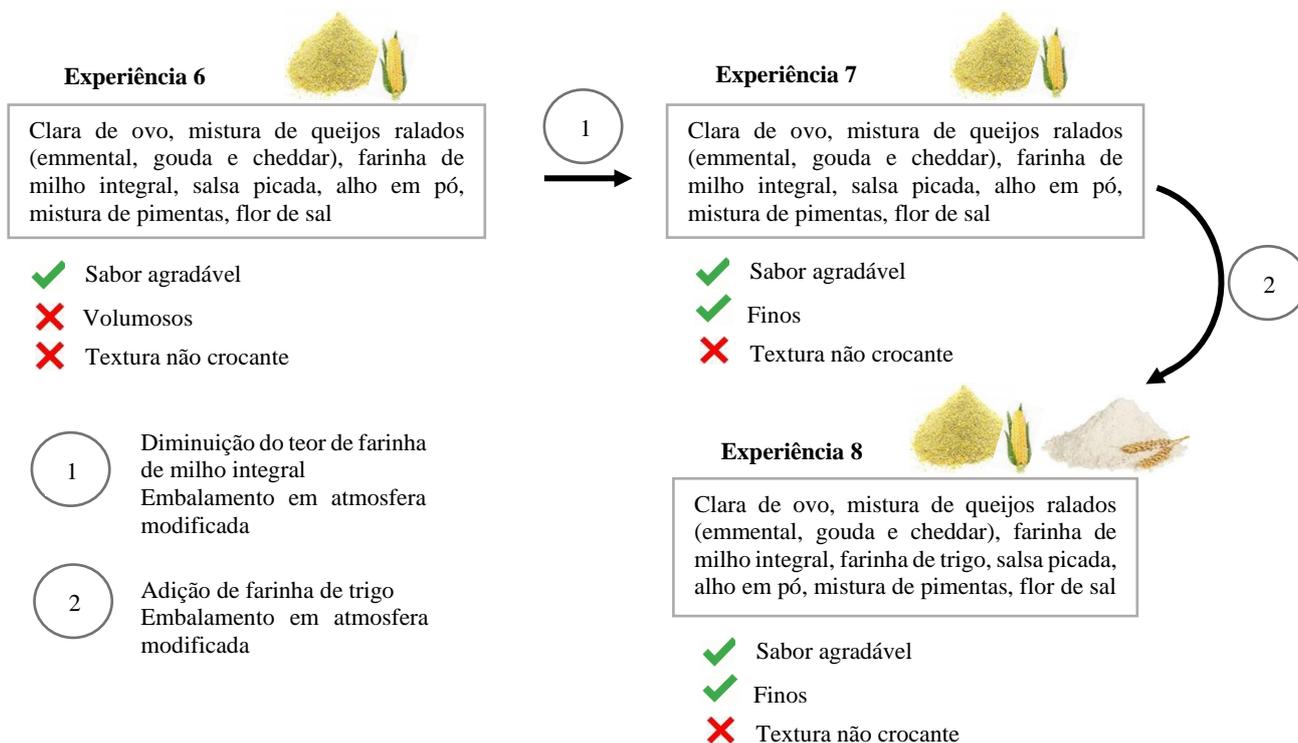
A farinha de milho integral foi selecionada tendo em conta o seu valor nutricional, as suas propriedades funcionais e organoléticas, bem como o seu baixo custo. De acordo com o *Codex Alimentarius*, a farinha integral de milho, destinada ao consumo humano, é definida como um alimento que é obtido a partir da moagem dos grãos inteiros de milho (*Zea mays L.*) totalmente maduros, saudáveis e não germinados. É considerada uma boa fonte de energia, principalmente pelo seu elevado conteúdo em hidratos de carbono (67,3%), nomeadamente o amido, seguindo-se as proteínas (7,0%), a fibra (5,7%) e os

lípidos (2,8%). A farinha de milho integral é ainda constituída por vitaminas, minerais e compostos bioativos, nomeadamente carotenoides e fitoquímicos.<sup>111-113</sup> O seu consumo regular está associado a um risco reduzido de desenvolvimento de doenças crónicas, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e obesidade.<sup>113</sup> O amido presente em elevada quantidade na farinha de milho integral é um hidrocolóide importante para controlar a humidade, viscosidade, textura, consistência e prazo de validade dos produtos alimentares. Relativamente à textura, o amido é um excelente ingrediente para ajudar no desenvolvimento de texturas crocantes em *snacks* feitos no forno, sem ser necessário recorrer à fritura.<sup>114</sup>

Com base na análise sensorial preliminar realizada aos aperitivos da **Experiência 6**, verificou-se que estes ficaram bastante crocantes após a preparação. A intensidade do sabor a queijo e especiarias diminuiu, possuindo um sabor ligeiramente adocicado devido à presença de farinha de milho. Apesar disso, continuavam com um sabor agradável. Em relação ao aspeto visual, os aperitivos ficaram mais volumosos, tendo na mesma um aspeto apreciável, mas não tão apelativo como os aperitivos da experiência anterior, que eram mais finos. Ainda em relação ao aspeto visual, numa análise mais pormenorizada, observou-se que os *snacks* apresentavam umas pequenas saliências não uniformes devido à mistura de queijos ralados ser própria para gratinar.

Os aperitivos foram embalados com película antiaderente, à temperatura ambiente, com o intuito de avaliar a crocância no dia seguinte. Foi realizado o mesmo procedimento para *snacks* vendidos no mercado, *Cheetos* e *Sunbites*. Após 24 horas, os aperitivos com clara estavam completamente amolecidos, enquanto os *Cheetos* e os *Sunbites* perderam crocância, mas numa quantidade pouca significativa.

Tendo em conta os resultados da **Experiência 6**, foi testado o embalamento em atmosfera modificada na **Experiência 7**. Adicionalmente, foi diminuída a quantidade de farinha de milho integral, de forma a averiguar a possibilidade de os aperitivos voltarem a ter uma aparência mais fina. O resultado foi o pretendido e o sabor manteve-se. No entanto, nem todos saíram totalmente crocantes, como na experiência anterior, devido à distribuição não uniforme do preparado na forma *mini-muffin*, pois é um procedimento muito preciso. Consequentemente, foram apenas embalados em atmosfera modificada (80% de N<sub>2</sub>, 20% de CO<sub>2</sub> e uma percentagem residual (< 1%) de O<sub>2</sub>) os aperitivos que se apresentavam totalmente crocantes. No dia seguinte, realizou-se uma análise sensorial, que permitiu verificar que se encontravam amolecidos.



**Figura 11** – Descritivo sumário das experiências 6 a 8 de desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara e queijo.

Com base nas observações das experiências anteriores, foi adicionada farinha de trigo na formulação da **Experiência 8**. A farinha de trigo contém glúten, contrariamente à farinha de milho, representando 85% das proteínas do trigo e é composto por gliadinas e glutelinas (proteínas de armazenamento). Essas proteínas fornecem ao glúten as suas propriedades físicas exclusivas – gliadina para viscosidade e extensibilidade e glutelina para elasticidade. O equilíbrio apropriado das duas proteínas é importante para o cozimento.<sup>115,116</sup> Além disso, a mistura de farinha de trigo com outras proteínas alimentares que possuem um *flavour* característico, como é o caso das proteínas da farinha de milho, resulta num melhor sabor do alimento.<sup>115</sup> Assim sendo, adicionou-se 50% de farinha de milho integral e 50% de farinha de trigo. Nesta experiência teve-se um cuidado redobrado na distribuição da mistura pelos compartimentos da forma *mini-muffin*, de modo a que os aperitivos saíssem totalmente crocantes e finos. O resultado foi satisfatório em termos de textura, sabor e aspeto visual. Posteriormente, mediu-se a atividade de água após preparação e os restantes foram embalados em atmosfera modificada, divididos em 3 *cuvettes*, cada uma correspondendo a um momento específico de análise sensorial preliminar: após 24 horas, uma semana e um mês a serem produzidos. Durante a análise sensorial foi medida a atividade de água e o nível de oxigénio (**Tabela 12**).

**Tabela 12** – Medição da atividade de água, temperatura e nível de oxigênio dos aperitivos crocantes com clara e queijo da **Experiência 8** após a sua preparação e 24 horas, 1 semana e 1 mês a serem produzidos, embalados em atmosfera modificada.

<b>Momento de análise</b>	<b>Atividade de água (aw)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Nível de oxigênio (%)</b>
Após preparação	0,735	19,5	
24h	0,902	20,4	0,22
1 semana	0,856	19,6	1,90
1 mês	0,831	19,2	3,98

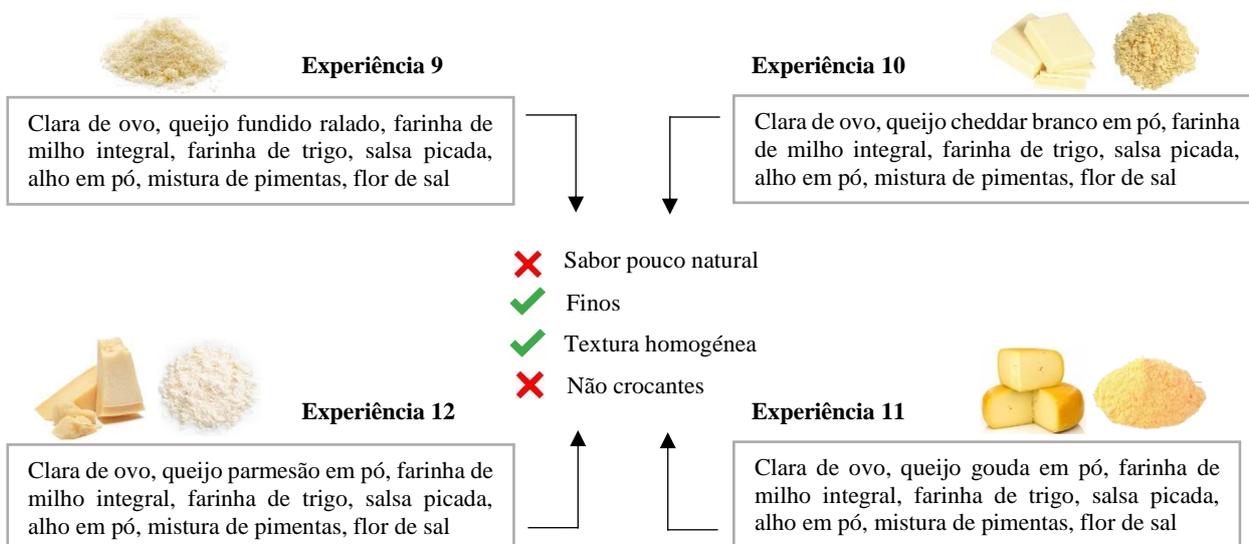
Verifica-se que, após 24 horas, a atividade de água dos aperitivos aumenta aproximadamente 1,7 décimas (de 0,735 para 0,902). Este aumento significativo de  $a_w$  poderá ser devido ao facto do alimento ser muito higroscópico após algumas horas da sua produção ou a uma selagem inadequada da embalagem, possibilitando a migração de humidade. Para se poder retirar conclusões mais objetivas dever-se-ia repetir a experiência novamente, nas condições demonstradas. Contudo, verifica-se que a atividade de água vai diminuindo gradualmente, pois ao fim de uma semana o *snack* possui  $a_w=0,856$  e ao fim de um mês  $a_w=0,831$ . Estes resultados podem ter sido devidos à retrogradação do amido. O amido é o componente maioritário da farinha de milho e da farinha de trigo. Quando o amido é aquecido na presença de água durante o processamento, neste caso a água presente na clara de ovo, o resultado é o inchamento do grânulo, a perda de cristalinidade e a absorção de água em grande parte irreversível. Em geral, o amido gelatinizado começa a mudar (retrogradado) quando o sistema é arrefecido.<sup>117</sup> A retrogradação do amido é acompanhada por uma série de alterações físicas, como a exsudação da água e aumento da cristalinidade, pelo reassociação ordenado das cadeias de amilose e amilopectina.<sup>114</sup> A água desempenha um papel crucial na retrogradação do amido durante o processamento e armazenamento do alimento. Quando o teor de água livre está acima de 20% ou abaixo de 90%, como é o caso, é observada a retrogradação do amido de milho e trigo.<sup>114,118</sup>

Relativamente à análise sensorial, os aperitivos encontravam-se saborosos ao final de 24 horas, uma semana e um mês, mas estavam amolecidos. Assim sendo, concluiu-se que o embalamento em atmosfera modificada não resultou em nenhum momento de análise, tendo-se de reformular a receita. Notou-se ainda uma ligeira diferença entre os *snacks* que só apresentavam farinha de milho integral (**Experiência 7**) e aqueles que

apresentavam farinha de milho integral e farinha de trigo. Estes últimos estavam ligeiramente mais duros e possuíam uma estrutura mais coesa.

Os níveis de oxigénio fornecem a informação da extensibilidade da degradação do alimento (microbiana, enzimática ou química), contribuindo para determinar o tempo de prateleira do mesmo. A percentagem de oxigénio é uma referência caso a análise sensorial seja reprovada, ou seja, se um produto não apresentar visualmente sinais de deterioração, mas tenha um sabor desagradável, sabe-se à partida que a embalagem não deve conter níveis de oxigénio acima do valor de referência. Neste caso concreto, os aperitivos encontravam-se com um sabor satisfatório após o tempo de análise, o que significa que o aumento do nível de oxigénio poderá ter sido devido a alguma deterioração do alimento, sem comprometer o seu sabor. No entanto, para uma melhor compreensão dos resultados seria necessário avaliar o alimento microbiológica e bioquimicamente.

Como na **Experiência 6** se notaram pequenas saliências devido à mistura de queijos ser própria para gratinar e devido aos aperitivos continuarem a perder a crocância após um período, substituiu-se o queijo ralado por queijo em pó, para ver se o aspeto ficava mais homogéneo e de forma a conseguir um aperitivo totalmente crocante, com um aumento do teor de sólidos. Realizaram-se quatro formulações (**Experiências 9 a 12**), com diferentes tipos de queijos em pó: queijo fundido ralado, queijo gouda, queijo cheddar e queijo parmesão. A quantidade dos ingredientes utilizada nas quatro experiências foi igual. No entanto, a quantidade de queijo em pó utilizada (14%) estava ligeiramente acima da normalmente usada para produtos de pastelaria, até 11%.



**Figura 12** – Esquematização das experiências 9 a 12 de desenvolvimento de aperitivos crocantes com clara e queijo, utilizando queijo em pó em vez de queijo ralado.

Com base na análise sensorial preliminar, todas as formulações apresentavam os mesmos resultados: odor e espessura agradáveis, textura homogênea e não crocante. Os aperitivos da **Experiência 9** apresentavam um sabor mais adocicado a farinha de milho integral do que propriamente a queijo. O preparado da **Experiência 10** foi o que ficou mais escuro e tinha um odor muito intenso ao queijo cheddar em pó. Os *snacks* possuíam um sabor mais intenso do que os anteriores, sendo um sabor ligeiramente “artificial” comparativamente com os aperitivos que continham queijo ralado como ingrediente. Os aperitivos da **Experiência 11**, com queijo gouda em pó, foram os que ficaram com um sabor mais equilibrado e com uma textura mais crocante. O queijo parmesão em pó (**Experiência 12**) deu um sabor totalmente diferente comparativamente aos restantes queijos em pó, sendo um sabor apimentado que combinava bastante bem com o *snack*.

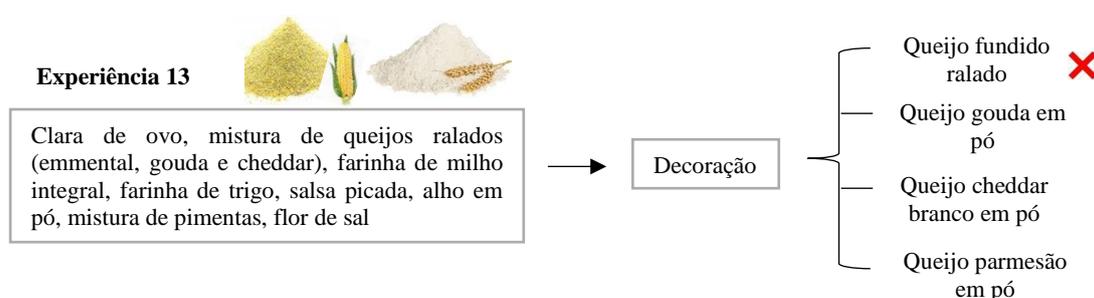
Em conclusão, a adição de queijo em pó resolveu o problema da textura não uniforme, atribuindo uma textura homogênea ao alimento, mas não deu o sabor e a crocância pretendidos. Aliás, os queijos ralados apresentaram um *flavour* mais natural e intenso comparativamente aos queijos em pó testados. De acordo com Erbay e Koca<sup>119</sup>, a melhor forma de obter um queijo em pó de qualidade com um sabor intenso a queijo é usar o queijo maduro como matéria-prima. No entanto, o elevado custo do queijo curado restringe o seu uso na fabricação de queijos em pó. Além disso, o uso de queijo natural tem um efeito prejudicial em algumas propriedades físicas, como a reconstituição de pós, devido ao seu elevado teor em gordura. Deste modo, são usados aditivos, como é o caso da maltodextrina e do soro de leite, para diminuir os custos das matérias-primas e melhorar as propriedades físicas. Posto isto, é expectável que os queijos em pó testados não apresentem um sabor e aroma tão natural e intenso como os queijos amadurecidos.

Os aperitivos das **Experiências 9 a 12** foram embalados em *cuvettes* com atmosfera modificada e analisados em termos de atividade de água, temperatura e nível de oxigénio após duas semanas da sua preparação (**Tabela 13**). Com base na análise sensorial preliminar, todos os aperitivos se encontravam com sabor e aroma satisfatórios, no entanto, amolecidos. Os aperitivos que continham queijo gouda e parmesão em pó apresentaram resultados mais estáveis relativamente à atividade de água e ao nível de oxigénio, sendo 0,753/1,74% e 0,804/1,25%, respetivamente. Além disso, foram os sabores de preferência tendo em conta os tipos de queijo em pó utilizados.

**Tabela 13** – Medição da atividade de água, da temperatura e o nível de oxigênio dos aperitivos das **Experiências 9 a 12** embalados em atmosfera modificada, após 2 semanas a sua produção.

<b>Experiência</b>	<b>Atividade de água (aw)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Nível de oxigênio (%)</b>
<b>9</b> (queijo fundido ralado)	0,875	18,3	3,11
<b>10</b> (queijo cheedar branco em pó)	0,829	19,1	2,22
<b>11</b> (queijo gouda ralado)	0,753	19,1	1,74
<b>12</b> (queijo parmesão ralado)	0,804	19,1	1,25

Devido à persistência da textura não crocante, o procedimento foi reformulado, com o intuito de aumentar as funcionalidades das propriedades do glúten e, conseqüentemente, obter uma massa moldável e consistente. Desta forma, aumentou-se a quantidade de farinha, principalmente de farinha de trigo, e diminuiu-se a quantidade de clara líquida pasteurizada. Apenas nestas condições, o glúten presente na farinha de trigo, tem a capacidade de formar uma massa viscoelástica coesa quando hidratada, de retenção de água e de propriedades termoendurecíveis.<sup>115</sup> Além disso, as interações entre o glúten e o amido desempenham um papel importante na reologia da massa. Assim sendo, foram utilizadas ambas as farinhas, pois segundo a literatura, as massas produzidas a partir de farinha de milho e farinha de trigo possuem maior extensibilidade do que massas feitas a partir somente de farinha de trigo.<sup>120</sup>



**Figura 13** – Esquematização da experiência 13 de desenvolvimento de aperitivos crocantes com clara, com os vários tipos de queijo em pó como decoração.

Na **Experiência 13** adicionou-se mais 36% de farinha em relação às experiências anteriores. Posteriormente, decoraram-se os aperitivos com os vários tipos de queijo em pó: queijo fundido ralado, queijo gouda, queijo cheddar e queijo parmesão. De acordo com a análise sensorial preliminar, os aperitivos estavam bastante crocantes e tinham um sabor semelhante a base de pizza, o que significa que se adicionou farinha de trigo a mais.

Dos diferentes queijos em pó, houve preferência pelos *snacks* que continham queijo gouda e queijo parmesão como decoração. O queijo fundido ralado não aderiu ao *snack*, por isso, essa opção foi rejeitada. Uma boa alternativa para a aderência de temperos em *snacks* preparados no forno é o uso de amido pré-gelatinizado, o que ajuda com as suas características de formação de filmes. A formação de revestimentos fornece melhor aderência e distribuição do tempero ao *snack*. Além disso, um *snack* com um bom revestimento adesivo será mais económico, com menor perdas de tempero numa linha de produção, o que é relevante em ambiente empresarial.<sup>121</sup> Esta hipótese não foi testada devido ao tempo útil em que decorreu o estágio curricular, mas é uma sugestão de uma nova formulação a ser experimentada na Fabridoce.

Os aperitivos da **Experiência 13** foram deixados abertos, à temperatura ambiente, de modo a avaliar a rigidez destes consoante o tempo. Como neste 2º procedimento houve um aumento da quantidade de farinha de trigo, existe maior a probabilidade de ocorrer a retrogradação do amido em menor tempo. Este facto foi confirmado, pois ao fim de 4 dias (**Tabela 14**) os aperitivos estavam excessivamente duros, existindo a dificuldade de os trincar.

**Tabela 14** – Detecção da rigidez dos aperitivos crocantes com clara da **Experiência 13**, deixados abertos à temperatura ambiente.

Dias após produção	Rigidez	Número de provadores	Número de provadores que detetaram a rigidez
1	Não	3	0
2	Não	3	0
4	Sim	4	4
5	Sim	4	4

Dado o queijo gouda em pó ter sido um dos preferidos em termos de sabor e dos aperitivos com este tipo de queijo apresentarem uma atividade de água inferior aos restantes, este ingrediente foi incorporado na **Experiência 14** de forma a diminuir a atividade de água e aumentar o tempo de prateleira do *snack*. Além disso, reajustou-se o teor dos ingredientes, diminuindo a quantidade de farinha e aumentando a quantidade de queijo ralado/ em pó. Posteriormente, decorou-se com queijo cheddar e parmesão em pó, tendo este último sido o escolhido pelo seu sabor apimentado. Os aperitivos estavam crocantes e com um sabor interessante.

#### Experiência 14



Clara de ovo, mistura de queijos ralados (emmental, gouda e cheddar), queijo gouda em pó, farinha de milho integral, farinha de trigo, salsa picada, alho em pó, mistura de pimentas, flor de sal



Decoração

- Queijo cheddar branco em pó
- Queijo parmesão em pó ✓

**Figura 14** - Esquemática da experiência 14 de desenvolvimento de aperitivos crocantes com clara, com o queijo cheddar e parmesão em pó como decoração, tendo este último sido o escolhido.

Os aperitivos da **Experiência 14** foram embalados em atmosfera modificada e realizou-se uma análise sensorial preliminar após 2 meses a sua produção, de modo a avaliar a sua dureza. De acordo com dados recolhidos na literatura, os mecanismos principais de deterioração que afetam os alimentos secos que incluem laticínios, como os aperitivos crocantes com clara e queijo, são a rancidez oxidativa, migração de humidade, endurecimento, leveduras e bolores<sup>99</sup> (**Tabela 15**). A rancidez oxidativa e os bolores, que são microrganismos aeróbios, são inibidos eficazmente com misturas de gases de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. A migração de humidade da embalagem é evitada usando materiais de barreira para a água. O embalamento em atmosfera modificada parece ter pouco efeito na taxa de endurecimento. Deve-se notar que as taxas de endurecimento, causado pela retrogradação do amido, são aumentadas em temperaturas de refrigeração pelo que os produtos secos são normalmente armazenados à temperatura ambiente.<sup>99</sup>

**Tabela 15** – Mistura de gases recomendada, temperatura de armazenamento, durabilidade possível e principais organismos e mecanismos de deterioração dos aperitivos crocantes com clara.

Mistura de gases recomendada (%)		Temperatura de armazenamento	Durabilidade possível (meses)		Principais organismos e mecanismos de deterioração
CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	Recomendado	Ar	EAM	Rancidez oxidativa Migração de humidade
0 a 20	80 a 100	Ambiente	2 a 4	8 a 18	Leveduras e bolores Endurecimento

Após 2 meses, os aperitivos não apresentavam rancidez oxidativa, migração de humidade, nem leveduras e bolores visíveis. Tinham um bom odor a queijo parmesão, no entanto, o embalamento em atmosfera modificada teve pouco efeito na taxa de endurecimento, como descrito na literatura. Os *snacks* encontravam-se ligeiramente rijos

e com um sabor “farinhento”, contudo, estavam muito menos endurecidos do que os *snacks* da **Experiência 13**, analisados sensorialmente poucos dias após a sua produção. Este facto poderá ser explicado pelos componentes do amido, amilopectina e amilose, terem papéis distintos na retrogradação.<sup>122</sup> A retrogradação é um processo contínuo, que inicialmente envolve uma recristalização rápida de moléculas de amilose, seguida por uma recristalização lenta de moléculas de amilopectina.<sup>114</sup> Isto é, a amilose é responsável por alterações a curto prazo, enquanto que a amilopectina é responsável por alterações reológicas e estruturais a longo prazo.<sup>117</sup> A retrogradação da amilose determina a dureza inicial dos alimentos processados. A dureza dos géis de amido retrogradados aumenta durante o estágio inicial de armazenamento a uma temperatura constante, mas depois altera ligeiramente a longo prazo.<sup>114</sup> As taxas iniciais de desenvolvimento de endurecimento são devido principalmente à farinha de milho integral do que à farinha de trigo, enquanto que o aumento a longo prazo segue a ordem inversa.<sup>117,122</sup>

### 3.3.2. Análise nutricional

Segundo o Regulamento (UE) nº 1169/2011<sup>123</sup>, a declaração nutricional obrigatória inclui o valor energético, em kJ e kcal, o teor de lípidos e ácidos gordos saturados, hidratos de carbono e açúcares, proteínas e sal. O conteúdo da declaração nutricional obrigatória referida pode ser complementada pela indicação das quantidades de um ou mais elementos, como ácidos gordos mono e poli-insaturados, polióis, amido, fibra e vitaminas ou sais minerais em quantidades significativas. Esta informação é relevante para efeitos de rotulagem.

O valor nutricional dos aperitivos crocantes com clara e queijo foi calculado utilizando valores médios (**Tabela 16**). Por valor médio, entende-se o valor que melhor representa a quantidade do nutriente contido num dado produto alimentício.<sup>123</sup> Está previsto na legislação que o cálculo do valor energético é realizado usando fatores de conversão adequados para cada macro e micronutriente. No caso dos lípidos, o valor indicado é 9 kcal/g, dos hidratos de carbono e das proteínas 4 kcal/g e da fibra 2 kcal/g.

O valor energético dos aperitivos crocantes com clara e queijo é significativamente inferior ao valor energético dos restantes *snacks* comercializados no mercado, o que poderá ser uma vantagem, no ponto de vista da aceitação do consumidor. Em comparação com os *snacks* Cheetos e Sunbites, este valor poderá ser explicado pelo facto do aperitivo conter clara de ovo, que, por sua vez, possui um valor energético relativamente baixo, aproximadamente 52 kcal por 100 g de alimento. Em relação ao

*snack* Lesser Evil, que também é constituído por clara de ovo, a única explicação prende-se no conteúdo lipídico. O teor de lípidos é a porção que contribui em maior quantidade para o aporte calórico, visto que cada 1g de lípido equivale a 9kcal, mais que o dobro dos restantes nutrientes. Os *snacks* Lesser Evil possuem um conteúdo lípido significativamente superior (17,9 g/ 100 g) que os aperitivos crocantes desenvolvidos (10,7 g/ 100 g).

**Tabela 16** – Declaração nutricional (por 100 g de alimento) dos aperitivos crocantes com clara e queijo parmesão (**Experiência 14**) e dos *snacks* das marcas Cheetos, Sunbites e Lesser Evil, comercializados no mercado. Entre parêntesis está apresentado o ingrediente base que constitui cada produto.

	<b>Experiência (clara de ovo)</b>	<b>Cheetos (sêmola de milho)</b>	<b>Sunbites (cereais)</b>	<b>Lesser Evil (clara de ovo)</b>
Valor energético	1130	2025	2011	1943
Energia (kJ/kcal)	270	484	480	464
Lípidos (g):	10,7	24,3	21,6	17,9
- dos quais saturados	7,2	3,3	2,2	1,79
Hidratos de carbono (g)	25,6	59,4	60,7	50
- dos quais açúcares	0,5	4,9	7,3	< 0,5
Proteínas (g)	17,4	5,6	7,5	21,4
Fibra (g)	1,2	2,7	6,6	3,6
Sal (g)	0,74	2,10	0,90	0,90
Alegação nutricional	Rico em proteína	-*	Rico em fibra	Fonte de proteína

\*” -“ → não possui alegações nutricionais.

O teor de hidratos de carbono foi significativamente inferior aos valores dos *snacks* apresentados, sendo ligeiramente menos de metade destes. Os únicos ingredientes utilizados no desenvolvimento dos aperitivos, que contêm elevada quantidade de hidratos de carbono na sua composição são as farinhas, farinha de trigo e farinha de milho integral, sendo que estão presentes no alimento numa percentagem inferior a 50%. Já os Cheetos e os Sunbites são constituídos por 75% de sêmola de milho e 58% de cereais, respetivamente, sendo estes ingredientes os responsáveis maioritários pelo teor total de carboidratos destes *snacks*. No que diz respeito aos aperitivos Lesser Evil, é utilizada apenas uma farinha, farinha de mandioca, no entanto, também é utilizado amido de tapioca (**Tabela 7**), elevando assim o conteúdo de hidratos de carbono no alimento. Apenas 0,5 g correspondem a açúcares, à semelhança do que acontece com o *snack* da

Lesser Evil. Devido a este valor reduzido de açúcares, o produto poderá conter a alegação nutricional “baixo teor de açúcares”, que de acordo com o Regulamento (CE) nº 1924/2006<sup>85</sup>, significa que esta alegação só pode ser feita quando o produto não contiver mais de 5 g de açúcares por 100 g. Contudo, sendo os aperitivos crocantes de clara um *snack* salgado, esta alegação nutricional não se enquadra na tipologia do produto e pode suscitar dúvidas no consumidor.

O conteúdo em proteína está de acordo com o esperado, uma vez que a clara de ovo é constituída por 90% de proteínas, em peso seco. Para obter a alegação nutricional “rico em proteína” é necessário que, pelo menos, 20% do valor energético do alimento seja fornecido por proteína. A formulação contém 17,4 g de proteína em 100 g de produto, correspondendo a 25,8% do valor energético, podendo então conter a alegação nutricional “rico em proteína”. O outro *snack* que também contém clara de ovo como ingrediente base possui 21,4 g de proteína, no entanto, apresenta um valor energético bastante mais elevado (464 kcal), atribuindo-se apenas a alegação nutricional “fonte de proteína”. O valor energético proveniente de proteína desse produto é 18,4%, não atingindo os 20%, mas estando acima dos 12%, valor mínimo necessário para que um alimento seja considerado como “fonte de proteína”.

O teor de fibra (1,2 g) foi significativamente inferior aos *snacks* de mercado, no entanto, um valor expectável, tendo em conta a quantidade de farinha de milho integral utilizada na formulação comparativamente à de farinha de trigo. A farinha de milho integral foi o único ingrediente utilizado que contém um elevado teor de fibra (5,7 g/ 100 g), possuindo a alegação nutricional “fonte de fibra”. A farinha de trigo é constituída apenas por 2,7 g de fibra, não contendo nenhuma alegação nutricional. Para ter a alegação de “fonte de fibra”, o alimento tem de conter, no mínimo, 3 g de fibra por 100 g ou 1,5 g por 100 kcal. Enquanto, que para a alegação “rico em fibra”, é necessário a presença de 6 g de fibra por 100 g de produto ou 3 g por 100 kcal. Dado estas designações, o único *snack* que possui uma alegação nutricional relacionada com fibra são os Sunbites, pois são compostos maioritariamente por cereais, alguns deles integrais, contribuindo para um teor de fibra de 6,6 g. Uma sugestão para a continuação do desenvolvimento deste tipo de produto na empresa seria substituir parte da farinha de trigo por fibra de trigo, de modo a que o *snack* contenha alegações nutricionais referentes à proteína e à fibra. No entanto, a maioria dos consumidores não aprecia os *snacks* ricos em fibra que existem atualmente no mercado, pois a fibra interfere com o sabor e a textura do alimento, não atendendo às

expectativas do consumidor.<sup>121</sup> Por essa razão, tem de existir uma quantidade equilibrada de fibra em relação ao restantes ingredientes.

É de realçar que no rótulo alimentar deve ainda constar as substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias. Neste caso particular, a clara de ovo, como referido na **secção 1.2.3.**, e a farinha de trigo que provém de um cereal que contém glúten.

### 3.3.3. Análise crítica do desenvolvimento do produto

Os aperitivos com clara de ovo revelaram ser um produto promissor ao longo das várias fases de desenvolvimento, conseguindo-se a textura crocante pretendida nas experiências finais e atributos sensoriais bastante apelativos. O produto final obtido poderá conter a alegação nutricional “rico em proteína” na rotulagem. Além disso, concluiu-se que o produto apresenta bastantes aspetos positivos que o podem distinguir no nicho de mercado em que se enquadra. Contudo, existe um grande problema, pois ocorre a retrogradação do amido poucos dias após a sua produção. A retrogradação do amido é frequentemente considerada como tendo efeitos indesejáveis, contribuindo para a redução do prazo de validade e aceitação do consumidor.<sup>114</sup> Atualmente, já existem soluções para a retardação ou inibição da retrogradação do amido, sendo um desafio para a indústria alimentícia.

Existem formas de se manipular a organização do amido, de forma a que o tempo de retrogradação do amido seja alterado, diminuindo a taxa de formação de *snacks* com uma textura demasiado dura. Uma delas é o uso de determinados lípidos ou derivados de lípidos, nomeadamente emulsionantes e derivados de ácidos gordos que são anfifílicos. O emulsionante mais utilizado é a lecitina, um fosfolípido. É fácil de haver complexação de ácidos gordos ou derivados (mono- e diacilgliceróis) nas cadeias helicoidais de amido, principalmente durante a etapa de arrefecimento do *snack*, dificultando a interação entre cadeias de amido. Isto porque, os emulsionantes adicionados interagem com o amido de forma semelhante aos ácidos gordos presentes endogenamente na farinha.<sup>114</sup>

Outra solução é a adição de amido resistente, recentemente introduzido no mercado. O amido resistente é adequado nas formulações de *snacks*, pois o amido resistente pode permitir que os *snacks* exibam uma alegação nutricional de "fonte de fibra" ou "rico em fibra" altamente comercializável, sem comprometer a qualidade. Ao contrário das fontes tradicionais de fibra alimentar que podem conferir um sabor forte e característico à fibra, o amido resistente desenvolvido comercialmente possui baixa capacidade de retenção de água e sabor agradável.<sup>121</sup> O amido resistente não é digerido

ou absorvido no intestino delgado, sendo considerado um prebiótico e desempenhando um papel importante na fisiologia digestiva.<sup>114,121</sup>

Outro defeito existente nos aperitivos crocantes com clara de ovo é a dificuldade de aderência dos queijos em pó a estes, após saírem do forno. Além disso, a cor da cobertura poderia ser melhorada com a adição de especiarias, pois o queijo parmesão em pó é branco, atribuindo um aspeto menos apelativo. Para melhorar a aderência de temperos ou aromas aos *snacks* poder-se-ia recorrer à utilização de revestimentos à base de amido. Os revestimentos à base de amido foram introduzidos no mercado com o intuito de substituir a gordura/óleo. O produto é comercializado na forma de pó, sendo solúvel em água. O revestimento à base de amido é usado em solução e pulverizado em *snacks* para aderir aos temperos, secando rapidamente. A solução é fácil de pulverizar devido às suas características de baixa viscosidade, e uma vantagem deste revestimento é que ele pode ser aplicado frio ou quente.<sup>121</sup>



## 4. Desenvolvimento dos pastéis com clara, espinafres e pimentos

### 4.1. Materiais e Métodos

#### 4.1.1. Ingredientes

Para o desenvolvimento dos aperitivos crocantes com clara usaram-se como matérias-primas os seguintes ingredientes: clara de ovo líquida pasteurizada, queijos ralados (mozzarella, cheddar, gouda e emmental), espinafres crus, mistura de pimentos (verde, laranja e vermelho) crus, tomate, manteiga, amido de milho modificado, farinha de milho integral, flor de sal com ervas aromáticas (alecrim, tomilho, orégãos e manjerona) e mistura de pimentas.

#### 4.1.2. Produção

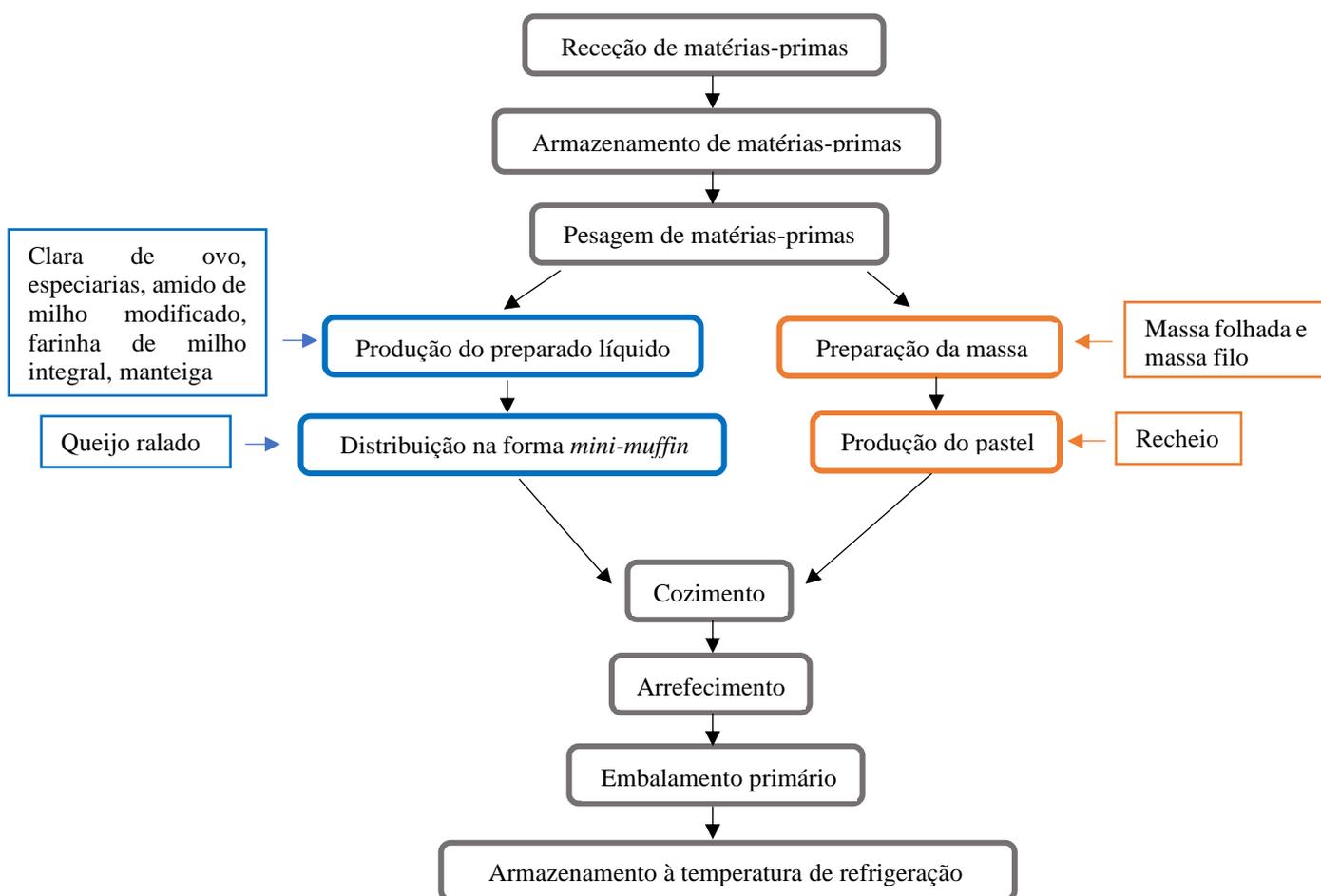
Para a produção dos pastéis com clara, espinafres e pimentos recorreu-se a duas etapas. A primeira etapa referente apenas ao desenvolvimento do recheio com o intuito de alcançar os critérios sensoriais com satisfação, e uma última etapa referente à produção do pastel na totalidade.

##### 4.1.2.1. Recheio

As experiências foram realizadas em pequenas escala (< 1 kg), tendo sido os ingredientes pesados numa balança analítica de precisão de 0,5 g. Primeiramente, untou-se a forma *mini-muffin* com spray antiaderente, adicionando-se, de seguida, tomate, espinafres e pimentos crus em cada compartimento da forma. À parte, numa taça de inox, misturou-se a clara de ovo líquida pasteurizada, o amido de milho modificado, a farinha de milho integral, a manteiga derretida, a flor de sal com condimentos e a mistura de pimentas, até formar uma espuma com pequenas bolhas de ar (**fase 2 – Figura 3**). Na fase final do processo, distribuiu-se a mistura por cada compartimento da forma, sem encher completamente, e adicionou-se uma porção da mistura de queijos ralados no topo. O preparado foi ao forno em banho-maria, a 190°C durante 35 minutos. Após esse tempo, retirou-se a forma do forno e deixaram-se arrefecer os recheios. Os recheios foram armazenados à temperatura de refrigeração, 0 a 4°C, em embalagens de atmosfera modificada (80% de N<sub>2</sub>, 20% de CO<sub>2</sub> e uma percentagem residual (< 1%) de O<sub>2</sub>).

#### 4.1.2.2. Pastel de espinafres e pimentos

Para a preparação do pastel de espinafres e pimentos foram utilizadas duas massas diferentes, a massa folhada e a massa filo. O procedimento da massa filo requeriu uma etapa prévia, devido a ser uma massa muito fina e quebradiça. As folhas de massa filo foram pinceladas separadamente com manteiga derretida, e, posteriormente, sobrepostas até se obter 3 camadas. De seguida, pincelou-se uma forma *mini-muffin* com manteiga derretida e colocou-se as 3 camadas de massa filo e a massa folhada em cada compartimento da forma, cortadas à medida. Introduziu-se os recheios em cada compartimento e levou-se ao forno a 200°C durante 18 e 28 minutos para a massa filo fechada e massa folhada, respetivamente. Por fim, retiraram-se os pastéis do forno, deixou-se arrefecer cerca de 10 minutos e foram removidos com auxílio de uma espátula. Os pastéis foram armazenados à temperatura de refrigeração, em embalagens de atmosfera modificada, como referido anteriormente.



**Figura 15** – Fluxograma de produção dos pastéis com clara, espinafres e pimentos. A sombreado azul e laranja está representado as etapas do recheio e do pastel, respetivamente. A sombreado cinzento está representado as etapas comuns de ambos os procedimentos.

#### 4.1.3. Análise sensorial preliminar

Os pastéis com clara, espinafres e pimentos produzidos e armazenados à temperatura de refrigeração foram provados de forma informal de modo a aferir o potencial das várias formulações em questão. O produto foi avaliado em vários critérios sensoriais, como aparência, odor, textura, sabor e cor, tendo sido retiradas conclusões imediatas sobre esses parâmetros. A formulação foi rejeitada ou alterada caso o produto não apresentasse propriedades sensoriais satisfatórias.

#### 4.1.4. Determinação do tempo de prateleira

O produto foi analisado através da medição da atividade de água, da temperatura, do nível de oxigénio na embalagem com atmosfera modificada, de avaliação sensorial e visual, como o surgimento de bolores e de embalagens opadas. No caso dos recheios, estas análises foram realizadas após a sua preparação e após 24 horas, 1 semana, 1 mês e 3 meses de embalados em atmosfera modificada. Relativamente aos pastéis, as análises foram realizadas após produção do pastel e após 2 meses de embalados em atmosfera modificada, para ter uma estimativa da sua durabilidade.

#### 4.1.5. Medição da atividade de água e do nível de oxigénio

Para a determinação da atividade de água, as amostras foram colocadas nas células de análise, sendo posteriormente inseridas na câmara de medição do aparelho HygroPalm HP23-AW-A (**Figura 7**). Aguardou-se a estabilização da amostra com a atmosfera envolvente e registou-se a atividade de água e a temperatura.

Para a determinação do nível de oxigénio em embalagens de atmosfera modificada, as embalagens foram perfuradas com a agulha do analisador de gás portátil Oxybaby®. Após 20 segundos obteve-se a percentagem de oxigénio existente nestas.

#### 4.1.6. Análise nutricional

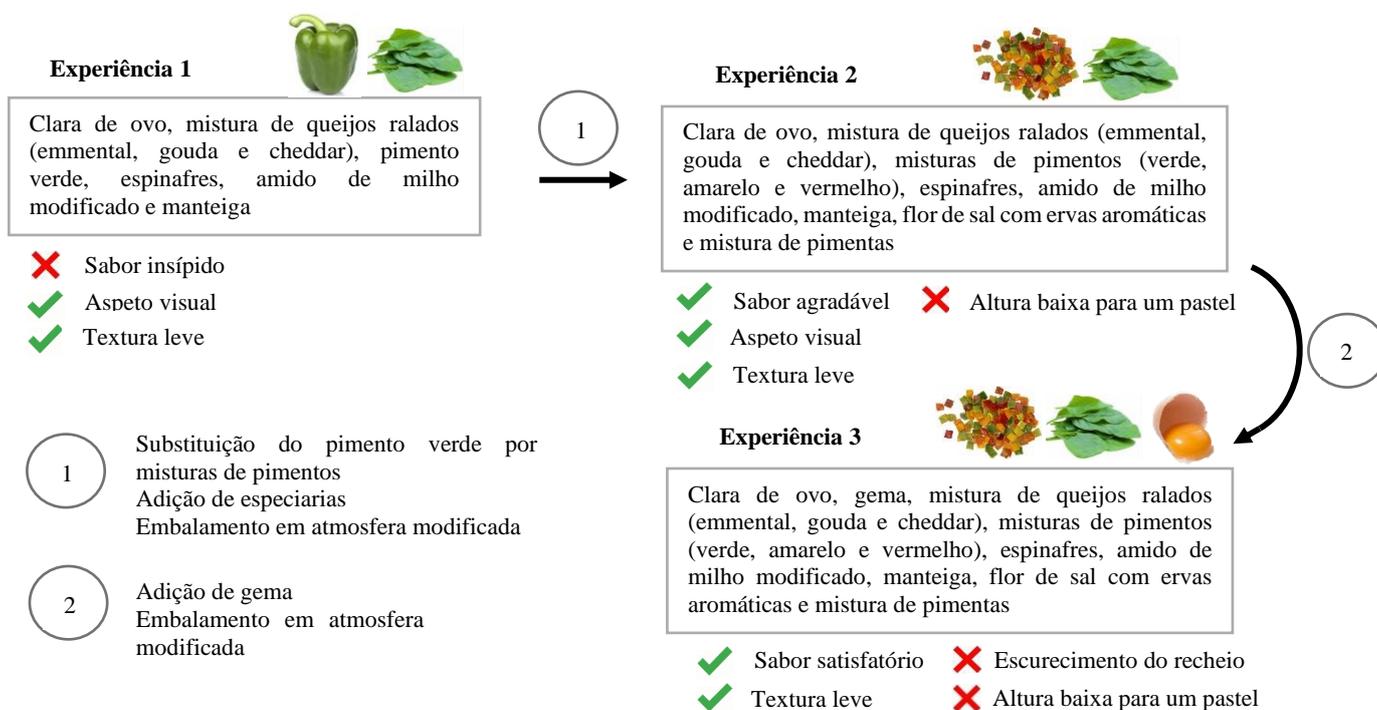
Foi calculado o valor nutricional a partir dos valores reais declarados pelos fabricantes das matérias-primas, assim como foram determinadas as suas alegações nutricionais. Com base no Regulamento (CE) n° 1924/2006<sup>85</sup>, a alegação nutricional designa qualquer alegação que declare ou implique que um alimento possui propriedades nutricionais benéficas particulares.

## 4.2. Resultados e discussão

### 4.2.1. Testes preliminares

Os ingredientes deste produto foram selecionados tendo em conta um estudo de mercado e um levantamento da informação contida na literatura. A manteiga teve como função emulsionar o preparado de clara de ovo, queijo ralado, espinafres e pimento, e dar sabor. O amido de milho modificado foi usado para controlar as características estéticas e organoléticas do alimento<sup>121</sup>, nomeadamente o teor de humidade do produto final. Os amidos nativos são frequentemente limitados nas suas aplicações alimentares, devido à sensibilidade ao calor e baixa viscosidade. Surgiram assim os amido modificados, que superam os amidos não modificados na indústria de alimentos processados, devido à sua robustez e capacidade de suportar condições severas de processamento.<sup>124</sup> Amidos quimicamente ou fisicamente modificados são frequentemente mais resistentes à retrogradação e são mais estáveis em temperaturas elevadas.<sup>125</sup>

A **Experiência 1** apresentou resultados satisfatórios no que diz respeito à textura e aspeto visual, tendo uma textura leve devido à quantidade de clara de ovo usada. Relativamente ao sabor, os recheios estavam insípidos e não se notava o sabor do pimento verde. Assim sendo, na formulação seguinte utilizou-se uma mistura de pimentos para contrastar com o sabor do espinafre e adicionou-se especiarias para dar sabor ao recheio.



**Figura 16** – Descritivo sumário das experiências 1 a 3 de desenvolvimento dos pastéis com clara.

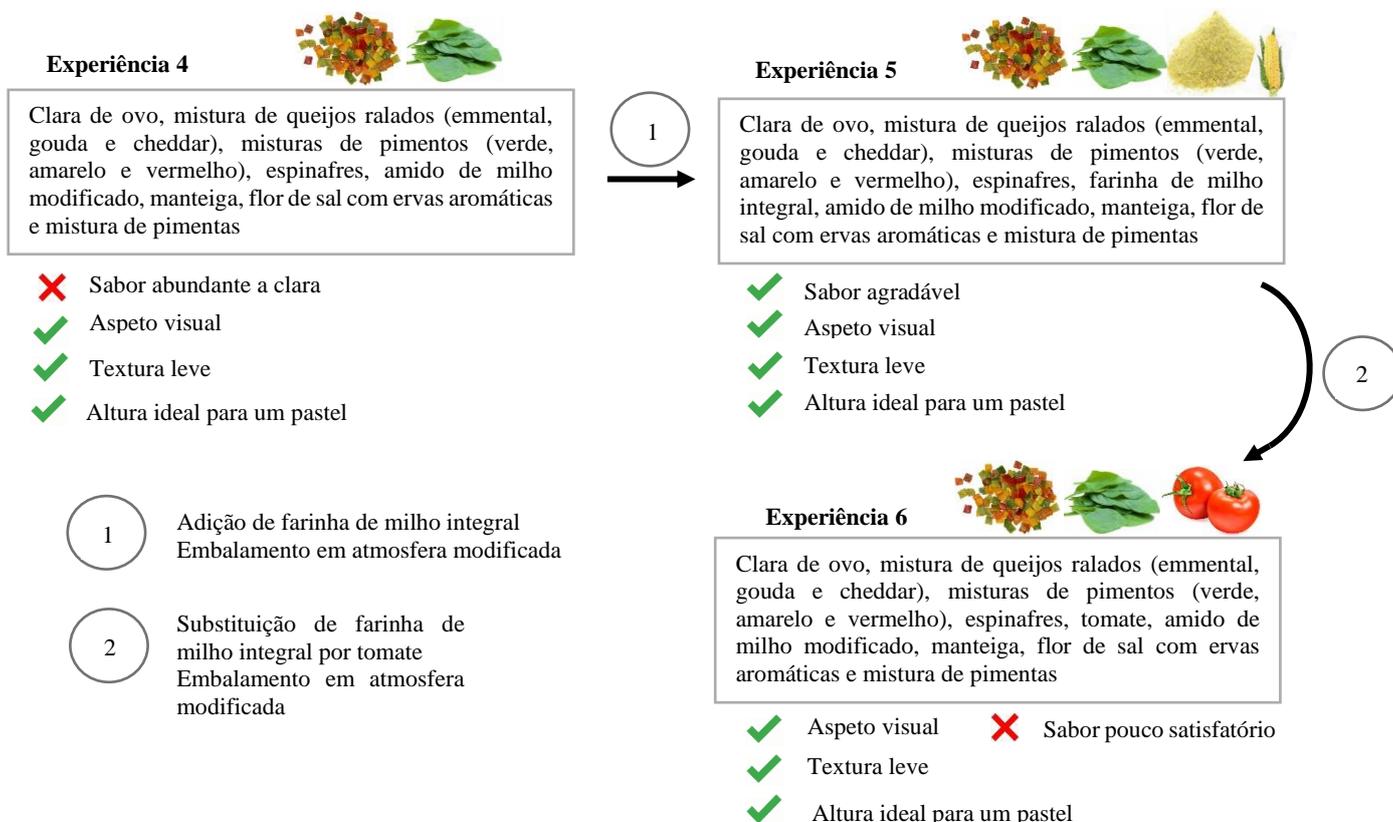
As **Experiências 2 e 3** foram realizadas em simultâneo. Acrescentou-se flor de sal com ervas aromáticas e misturas de pimentas como especiarias e uma mistura de pimentos verdes, vermelhos e amarelos. A **Experiência 3** diferiu da **Experiência 2** apenas pelo facto de conter gema. A gema foi adicionada com o intuito de dar cor ao recheio e devido ser um ingrediente que possui propriedades emulsionantes.

Segundo a análise sensorial, o resultado foi satisfatório, ficando um trave a pimento no final, que foi bastante apreciável. Esta diferença de sabor ocorrida entre a **Experiência 1**, em que se utilizou apenas pimento verde, e as restantes experiências, em que foi usada uma mistura de pimentos, pode ser explicado pelos vários estágios de maturação do pimento (*Capsicum annuum*). O *flavour* dos vegetais, em geral, é influenciado pela composição de compostos voláteis e não voláteis. Durante o amadurecimento do pimento verde para vermelho a doçura, a acidez e o aroma aumentam significativamente. O pH diminui devido à composição de ácidos orgânicos, com o aumento do conteúdo de ácido ascórbico e ácido cítrico. A doçura aumenta e está relacionada com o aumento de glucose e frutose. Estas diferenças na composição de ácidos orgânicos e de açúcares influenciam o sabor de um alimento.<sup>126</sup> Estes recheios possuíam ainda uma textura leve, típica da clara de ovo. Relativamente ao aspeto visual não se notava quais os recheio que continham gema e quais possuíam apenas clara, pois ambos apresentavam o tom amarelado do queijo ralado. Os recheios ficaram relativamente baixos para o tamanho de um pastel. Assim sendo, na fase seguinte (**Experiência 4**) foi usada uma maior quantidade de clara de ovo, de modo a preencher os compartimentos da forma *mini-muffin* praticamente na totalidade.

A refrigeração apurou ainda mais o sabor do recheio, nomeadamente dos pimentos. Após 24 horas no frio, o recheio que continha gema ficou com um tom mais escuro, de cor castanho-acinzentado, uma desvantagem do ponto de vista estético. Por essa razão, a formulação da **Experiência 3** foi rejeitada e foi selecionada a formulação que continha apenas clara de ovo.

As **Experiências 4, 5 e 6** também foram realizadas simultaneamente. A **Experiência 4** continha maior quantidade de clara, as **Experiências 5 e 6** continham um novo ingrediente, farinha de milho integral e tomate, respetivamente. Estas experiências foram ao forno sem banho-maria, contrariamente ao que diz no procedimento, para ver se o modo de preparação do recheio teria influência no seu volume durante o cozimento no forno. Durante a cozedura, o preparado aumentou bastante de volume e após os

recheios terem sido retirados do forno baixaram logo de volume, no entanto, conseguiu-se atingir o tamanho e o volume adequado de um pastel.

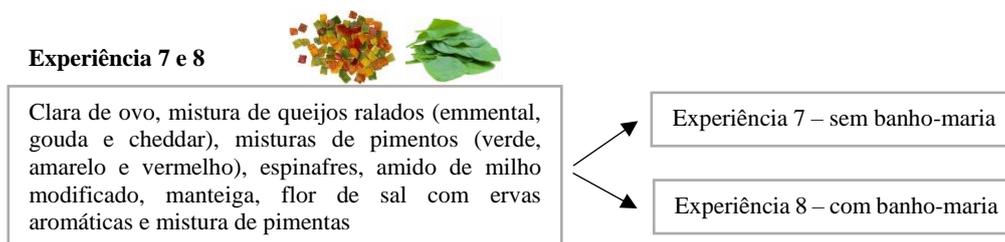


**Figura 17** – Descritivo sumário das experiências 4 a 6 de desenvolvimento dos pastéis com clara.

Na **Experiência 4** aumentou-se a quantidade de clara e diminuiu-se a quantidade de pimentos, espinafres, manteiga e mistura de pimentas. O recheio estava saboroso, com uma textura muito leve. Os recheios da **Experiência 5**, que continham farinha de milho integral, foram os que tiveram um sabor mais satisfatório, ligeiramente adocicado. Além disso, a farinha de milho aumenta a estabilidade do alimento relativamente à atividade de água e à carga microbiana, aumentando o prazo de validade do produto. Os recheios da **Experiência 6** apresentaram melhor aspeto visual pelo contraste de cores dos pimentos, espinafres, tomate e queijo ralado. Em termos de sabor, o tomate retirava o trave a pimento, bastante apreciado nas experiências anteriores. Deste modo, esta formulação foi rejeitada. Todos os recheios tinham um sabor pronunciado a clara comparativamente com as experiências anteriores. Assim sendo, nas experiências seguintes reajustou-se a quantidade de ingredientes (**Experiências 7 e 8**).

Nas **Experiências 7 e 8** fez-se um reajuste de todos os ingredientes tendo em conta a quantidade de clara que era necessária para preencher os compartimentos da forma *mini-*

*muffin*, de forma a atingir um volume característico de um pastel. A diferença entre as experiências foi o procedimento, sendo que o preparado da **Experiência 7** foi ao forno sem banho-maria e o da **Experiência 8** em banho-maria.



**Figura 18** – Esquemática das experiências 7 e 8 de desenvolvimento dos pastéis com clara. O preparado da experiência 7 foi ao forno sem banho-maria, enquanto que o da experiência 8 foi em banho-maria.

Na **Experiência 7**, sem banho-maria, o preparado começou a levantar fervura após 8 minutos de estar no forno. Ao fim de 20 minutos tirou-se do forno e desceram logo de altura. Ficaram com sabor satisfatório e com bom aspeto, mas não homogêneo. Relativamente à **Experiência 8**, a forma foi colocada numa assadeira com aproximadamente 1,5 L de água quente para ir ao forno em banho-maria. Ao fim de 16 minutos cresceram ligeiramente. Foram retirados do forno após 35 minutos, mais 15 minutos que a experiência anterior. Tinham todos uma altura semelhante e um aspeto uniforme. Assim sendo, concluiu-se que a quantidade de clara de ovo tinha de ser aumentada para perfazer o volume ideal de um pastel, no entanto, o mais relevante para esse efeito era o procedimento, com ou sem banho-maria (**Figura 19**). O preparado que ia ao forno em banho-maria não levantava fervura e ficava mais baixo relativamente ao tamanho ideal de um pastel. Possuía a vantagem de ter um aspeto mais homogêneo. No caso do preparado que foi ao forno sem banho-maria, levantou fervura e aumentou de tamanho. No entanto, como desvantagem, não ficou de todo homogêneo. A vantagem é que atingiu o volume ideal para posteriormente cobrir com massa folhada/ massa filo. Caso o objetivo fosse desenvolver pastéis na forma aberta, como o pastel de nata, a melhor técnica a utilizar seria em banho-maria, pois daria uma perceção completamente diferente do produto ao consumidor, como se pode verificar pela **Figura 19**, em que se nota bastante diferença entre os recheios que foram ou não ao forno em banho-maria. Neste caso particular, devido à preferência por um pastel totalmente coberto com massa, a técnica escolhida foi a sem banho-maria.



Sem banho-maria



Com banho-maria

**Figura 19** – Recheios com clara, espinafres e pimentos cozidos no forno sem banho-maria (Experiência 7) e com banho-maria (Experiência 8).

As **Experiências 9 e 10** foram uma réplica da **Experiência 8**, em que foi feito o reajuste dos ingredientes de acordo com as características necessárias para atingir o volume adequado de um pastel. Estas experiências foram realizadas em maior quantidade para, posteriormente, se proceder à cobertura dos recheios com massa folhada e massa filo. Ambas foram cozidas no forno sem banho-maria devido ao objetivo do produto final ser um pastel totalmente coberto com massa, não sendo relevante o aspeto visual do topo do recheio. Na **Experiência 10** adicionou-se novamente a farinha de milho integral, visto que a experiência que apresentou melhor consistência foi a que continha farinha.

#### Experiência 9



Clara de ovo, mistura de queijos ralados (emmental, gouda e cheddar), misturas de pimentos (verde, amarelo e vermelho), espinafres, amido de milho modificado, manteiga, flor de sal com ervas aromáticas e mistura de pimentas



Sem banho-maria

#### Experiência 10



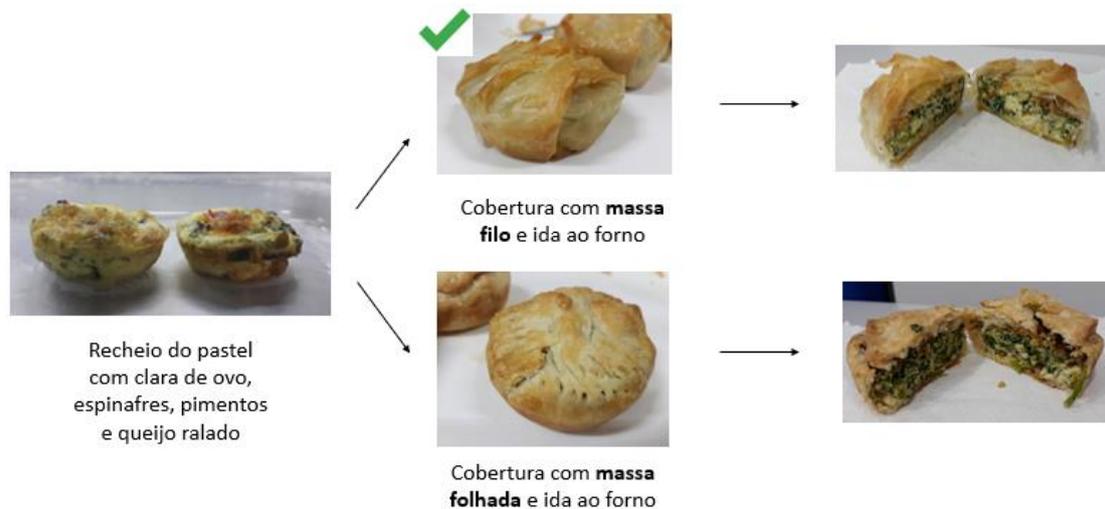
Clara de ovo, mistura de queijos ralados (emmental, gouda e cheddar), misturas de pimentos (verde, amarelo e vermelho), espinafres, farinha de milho integral, amido de milho modificado, manteiga, flor de sal com ervas aromáticas e mistura de pimentas



Sem banho-maria

**Figura 20** – Esquematização do das experiências 9 e 10 de desenvolvimento dos pastéis com clara.

A massa filo atribuiu um aspeto muito elegante, “*gourmet*” e brilhante ao pastel, diferenciando-o dos demais existentes em pastelarias e noutros nichos de mercado. Os pastéis com massa folhada também ficaram com aspeto satisfatório, no entanto, baços, sem qualquer brilho. Em relação ao sabor, com a massa filo sentia-se mais o sabor do recheio, tornando o pastel mais leve, enquanto que com a massa folhada o pastel tornou-se ligeiramente “massudo”. No entanto, ambos estavam saborosos e com odor bastante agradável (**Figura 21**). Dada a preferência pelo pastel com massa filo, esta foi a massa selecionada para continuação de futuras experiências.



**Figura 21** – Cobertura dos recheios com clara, espinafres e pimentos com massa folhada e filo e demonstração do seu aspeto visual após preparação.

Os recheios e os pastéis foram embalados em atmosfera modificada após a sua preparação e procedeu-se à medição da atividade de água, da temperatura e do nível de oxigénio ao longo do tempo de armazenamento (**Tabela 17**), bem como à avaliação sensorial. Estas análises foram realizadas após preparação do produto e após 24 horas, 1 semana, 1 mês e 3 meses para os recheios, e após a sua preparação e 2 meses no caso dos pastéis, com o intuito de obter uma estimativa da sua durabilidade. De realçar, que os traços nas medições da atividade da água e temperatura de certas experiências significam que os mesmos não foram realizados, pois a nível sensorial essas amostras já se encontravam deterioradas, mesmo não sendo perceptível a nível visual. Foi o caso das amostras de todas as experiências analisadas após 2 e 3 meses e da amostra da **Experiência 7** avaliada após 1 mês a sua preparação. A amostra desta experiência continha uma percentagem de oxigénio de 5,5, podendo-se concluir que a partir desta percentagem as amostras começam a ficar degradadas sensorialmente, provavelmente devido a reações enzimáticas e químicas. No entanto, seria necessário complementar a análise sensorial com análises microbiológicas e bioquímicas para obter melhores conclusões sobre o resultado.

De uma forma geral, a atividade de água dos recheios foi diminuindo gradualmente durante o armazenamento em embalagem com atmosfera modificada e o nível de oxigénio foi aumentando ligeiramente até 1 mês da sua produção. Após 3 meses, o nível de oxigénio decaiu significativamente para níveis residuais.

**Tabela 17** –Valores de atividade de água, temperatura e nível de oxigênio medidos após preparação dos recheios e após 24 horas, 1 semana, 1 mês e 3 meses de embalados em atmosfera modificada e armazenados à temperatura de refrigeração. Atm. Modificada – Atmosfera modificada; Temp. ambiente – Temperatura ambiente; BM – Banho-maria; FMI – Farinha de milho integral; MFi – Massa filo

<b>Experiência</b>	<b>Método de conservação</b>	<b>Momento de análise</b>	<b>Atividade de água (aw)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Nível de oxigênio (%)</b>
2 (clara)	Temp. ambiente	Após preparação	0,935	19,2	
	Atm. Modificada e Refrigeração	24h	0,869	18,4	
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 semana	0,867	18,7	0,09
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 mês	0,854	17,6	2,00
	Atm. Modificada e Refrigeração	3 meses	_____	_____	0,08
4 (mais clara)	Atm. Modificada e Refrigeração	1 semana	0,851	19,9	1,53
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 mês	0,850	18,2	2,60
	Atm. Modificada e Refrigeração	3 meses	_____	_____	0,16
5 (farinha de milho integral)	Temp. ambiente	Após preparação	0,918	19,5	
	Atm. Modificada e Refrigeração	24h	0,857	18,3	
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 semana	0,856	20,5	1,41
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 mês	0,853	18,5	2,00
	Atm. Modificada e Refrigeração	3 meses	_____	_____	0,40
6 (tomate)	Atm. Modificada e Refrigeração	1 semana	0,828	20,1	0,65
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 mês	0,866	18,6	3,0
	Atm. Modificada e Refrigeração	3 meses	_____	_____	0,19
7 (sem BM)	Atm. Modificada e Refrigeração	1 semana	0,870	20,8	0,69
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 mês	_____	_____	5,5
8 (com BM)	Atm. Modificada e Refrigeração	1 semana	0,855	21,1	0,45
	Atm. Modificada e Refrigeração	1 mês	0,867	18,6	2,1
	Atm. Modificada e Refrigeração	3 meses	_____	_____	0,06
Pastel clara e MFi	Temp. ambiente	Após preparação	0,886	19,2	
	Atm. Modificada e Refrigeração	2 meses	_____	_____	1,39
Pastel FMI e MFi	Temp. ambiente	Após preparação	0,874	18,8	
	Atm. Modificada e Refrigeração	2 meses	_____	_____	0,26

A diminuição da atividade de água poderá ser explicada pela exsudação de água do alimento observada nas embalagens, embora mínima, visto que é um produto que contém uma elevada quantidade de clara de ovo (67%), e, conseqüentemente, de água. A deterioração aeróbia poderá ocorrer devido ao oxigénio residual no espaço livre. O ligeiro aumento do conteúdo de oxigénio pode ser devido a: permeabilidade do material de embalagem ao oxigénio, pequenos vazamentos devido a uma selagem inadequada, ar incluído nos alimentos, evacuação inadequada e/ou entrada de gás<sup>99</sup> e reações enzimáticas e químicas no alimento que envolvam oxigénio.<sup>127</sup>

Os pastéis com clara encontram-se na categoria de produtos combinados, que são produtos formados por dois ou mais componentes alimentares diferentes.<sup>99</sup> Devido às vastas diferenças das propriedades intrínsecas desses produtos e das interações entre os vários componentes no mesmo alimento, os mecanismos principais de deterioração que podem afetar os produtos combinados são o crescimento de microrganismos e a rancidez oxidativa (**Tabela 18**). A migração de humidade entre os diversos componentes de certos produtos combinados também é um mecanismo de deterioração que não é afetado pelo embalamento em atmosfera modificada.<sup>99</sup> Posto isto, o decréscimo acentuado do nível de oxigénio ao fim de 3 meses poderá estar relacionado com o aumento do teor de dióxido de carbono na embalagem, ou seja, pelo crescimento de organismos produtores de gás, nomeadamente de dióxido de carbono. Esta hipótese poderá ser apoiada pelo facto das embalagens terem sido encontradas opadas, evidenciando a atividade de bactérias produtoras de gás, nomeadamente da família *Enterobacteriaceae*, as quais se desenvolvem consideravelmente em produtos derivados de lacticínios.<sup>128</sup>

**Tabela 18** – Mistura de gases recomendada para embalar os pastéis com clara, temperatura de armazenamento adequada, durabilidade do pastel com clara ao ar e em embalagem com atmosfera modificada e principais organismos e mecanismos de deterioração presentes neste tipo de produto.

Mistura de gases recomendada (%)		Temperatura de armazenamento (°C)		Durabilidade possível (dias)		Principais organismos e mecanismos de deterioração
CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	Máximo legal	Recomendado	Ar	EAM	Espécies de <i>Pseudomonas</i> <i>Enterobacteriaceae</i> Bolores
30 a 50	50 a 70	8	0 a 4	2 a 7	3 a 21	

Relativamente aos pastéis, os que continham farinha de milho integral apresentavam um valor de atividade de água ligeiramente inferior comparativamente aos

que possuíam apenas clara de ovo. O mesmo aconteceu para recheios da **Experiência 4**, que continham farinha de milho integral (0,918), e da **Experiência 2**, que possuíam somente clara de ovo (0,935). Contudo, ao longo do tempo de armazenamento o valor da atividade de água igualou-se, pelo que será expectável que o mesmo ocorra para os pastéis. O nível de oxigénio após 2 meses a sua produção foi de 0,26% e 1,39%, respetivamente. Ambos apresentavam bolores na superfície da massa e a embalagem ligeiramente opada, não se encontrando, portanto, em boas condições para consumo humano.

Devido ao elevado teor de humidade e baixa concentração de sal, este produto será suscetível à deterioração microbiana e, conseqüentemente, terá um prazo de validade limitado. Assim sendo, recomenda-se um tempo de prateleira de 3 a 21 dias em embalagem com atmosfera modificada para esta tipologia de alimento (**Tabela 18**).

#### 4.2.2. Análise nutricional

Dada a preferência pelo sabor do recheio que continha farinha de milho integral, foi calculado o valor nutricional do recheio da **Experiência 10**. Em comparação com doces típicos portugueses e com um produto semelhante no mercado (**Tabela 19**), os recheios desenvolvidos continham metade e  $\frac{1}{4}$  do valor energético do pastel de nata e da queijada, respetivamente, e apresentavam um valor energético semelhante (99 kcal) ao *muffin* de espinafres com clara de ovo da Garden Lites (123 kcal). Esta grande diferença no valor energético de doces típicos portugueses e de *muffins* com clara de ovo poderá ser explicado através dos ingredientes utilizados na sua produção. Os ingredientes principais para o desenvolvimento dos doces referidos são o açúcar, a farinha e a gema, sendo que a gema apresenta um valor energético de 322 kcal por 100 g de alimento, enquanto que o ingrediente maioritário na produção dos *muffins* é a clara de ovo, que possui um valor energético relativamente baixo, 52 kcal por 100 g de alimento.

O teor de lípidos foi significativamente inferior aos restantes produtos, mesmo em relação ao *muffin* de espinafres com clara de ovo comercializado no mercado. A gema de ovo é constituída maioritariamente por lípidos (27%)<sup>2</sup>, sendo expectável o elevado teor lipídico do pastel de nata e da queijada. Relativamente ao *muffin* com clara de ovo, para além do uso de queijo, que também foi um ingrediente utilizado no desenvolvimento dos recheios desenvolvidos na empresa, é usado leite e óleo de colza, o que faz aumentar o conteúdo lipídico do produto final.

**Tabela 19** - Declaração nutricional (por 100g de alimento) do recheio com clara, espinafres e pimentos da **Experiência 10**, do pastel de nata, da queijada (doces típicos portuguesas) e do *muffin* de espinafres com clara da marca *Garden Lites*, comercializado no mercado.

	<b>Recheio de espinafres e pimentos com clara</b>	<b>Pastel de nata</b>	<b>Queijada</b>	<b>Muffin de espinafres com clara (Garden Lites)</b>
Valor energético	414	912	1570	515
Energia (kJ/kcal)	99	218	375	123
Lípidos (g):	4,2	7,3	14,8	7,0
- dos quais saturados	2,7	3,9	9,9	1,8
Hidratos de carbono (g)	5,9	33,6	54,1	8,8
- dos quais açúcares	0,6	19,6	30,0	1,8
Proteínas (g)	9,3	4,5	8,5	8,8
Fibra (g)	0,6	0,5	1,9	1,8
Sal (g)	0,26	0,13	0,35	0,35
Alegação nutricional	Rico em proteína Sem açúcares adicionados	-*	-*	Rico em proteína

\*" -" → não possui alegações nutricionais.

O conteúdo de hidratos de carbono também foi significativamente inferior aos restantes produtos. Este resultado está de acordo com o esperado, visto que em todos os produtos comercializados é adicionada sacarose e ainda farinha no pastel de nata e na queijada. Os ingredientes utilizados no desenvolvimento dos recheios que contribuem significativamente para esta parcela nutricional são a farinha de milho integral e o amido de milho modificado.

O teor de proteína (9,3 g) foi superior ao pastel de nata (4,5 g), à queijada (8,5 g) e ao *muffin* com clara de ovo (8,8 g). Este facto aliciado ao valor energético poderá ser uma vantagem na aceitação do produto no mercado. Este resultado era expectável, uma vez que, para além de lípidos, a gema é constituída por 16% de proteína<sup>2</sup>, assemelhando-se assim o teor proteico da queijada com o dos produtos que contêm clara de ovo. De realçar que a quantidade de gema utilizada no desenvolvimento do produto influencia o valor nutricional e, portanto, o pastel de nata contém menor teor de proteína.

O teor de fibra (0,6 g) foi relativamente baixo, no entanto, um valor expectável, dada a quantidade de farinha de milho integral utilizada no desenvolvimento do produto (4,1%). Para além da farinha, os pimentos e os espinafres também possuem alguma quantidade de fibra, contribuindo para este valor.

O Regulamento (CE) n.º 1924/2006<sup>85</sup> é relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, estabelecendo critérios universais sobre os potenciais benefícios do alimento. Tendo em conta a análise nutricional, seria possível aplicar as seguintes alegações nutricionais na rotulagem: “rico em proteína”, dado que, pelo menos, 20% do valor energético é proveniente de proteína, mais precisamente 37,5%, e “sem adição de açúcares”, pois contém açúcares naturalmente presentes – clara de ovo. Apesar da clara de ovo conter apenas 0,8% a 1,0% de carboidratos<sup>8</sup>, estes podem-se encontrar na forma livre, sendo a glucose o monossacarídeo mais abundante.<sup>9</sup> Este ingrediente é utilizado em elevada quantidade (67%) no desenvolvimento do produto, e, por isso, torna-se preponderante no valor nutricional do mesmo. Neste tipo de produto já é aceitável aplicar alegações nutricionais relacionadas com o teor de açúcar, uma vez que os pastéis poderão ser doces ou salgados, dependendo dos ingredientes selecionados. Não foi possível calcular o valor nutricional do pastel com massa filo/massa folhada, contudo, tendo em conta a constituição destas massas (essencialmente margarina e farinha de trigo), as alegações nutricionais do produto final não iriam ser alteradas devido à elevada quantidade de clara de ovo presente, no entanto, o teor de lípidos e de hidratos de carbono total iria ser mais elevado.

O *muffin* com clara de ovo da Garden Lites possui a alegação nutricional “Rico em proteína”, sendo que 28,6% do valor energético é fornecido por proteína. Não apresenta a alegação nutricional “Sem adição de açúcares”, dado que a sacarose constitui um dos seus ingredientes. Os doces típicos portugueses, como é o caso do pastel de nata e da queijada não possuem quaisquer alegações nutricionais, como era previsível, visto que contêm um elevado teor de açúcares e lípidos, nomeadamente lípidos saturados.

Desta forma, pode-se concluir que utilizando uma quantidade significativa de clara de ovo (>50%) no desenvolvimento de pastéis/*muffins*, o alimento será pouco calórico e fornecerá uma elevada quantidade de proteínas necessárias ao desenvolvimento do organismo humano, contendo possivelmente a alegação nutricional “fonte de proteína” ou “rico em proteína”.

#### 4.2.3. Análise crítica do desenvolvimento do produto

Os pastéis com clara de ovo, espinafres e pimentos demonstraram ser um produto com atributos sensoriais e nutricionais favoráveis, podendo ser dado o desenvolvimento da formulação como concluído. Contudo, existe o problema do alimento possuir um prazo de validade relativamente curto (3 a 21 dias), o que é um aspeto negativo na aceitação do

consumidor e do ponto de vista da comercialização do produto. Deste modo, sugere-se a ideia da ultracongelção do pastel. Nos últimos anos, têm sido preparados alimentos congelados pré-cozinhados que contêm ovoprodutos, devido a serem produtos de conveniência e possuírem um maior tempo de prateleira.<sup>129</sup> A congelação aumenta irreversivelmente a viscosidade do ovo líquido e da gema, mas não afeta a viscosidade da clara de ovo.<sup>130</sup> No entanto, a congelação da clara de ovo pode modificar a estrutura das proteínas presentes nesta, levando a que a clara de ovo possua uma textura “esponjosa”, o que é um obstáculo para o desenvolvimento de novos produtos congelados contendo este ingrediente.<sup>129</sup> Atualmente no mercado, existem poucos produtos ultracongelados que contêm clara de ovo como ingrediente principal, sendo uma vantagem para abranger um novo nicho de mercado. O objetivo seria desenvolver um produto que contivesse igualmente massa na parte exterior e a mistura de clara de ovo, espinafres e pimentos por dentro, podendo ser consumidos como sobremesa, lanche ou pequeno-almoço. A ideia seria criar uma receita pré-cozinhada e ultracongelada, embalando em *packs* para o consumidor retirar apenas a quantidade que pretende e que estivesse pronta a consumir após alguns minutos no forno ou no microondas. Além disso, devido à potencialidade deste produto, poderão ser formulados novos sabores de pastéis mais tipicamente portugueses, como de castanha e amêndoa, batata doce e limão, maçã e canela e abóbora e requeijão.



## 5. Novas formulações de barras de sementes com clara

### 5.1. Materiais e Métodos

#### 5.1.1. Ingredientes

Para o desenvolvimento das barras de sementes com clara utilizaram-se as seguintes matérias-primas: clara de ovo líquida pasteurizada, mel, sacarose, farinha de coco, sorbato de potássio, pectina, isolado de soja (proteína >90%), óleo de girassol, lecitina de soja, sementes de cânhamo, sementes de abóbora, sementes de chia, sementes de girassol e sementes de quinoa branca.

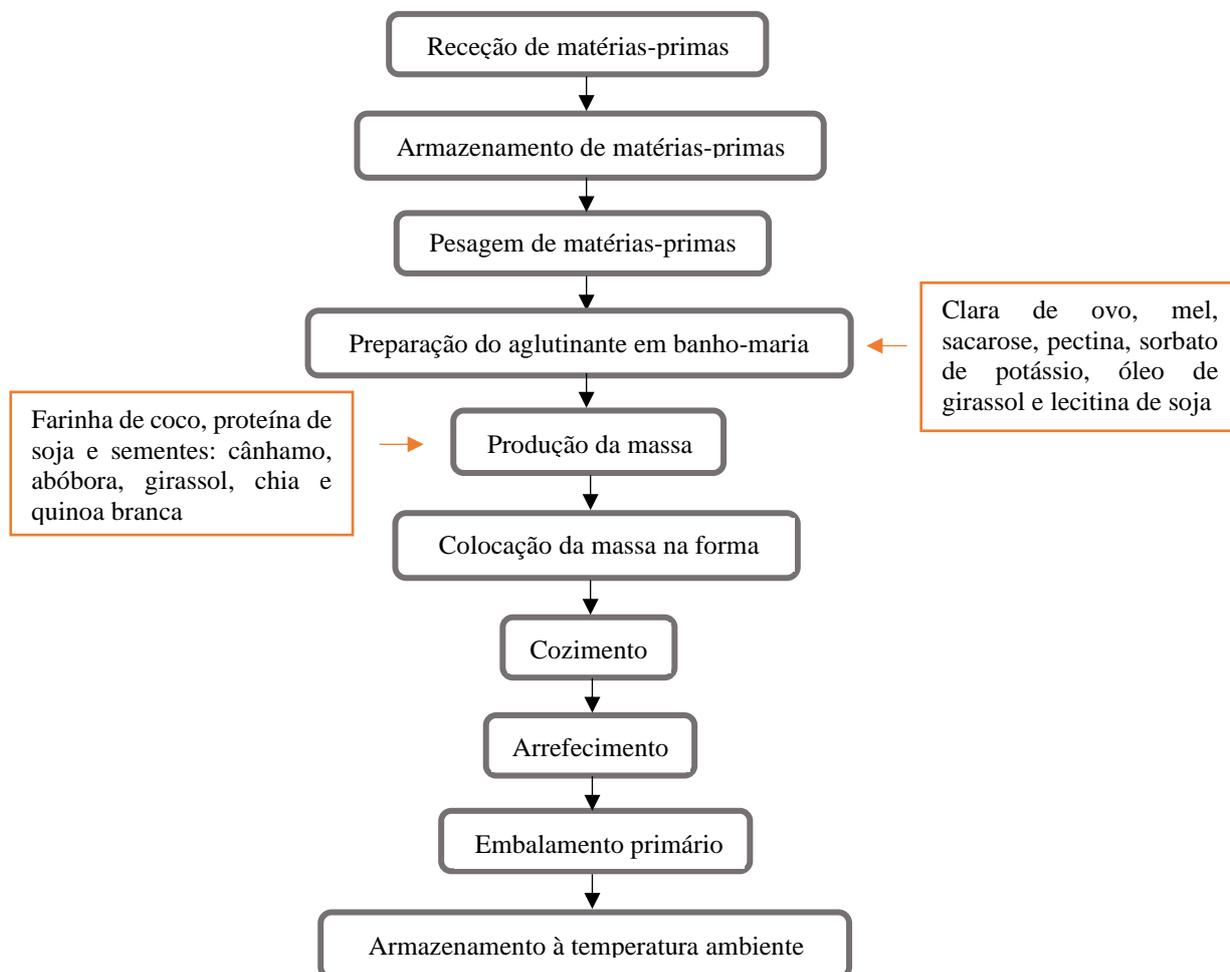
#### 5.1.2. Produção

As experiências foram realizadas em pequena escala (<1 kg), sendo que a pesagem dos ingredientes foi realizada com uma balança digital de precisão de 1 g. Misturou-se a clara, o mel, a sacarose, a pectina, o sorbato de potássio, o óleo de girassol e a lecitina de soja em banho-maria, mexendo frequentemente até que a mistura ficasse bem dissolvida. Posteriormente, bateu-se o preparado com uma batedeira de escala doméstica até se obter uma espuma densa, também conhecida como “claras em castelo” (**fase 3 – Figura 3**). A clara de ovo líquida pasteurizada foi retirada do frio e colocada à temperatura ambiente previamente, para que a formação de espuma começasse rapidamente e fosse atingido um volume maior. De seguida, adicionou-se a farinha de coco/proteína de soja e bateu-se a mistura com a batedeira novamente. Acrescentaram-se as sementes manualmente e envolveu-se com uma espátula. O preparado foi colocado numa forma de silicone, pressionando-o à medida que se ia enchendo, e deixou-se repousar durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Por fim, levou-se ao forno, previamente aquecido a 170°C, durante 12 minutos. Retirou-se a forma do forno e deixou-se arrefecer ligeiramente antes de desenformar. As barras foram armazenadas à temperatura ambiente, dentro de um saco de congelação selado com um *zip*, após arrefecerem completamente.

#### 5.1.3. Análise sensorial preliminar

As barras de sementes com clara foram provados após produção de forma informal de modo a avaliar a viabilidade da formulação. O produto foi avaliado sensorialmente,

em termos de aparência, odor, textura, sabor e cor, tendo sido retiradas conclusões sobre esses parâmetros, nomeadamente da secura e quebra das barras.



**Figura 22** – Fluxograma de produção das barras de sementes com clara. A sombreado cinzento está representado as etapas do procedimento e a sombreado laranja está representado os ingredientes que são adicionados numa dada etapa do processo.

#### 5.1.4. Determinação do tempo de prateleira

Nesta primeira fase procedeu-se a apenas a uma análise visual do aparecimento de bolores, após as barras terem sido seladas em sacos de congelação contendo um *zip* e armazenadas à temperatura ambiente. Esta análise preliminar teve como objetivo compreender a viabilidade de cada formulação em termos de durabilidade.

#### 5.1.5. Análise nutricional

Os valores nutricionais declarados foram calculados a partir dos valores reais declarados pelos fabricantes das matérias-primas.

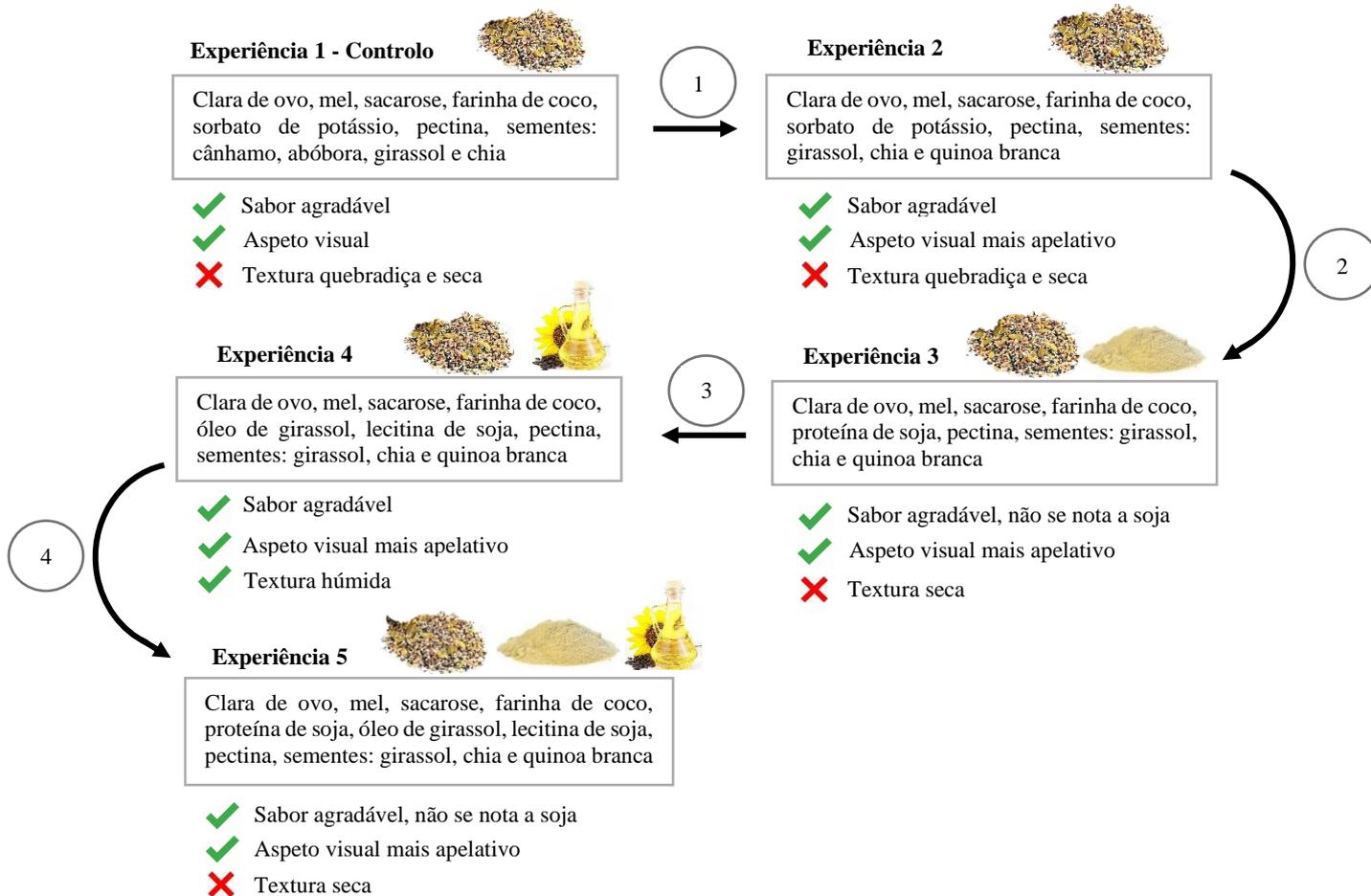
## 5.2. Resultados e discussão

### 5.2.1. Testes preliminares

Foi recriada a experiência realizada anteriormente na empresa Fabridoce (**Experiência 1 – Controle**), que continha clara de ovo, mel, sacarose, farinha de coco, sorbato de potássio, pectina e as sementes: cânhamo, abóbora, girassol e chia. O mel e a sacarose atuam como agentes adoçantes e aglutinantes, interligando todos os ingredientes, e também contribuem como fonte primária de hidratos de carbono. A farinha de coco e a clara de ovo são a fonte de proteína, sendo que a clara de ovo também atua como aglutinante, deixando as barras mais nítidas.<sup>131</sup> As sementes de cânhamo, abóbora, girassol e chia são consideradas ingredientes secos e são também fonte de hidratos de carbono, principalmente de fibra alimentar. O sorbato de potássio é um aditivo (E202) que retarda e inibe o crescimento de microrganismos. De acordo com o Regulamento (UE) nº 1129/2011<sup>132</sup>, este aditivo possui um teor máximo de dosagem para produtos de padaria fina com atividade de água superior a 0,65, só podendo ser utilizado 2 g deste aditivo em 1kg de alimento. A pectina é um polissacarídeo que forma pontes de hidrogénio com a água, e, portanto tende a diminuir a atividade de água do produto e, consequentemente, retardar o crescimento de microrganismos.<sup>133</sup>

Com base na análise sensorial preliminar, a barra possuía um sabor agradável a coco, no entanto, estava ligeiramente doce e bastante seca, tornando-se um alimento “pesado” para consumir na totalidade. As barras desta experiência tinham um peso médio de 58 g, o que é um valor significativamente elevado tendo em conta o estudo de mercado realizado na **secção 2.3.3.**, em que o peso de barras de cereais é aproximadamente 42,5 g. Isto é, as barras da **Experiência 1 – controle** continham mais 36,5% do peso de uma barra de cereais comercializada no mercado. Outro defeito da barra foi o facto da mesma começar a ficar quebradiça após arrefecimento. Com o intuito de tornar a barra mais “leve” de consumir e também por questões económicas, decidiu-se reduzir as variedades de sementes utilizadas, passando de 4 sementes para 3 sementes. De forma a não alterar significativamente o valor nutricional da formulação anterior foram selecionadas as seguintes matérias-primas para constituir a formulação seguinte (**Experiência 2**): sementes de girassol (rica em fibra – 8,6 g/100 g alimento -, fonte de proteína (14,2%) e com elevado teor de lípidos poliinsaturados), sementes de chia (rica em fibra – 41 g/100 g alimento -, fonte de proteína (18,5%) e com elevado teor de lípidos poliinsaturados) e quinoa branca (com elevado teor de hidratos de carbono (62,0 g/100 g alimento) e pouca

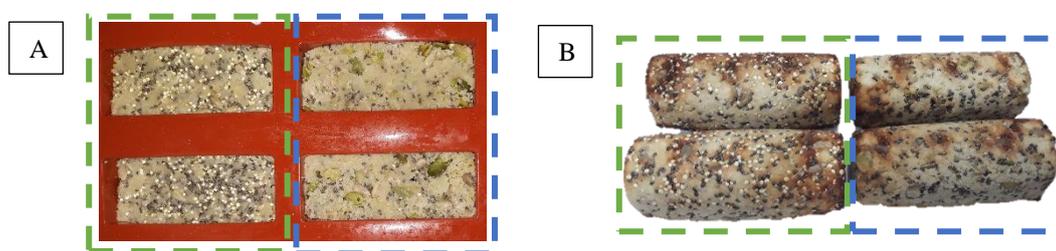
quantidade de açúcar (4,6 g/100 g alimento), rica em fibra (6,0 g/100 g alimento) e fonte de proteína (14,2%). Ana Garcia *et al.*<sup>88</sup> sugere que a quinoa é um ingrediente funcional interessante para o desenvolvimento de novas barras de cereais como uma alternativa aos produtos comerciais convencionais, com propriedades físicas e sensoriais desejáveis.



**Figura 23** – Esquematisação da experiência controlo e das experiências 1 a 4 das barras de sementes com clara. 1 – Substituição das sementes de abóbora e cânhamo por quinoa branca; 2 – Substituição do sorbato de potássio por proteína de soja; 3 – Substituição da proteína de soja por óleo de girassol e lecitina de soja e 4 – Adição de proteína de soja novamente.

As barras de sementes da **Experiência 2** apresentavam um aspeto visual mais apelativo do que a **Experiência 1 – Controlo**, devido ao contraste do pseudocereal quinoa branca com as sementes de girassol e de chia, que têm uma tonalidade mais escura (**Figura 24**). Possuíam um sabor agradável e bastante semelhante à experiência anterior e tinham a doçura adequada para esta tipologia de produto. Além disso, as barras desta experiência ficaram ligeiramente mais crocantes, provavelmente devido à conjugação das sementes de chia e da quinoa. As sementes de chia e a quinoa são naturalmente duras,

sendo normalmente cozinhadas antes do seu consumo. Quando cozidas no forno, por um período curto, ficaram crocantes, contrariamente às sementes de girassol e as sementes de abóbora. Contudo, as barras estavam igualmente secas e quebradiças como na experiência anterior.



**Figura 24** – Barras de sementes da **Experiência 1 – Controle** (sombreadas a azul) e da **Experiência 2** (sombreadas a verde) antes (A) e após o cozimento (B). É notável o contraste da quinoa com as restantes sementes.

Com o intuito de obter uma estimativa inicial do tempo de validade das formulações testadas, procedeu-se à observação visual do crescimento de bolores nas barras de sementes, armazenadas em sacos de congelação contendo um *zip*. As amostras foram acompanhadas diariamente até ao dia em que se verificou o aparecimento de bolores (**Tabela 20**). No caso da **Experiências 1 – Controle** e da **Experiência 2**, os bolores apareceram após 6 dias de conservação, indicando que a alteração do tipo de sementes de uma experiência para a outra não teve impacto no tempo de prateleira do produto. Comparando os resultados da **Experiência 1 – Controle** e da experiência realizada anteriormente na Fabridoce, existe uma diferença significativa no número de dias do aparecimento de bolores, sendo a formulação exatamente a mesma. No entanto, o método de conservação utilizado na **Experiência 1 – Controle** foi um saco de congelação contendo um *zip*, um método menos eficiente do que a selagem de uma embalagem num equipamento próprio para o efeito. Nas condições testadas existe maior probabilidade de migração da humidade na embalagem, promovendo mais facilmente o crescimento de bolores e, conseqüentemente, reduzindo o tempo de prateleira do produto.

De acordo com dados levantados na literatura, a principal preocupação na formulação de barras de nutrição é a capacidade de ligação da água aos ingredientes. Uma maior capacidade de ligação à água resulta numa barra mais rígida durante o armazenamento, levando a um menor prazo de validade. O prazo de validade ideal de uma barra é de 10 a 12 meses. Os principais fatores que têm maior impacto na ligação de proteínas à água são o pH, o teor de proteínas e o teor de gordura.<sup>131</sup>

**Tabela 20** – Número de dias em que as barras de sementes com clara não demonstraram bolores visíveis, após selagem em saco de congelação, selagem envolvendo temperatura e embalagem em atmosfera modificada. FC – Farinha de coco; SK – Sorbato de potássio

<b>Experiência</b>	<b>Método de conservação</b>	<b>Número de dias</b>
Controlo realizado anteriormente na empresa Fabridoce	Selagem	12
	Atm. modificada	>64
<b>1 - Controlo</b> (FC + SK + sementes: chia, abóbora, girassol e cânhamo)	Selagem em saco de congelação	6
<b>2</b> – FC + SK + sementes: chia, girassol e quinoa branca	Selagem em saco de congelação	6
<b>3</b> – Isolado de proteína de soja	Selagem em saco de congelação	8
<b>4</b> – Óleo de girassol + lecitina de soja	Selagem em saco de congelação	10
<b>5</b> – Isolado de proteína de soja + óleo de girassol + lecitina de soja	Selagem em saco de congelação	9

O concentrado de proteína de soja é uma excelente opção para aplicar em barras nutricionais, pois a sua ligação à água é bastante reduzida e possui uma elevada digestibilidade (94%).<sup>131</sup> Além disso, já existem evidências científicas de que a clara de ovo pode ser combinada com proteínas vegetais, como as proteínas de soja.<sup>74</sup> Porém, o desenvolvimento de produtos com ingredientes funcionais afeta negativamente o sabor e o *mouthfeel*. Nesse sentido, os consumidores ficam reticentes a esses tipos de produtos, optando pelos alimentos convencionais menos saudáveis.<sup>74</sup> Isto leva a que a adição do concentrado de proteína de soja seja um ingrediente desafiador na formulação das barras de sementes. Embora a adição de proteína de soja possa criar problemas no processamento e na perceção sensorial, esses obstáculos podem ser facilmente superados com a adição moderada de proteína, a proporção correta de outros ingredientes funcionais e as técnicas de processamento.<sup>134</sup> Deste modo, na **Experiência 3** foi adicionada proteína de soja e reduzida ligeiramente a quantidade de farinha de coco. Não existem recomendações sobre a quantidade de proteína de soja utilizada em barras de nutrição, no entanto, tendo em conta um estudo de mercado, a proteína de soja constitui normalmente 10 a 23% das barras.

O teor de gordura também interfere no tempo de prateleira de uma barra de nutrição. O aumento do teor de gordura tende a diminuir a ligação à água. Em geral, as

barras formuladas com maior teor de gordura demonstraram uma menor afinidade para estabelecer ligações com a água do que as formulações com menor teor de gordura.<sup>131</sup> O tipo de gordura mais utilizado no desenvolvimento de barras são os óleos, que quando adicionados devem ser acompanhados com a adição de lecitina de soja, que atua como aditivo (E322) emulsificante de origem natural.<sup>88</sup> A gordura é adicionada em pequenas quantidades, visando macieza, brilho e sobretudo melhor *mouthfeel*. Segundo o Regulamento (UE) n° 1129/2011<sup>132</sup>, a lecitina de soja tem como dosagem máxima 350 mg por 100 g de alimento. Assim sendo, na **Experiência 4** foi adicionado óleo de girassol e lecitina de soja e reduzido o teor de farinha de coco.

Na **Experiência 5** foi adicionada a proteína de soja, o óleo de girassol e a lecitina de soja com o intuito de avaliar o comportamento da barra relativamente ao prazo de validade e comparar com as experiências anteriores, em que se utilizaram estes ingredientes individualmente. Nestas últimas Experiências (**Experiência de 3 a 5**) foi retirado o sorbato de potássio, para averiguar até que ponto a utilização deste ingrediente afetava o tempo de prateleira. Além disso, é um conservante e o consumidor tende a optar por alimentos sem conservantes.

Com base na análise sensorial preliminar, as barras da **Experiência 3** estavam menos secas do que as barras das experiências anteriores, no entanto, continuavam quebradiças. Possuíam um sabor a coco semelhante às experiências anteriores, sendo que a adição da proteína de soja e a ligeira diminuição do teor de farinha de coco não comprometeu o sabor das barras. A adição de óleo de girassol e lecitina de soja na formulação da **Experiência 4** reduziu a secura das barras, não ficando quebradiças após arrefecimento, e melhorou *mouthfeel* da barra, tornando-a mais “leve” de consumir. Nesta experiência não foi possível formar uma espuma firme como referido no procedimento, provavelmente devido à adição de gordura ao preparado. A presença de óleo tem um efeito prejudicial nas propriedades espumantes da clara de ovo. A adição de óleo de sementes, neste caso concreto de sementes de girassol, resulta na redução do volume de espuma de clara de ovo e na tendência da estrutura da espuma se decompor durante batidas contínuas.<sup>59</sup> Os lípidos podem enfraquecer as interações proteína-proteína, interferindo nas superfícies hidrofóbicas. Os lípidos interrompem as interações proteicas na interface ar/água e inibem a formação de espuma como resultado do deslocamento das proteínas da interface. Os lípidos com elevada polaridade (lecitina) são mais eficazes em inibir a formação de espumas de clara de ovo. A lecitina carregada positivamente pode interagir com proteínas carregadas negativamente e impedir a associação de proteínas na

interface ar/água.<sup>135</sup> Relativamente à **Experiência 5**, as barras apresentavam um sabor bastante ténue a soja, sobrepondo-se o sabor a coco. O sabor estava bastante semelhante às barras da **Experiência 4**, que não continham soja na sua composição. Apresentavam maior secura comparativamente às barras que possuíam óleo e lecitina, contudo não estavam tão secas ao ponto de ficarem quebradiças. A secura das barras da **Experiência 3** e da **Experiência 5** poderá ser explicada pelo facto de uma barra de nutrição com maior teor de proteína estar associada ao aumento de ligações com a água.<sup>131</sup> Como referido anteriormente, a proteína de soja estabelece poucas ligações com a água, restando apenas as proteínas da farinha de coco e da clara de ovo para formar essas ligações. Assim sendo, é necessário otimizar a proporção dos ingredientes que contêm elevado teor de proteína, de forma a que a barra não fique seca após arrefecimento e armazenamento.

Em relação ao tempo de prateleira, o aparecimento de bolores nas barras das **Experiências 3, 4 e 5** ocorreu após 8, 10 e 9 dias de conservação, respetivamente. Concluiu-se que tanto a adição de proteína de soja, como de gordura e emulsionante (óleo de girassol e lecitina de soja) aumentou o prazo de validade do produto. No entanto, o teor de gordura teve um papel mais importante neste parâmetro de análise, pois as experiências que possuíram maior tempo de prateleira foram as que continham óleo de girassol e lecitina de soja. Além disso, concluiu-se que o sorbato de potássio não foi relevante para a extensão do prazo de validade das barras de sementes, pois as que continham este ingrediente na sua constituição (**Experiência 1 – Controlo e Experiência 2**) tiveram menor durabilidade (6 dias).

Em todas as Experiências realizadas, o tempo de prateleira das barras foi demasiado curto (6 a 10 dias) tendo em conta a tipologia de produto. Uma barra de nutrição comercialmente bem-sucedida deve ter um prazo de validade longo (10 a 12 meses) e um sabor e textura consistentes durante essa vida útil.<sup>89</sup> O embalamento das barras em atmosfera modificada tem um efeito preponderante no tempo de prateleira das mesmas (**Tabela 20**), e, assim sendo, seria necessário testar as mesmas formulações em atmosfera modificada para obter mais conclusões relativamente ao prazo de validade das barras de sementes desenvolvidas.

### 5.2.2. Análise nutricional

De forma a analisar variações na quantidade de nutrientes do produto final ao longo do desenvolvimento das barras de sementes, foi calculado o valor nutricional das barras produzidas em diferentes experiências (**Tabela 21**).

O valor energético das várias experiências foi relativamente semelhante, tendo sido entre 267 e 291 kcal. A experiência com menor valor energético foi a **Experiência 3**, que continha o concentrado de proteína de soja e nenhum teor de gordura adicionado, e com maior valor energético foi a **Experiência 1 – Controlo**, que apresentava 4 sementes na sua composição. As sementes utilizadas foram as sementes de girassol, chia, abóbora e cânhamo, com 51,5, 32,0, 45,0 e 48,0% de lípidos, respetivamente. Como referido anteriormente, o teor lipídico é a porção que contribui em maior quantidade para o aporte calórico (1 g equivale a 9 kcal), e, desta forma, os resultados foram concordantes com o expectável.

**Tabela 21** – Declaração nutricional das barras de sementes da **Experiências 1 – Controlo** - 4 sementes: girassol, abóbora, cânhamo e chia; **Experiência 3** - proteína de soja; **Experiência 4** - óleo de girassol e a lecitina de soja e **Experiência 5** – proteína de soja, óleo de girassol e lecitina de soja.

	<b>Experiência 1 - Controlo</b>	<b>Experiência 3</b>	<b>Experiência 4</b>	<b>Experiência 5</b>
Valor energético	1218	1118	1181	1206
Energia (kJ/kcal)	291	267	282	288
Lípidos (g):	14,5	9,5	12,9	13,3
- dos quais saturados	3,1	1,8	2,4	2,4
Hidratos de carbono (g)	20,5	23,3	24,7	23,1
- dos quais açúcares	14,2	13,9	14,3	13,2
Proteínas (g)	14,6	18,4	12,6	15,1
Fibra (g)	11,4	10,2	11,9	11,2
Sal (g)	0,11	0,39	0,11	0,20
Alegação nutricional	Rico em fibra Fonte de proteína Baixo teor de sal	Rico em fibra Rico em proteína	Rico em fibra Fonte de proteína Baixo teor de sal	Rico em fibra Rico em proteína

O teor de hidratos de carbono foi significativamente inferior na **Experiência 1 – Controlo** (20,5 g). Este resultado está de acordo com o esperado dado o valor nutricional das sementes utilizadas. As sementes de girassol, chia, cânhamo e abóbora são constituídas por 20,0%, 18,0%, 4,0% e 1,1% de carboidratos, respetivamente, enquanto que a quinoa branca, utilizada nas **Experiências 2 a 5**, possui 62% de hidratos de carbono. A **Experiência 4** apresentou maior conteúdo de hidratos de carbono (24,7 g), uma vez que foi necessária uma percentagem reduzida de óleo de girassol e lecitina de soja para obter os resultados desejáveis, sem ser preciso diminuir significativamente a quantidade

de farinha de coco, ao invés das experiências que continham a proteína de soja. Os teores de açúcar foram relativamente semelhantes entre as experiências.

O conteúdo proteico variou significativamente entre as experiências (12,6 a 18,4 g), sendo a **Experiência 4** a que conteve menor teor proteico (adição de gordura) e a **Experiência 3** a que apresentou maior teor proteico (adição isolada do concentrado de proteína de soja). Para obter as alegações nutricionais “fonte de proteína” / “rico em proteína” é necessário que, pelo menos, 12% e 20% do valor energético do alimento seja fornecido por proteína, respetivamente. As barras da **Experiência 1 – Controlo** contém 14,6 g de proteína por 100 g de alimento, correspondendo exatamente a 20,0% do valor energético, valor mínimo necessário para obter a alegação “rico em proteína”. No entanto, tendo em conta pequenas variações ou incidências ocorrida nos cálculos, esta percentagem poderá diminuir ligeiramente, encontrando-se no limite mínimo. Dessa forma, é proposta a alegação “fonte de proteína”. As barras da **Experiência 3, 4 e 5** apresentaram um valor energético proveniente de proteína de 27,5%, 17,8% e 21,0%. Por essa razão, poderá aplicar-se a alegação “rico em proteína” às barras de sementes da **Experiência 3** e da **Experiência 5** e a alegação “fonte proteína” às barras de sementes da **Experiência 4**.

O teor de fibra foi semelhante em todas as experiências (11,2 g a 11,9 g), à exceção da **Experiência 3** que apresentou um teor de fibra ligeiramente inferior (10,2 g). Para ter a alegação de “fonte de fibra”, o alimento tem de conter, no mínimo, 3 g de fibra por 100 g ou 1,5 g por 100 kcal. Por outro lado, para se poder aplicar a alegação “rico em fibra”, é necessário a presença de 6 g de fibra por 100 g de produto ou 3 g por 100 kcal. De acordo com os resultados todas as formulações poderão conter a alegação “rico em fibra”.

O teor de sal da **Experiência 1 – Controlo** e da **Experiência 4** faz com que estas barras possam conter a alegação nutricional “baixo teor de sal”. De acordo com o Regulamento (CE) nº 1924/2006<sup>85</sup>, uma alegação de que um alimento é de baixo teor de sal só pode ser feita quando o produto não contiver mais de 0,12 g de sal por 100 g de alimento. As experiências referidas anteriormente possuem um teor de sal de 0,11 g.

De salientar, que de acordo com o Regulamento de Execução (EU) 2020/24 da Comissão<sup>136</sup>, que autoriza a extensão da utilização das sementes de chia como novo alimento, existe a possível formação de acrilamida quando as sementes de chia são utilizadas em alimentos que exigem um tratamento térmico a uma temperatura igual ou superior a 120°C no seu fabrico, transformação ou preparação, como é o caso das barras

de sementes. Desta forma serão necessárias informações adicionais quando um alimento com sementes de chia é submetido a cozedura.

Após análise e comparação do valor nutricional das várias formulações testadas, selecionou-se a formulação com resultados mais promissores – **Experiência 4** – para comparação com barras comercializadas no mercado (**Tabela 22**). O valor energético da formulação foi significativamente inferior às barras comercializadas no mercado. Tanto as barras de cereais NuGo e FiberOne, como as barras que contêm clara de ovo são constituídas por alimentos com elevado valor energético, como por exemplo, amendoins, tâmaras, amêndoas e cereais (**Tabela 10**). Em geral, um elevado valor energético está associado a um elevado teor de lípidos, mas não é este o caso. No caso destas barras de mercado, o que faz com que o valor energético seja elevado comparativamente com a formulação desenvolvida, é o elevado teor de hidratos de carbono, que é o dobro ou o triplo da quantidade existente nas barras de sementes. Estes valores elevados de carboidratos estão relacionados principalmente com os ingredientes referidos anteriormente.

**Tabela 22** - Declaração nutricional (por 100g de alimento) das barras com clara de ovo das marcas NuGo e RXBAR e das barras de sementes das marcas NuGo e FiberOne, comercializados no mercado. Entre parêntesis está apresentado o ingrediente base que constitui cada produto.

	<b>NuGo (clara de ovo)</b>	<b>RXBAR (clara de ovo)</b>	<b>NuGo (mistura de fibra)</b>	<b>FiberOne (raiz de chicória e cereais)</b>
Peso por barra (g)	50	52	45	40
Valor energético   Energia (kJ/kcal)	1507 360	1612 385	1537 367	1465 350
Lípidos (g):	10,0	13,5	13,3	10,0
- dos quais saturados	2,0	1,9	4,4	3,75
Hidratos de carbono (g)	44,0	48,1	62,2	72,5
- dos quais açúcares	32,0	28,9	17,8	22,5
Proteínas (g)	24,0	23	6,7	5,0
Fibra (g)	4,0	9,6	26,7	22,5
Sal (g)	0,54	0,60	0,13	0,24
Alegação nutricional	Fonte de fibra Rico em proteína	Rico em fibra Rico em proteína	Rico em fibra	Rico em fibra

O teor de proteína das barras de mercado com clara de ovo é significativamente superior ao das barras de sementes da **Experiência 4**. A barra com clara de ovo da NuGo contém 24,0 g de proteína em 100g de alimento, o que corresponde a 26,7% do valor energético. A barra RXBAR possui 23,0 g de proteína em 100 g de produto, correspondendo a 23,9% do valor energético. Ambas as barras possuem a alegação “rico em proteína”, visto que o valor energético proveniente de proteína é igual ou superior a 20,0%. O valor energético proveniente de proteína da formulação referida é 17,8%, não atingindo os 20,0%, e, por essa razão, apenas se poderá aplicar a alegação “fonte de proteína”. Contudo, se se comparar as formulações das barras de sementes em geral e não apenas da **Experiência 4**, o valor energético proveniente de proteína é, em média, equivalente ao das barras de mercado.

O teor de fibra das barras de cereais é significativamente superior às barras de sementes. Este resultado já era expectável, uma vez que as barras de cereais NuGo e FiberOne contêm fontes naturais de fibra como ingredientes: extrato de raiz de chicória, inulina, fibra de cana de açúcar e psílio. As barras de cereais NuGo e FiberOne são constituídas por 26,7 g e 22,5 g de fibra por 100 g de alimento, respetivamente, podendo-se aplicar claramente a alegação nutricional “rico em fibra”. No entanto, as barras de sementes apresentaram um teor de fibra superior às barras de mercado com clara de ovo. A barra com clara de ovo da NuGo contém 4,0 g de fibra em 100 g de alimento, tendo a alegação “fonte de fibra”, enquanto que a barra da RXBAR possui 9,6 g de fibra por 100 g de alimento, aplicando-se a alegação “rico em fibra”.

### 5.2.3. Análise crítica do desenvolvimento do produto

A barra de sementes com clara de ovo demonstrou ser um produto bastante promissor, com uma evolução positiva ao longo das experiências, tendo-se resolvido o problema do facto da barra ser quebradiça e “pesada” ao consumir. Além disso, a barra de sementes demonstrou ser um alimentos com atributos nutricionais favoráveis, podendo conter 3 tipos de alegações nutricionais: “fonte de proteína” / “rico em proteína”, “rico em fibra” e “baixo teor de sal”. No entanto, a nível sensorial, esta formulação ainda pode ser otimizada, de modo a ser menos seca e mais “leve” de consumir. Para tal, terá de se encontrar o balanço adequado do teor de gordura-proteína, de forma a que as moléculas que interagem com a água sejam as suficientes para obter a textura e o paladar desejados. Uma sugestão seria a adição de coco ralado e a diminuição da quantidade de farinha de coco. O coco ralado contém 63,9% de lípidos, ao contrário da farinha de coco que possui

apenas 8,5% de lípidos. Ao adicionar coco ralado, poder-se-ia diminuir a quantidade de óleo utilizado e ter-se-ia a garantia que este ingrediente não iria afetar o sabor da barra, que é sabor a coco. Além disso, iria ajudar a unir os componentes do preparado, e, conseqüentemente, a conseguir uma barra menos seca. Contudo, não se pretenderia diminuir grande quantidade da farinha de coco, pois esta é rica em fibra (39%) e rica em proteína (22,7% do valor energético é proveniente de proteína), sendo relevante para o valor nutricional do produto final.

Existe ainda outro aspeto negativo que tem bastante impacto no consumidor e na comercialização do alimento, que é o facto do tempo de validade ser demasiado curto para a tipologia do produto. Para isso, sugere-se o embalamento em atmosfera modificada. Ao otimizar a formulação da barra de sementes, este parâmetro poderá ser gradualmente melhorado.



## 6. Conclusão e Perspetivas Futuras

No âmbito do estágio curricular foi possível desenvolver três tipos de produtos contendo clara de ovo como ingrediente principal: aperitivos crocantes de queijo, pastéis com espinafres e pimentos e barras de sementes. Os aperitivos crocantes com clara e queijo revelaram ser um produto interessante ao longo das várias etapas de desenvolvimento, conseguindo-se uma textura crocante e um sabor agradável a queijo. A formulação final continha 17,4 g de proteína em 100 g de alimento, correspondendo a 25,8% do valor energético, podendo então conter a alegação nutricional “rico em proteína”. Apesar de ser muito promissor, após dois meses da sua produção, o *snack* ficou ligeiramente rígido e com um sabor “farinhento”, o que poderá ser devido à retrogradação do amido que ocorre ao longo do armazenamento. A retrogradação do amido é frequentemente considerada como tendo efeitos indesejáveis, contribuindo para a redução do prazo de validade do produto. Para retardar ou inibir este efeito, no futuro, a formulação deveria ser reajustada usando o emulsionante lecitina de soja para diminuir a taxa de formação de *snacks* com uma textura demasiado dura. Além disso, dever-se-ia arranjar um método/ equipamento capaz de avaliar a textura desta tipologia de produtos, de forma a existir um termo de comparação e ser mais intuitivo a compreensão de expressões como “favoravelmente crocante” e “excessivamente/ligeiramente duros”.

Os pastéis com clara, espinafres e pimentos demonstraram ser um produto com atributos sensoriais e nutricionais favoráveis, podendo ser dado o desenvolvimento da formulação como concluído. Tendo em conta a análise nutricional, seria possível aplicar as seguintes alegações nutricionais na rotulagem: “rico em proteína”, dado que 37,5% do valor energético era proveniente de proteína, e “sem adição de açúcares”, pois contém somente açúcares naturalmente presentes. Contudo, o alimento possuía um prazo de validade relativamente curto (3 a 21 dias), o que é um aspeto negativo na comercialização do produto e do ponto de vista do consumidor. No futuro seria pertinente testar a ultracongelção do pastel devido a ser um produto de conveniência e com o intuito de aumentar a sua durabilidade. Atualmente no mercado, existem poucos produtos ultracongelados que contêm clara de ovo como ingrediente principal, sendo uma vantagem para abranger um novo nicho de mercado. Devido à potencialidade deste produto, poderão ser formulados no futuro novos sabores de pastéis, como de castanha e amêndoa, batata doce e limão, maçã e canela e abóbora e requeijão.

A barra de sementes com clara de ovo teve uma evolução bastante positiva ao longo das experiências, conseguindo-se um produto consistente e com uma textura menos seca do que os protótipos anteriores testados na empresa. Este produto poderá conter as alegações nutricionais “fonte de proteína” / “rico em proteína”, “rico em fibra” e “baixo teor de sal”. No entanto, a nível sensorial, esta formulação ainda pode ser otimizada no futuro, de modo a ser menos seca e mais “leve” de consumir. Para tal, terá de se encontrar o balanço adequado do teor de gordura-proteína, de forma a que as moléculas que interagem com a água sejam as suficientes para obter a textura e o paladar desejados. Uma sugestão seria a adição de coco ralado e a diminuição da quantidade de farinha de coco, pois o coco ralado contém 63,9% de lípidos, ao contrário da farinha de coco que possui apenas 8,5% de lípidos. A adição de coco ralado iria ajudar a unir os componentes do preparado, e, conseqüentemente, a conseguir uma barra menos seca, e ter-se-ia a garantia que este ingrediente não iria comprometer o sabor da barra. Tal como para os produtos referidos anteriormente, as barras de sementes também apresentaram um prazo de validade bastante curto tendo em conta a tipologia do produto. Para a resolução desse problema sugere-se o embalamento em atmosfera modificada, que aumenta significativamente o prazo de validade dos alimentos.

## 7. Referências

1. Kovacs - Nolan, J., Phillips, M. & Mine, Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8421–8431 (2005).
2. Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y. & Ahn, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-A review. *Poult. Sci.* **92**, 3292–3299 (2013).
3. Li-Chan, C.Y. E. & Hyun-Ock, K. Chapter 1 - Structure and Chemical Composition of Eggs. in *Egg Bioscience and Biotechnology* (ed. Mine, Y.) 1–95 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
4. Nys, Y. & Guyot, N. Egg formation and chemistry. in *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry, Production and Consumption* 83–132 (Woodhead Publishing Limited, 2011).
5. Sunwoo, H. H. & Gujral, N. Chemical Composition of Eggs and Egg Products. in *Handbook of Food Chemistry* 331–363 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015).
6. Nau, F., Lechevalier, V. & Inra, U. M. . R. Chapter 14 - Egg proteins. in *Handbook of hydrocolloids* 1–24 (2009).
7. Guha, S., Majumder, K. & Mine, T. Egg Proteins. in *Module in Food Science* (ed. Melton, L., Shahidi, F. & Varelis, F.) 74–84 (Elsevier Inc., 2018).
8. Strixner, T. & Kulozik, U. Chapter 7 - Egg proteins. in *Handbook of Food Proteins* 3–60 (Woodhead Publishing Limited, 2011).
9. H.-D. Belitz., W. G. & P. S. Chapter 11 - Eggs. in *Food Chemistry* 546–562 (Springer International Publishing, 2009).
10. Desert, C., Guérin-Dunbiard, C., Nau, F., Jan, G., Val, F. & Mallard, J. Comparison of Different Electrophoretic Separations of Hen Egg White Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4553–4561 (2001).
11. Stevens, L. Egg White Proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **1008**, 1–9 (1991).
12. Ting, B. P. C. P., Pouliot, Y. & Gauthier, S. F. Chapter 19 - Fractionation of egg proteins and peptides for nutraceutical applications. in *Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries* 595–618 (Woodhead Publishing Limited, 2010).
13. Nimalaratne, C. & Wu, J. Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity : A Review. *Nutrients* **7**, 8274–8293 (2015).

14. Huntington, J. A. & Stein, P. E. Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B* **756**, 189–198 (2001).
15. Sharif, M. K.; Saleem, M. & Javed, K. Chapter 15 - Food Materials Science in Egg Powder Industry. in *Role of Materials Science in Food Bioengineering* 505–537 (Elsevier Inc., 2018).
16. Zhu, Y., Vanga, S. K., Wang, J. & Raghavan, V. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends Food Sci. Technol.* **78**, 188–196 (2018).
17. Dewage, E., Sandun, N., Uk, D. & Ahn, D. Chapter 23 - Function and Separation of Ovotransferrin from Chicken Egg. in *Egg Innovation and Strategies for Improvement* 243–249 (Elsevier Inc., 2017).
18. Mine, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 225–232 (1995).
19. Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M. & Schade, R. *Bioactive Egg Compounds*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007).
20. Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., Jo, C., Suh, J. W. & Ahn, D. U. Enzymatic hydrolysis of ovomucoid and the functional properties of its hydrolysates. *Poult. Sci.* **94**, 2280–2287 (2013).
21. Saxena, I. & Tayyab, S. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 13–23 (1997).
22. Besler, M., Steinhart, H. & Paschke, A. Allergenicity of hen's egg white proteins: IgE binding of native and deglycosylated ovomucoid. *Food Agric. Immunol.* **9**, 277–288 (1997).
23. Omana, D. A., Wang, J. & Wu, J. Ovomucin e a glycoprotein with promising potential. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 455–463 (2010).
24. Toussant, M. J. & Latshaw, J. D. Ovomucin content and composition in chicken eggs with different interior quality. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1666–1670 (1999).
25. Mine, Y. Egg Proteins and Peptides in Human Health-Chemistry, Bioactivity and Production. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 875–884 (2007).
26. Silveti, T., Morandi, S., Hintersteiner, M. & Brasca, M. Chapter 22 - Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry. in *Egg Innovation and Strategies for Improvement* 233–242 (Elsevier Inc., 2017).
27. Cystatinaktivität, D. L.- & Eiklar, V. Changes in the activity of lysozyme and cystatin depending on the age of layers and egg treatment during processing. *Arch.*

- Geflügelk.* **68**, 275–279 (2004).
28. Tomimatsu, Y., Clary, J. J. & Bartulovich, J. J. Physical Characterization Inhibitor of Ovoidin, from Chicken a Trypsin Egg White and. *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 536–544 (1966).
  29. Hamazume, Y., Mega, T. & Ikenaka, T. Characterization of Hen Egg White- and Yolk-Riboflavin Binding Proteins and Amino Acid Sequence of Egg White-Riboflavin Binding Protein. *J. Biochem.* **95**, 1633–1644 (1984).
  30. Lachlanson, I. M., Nimpfi, J. & Schneideroll, W. J. Avian Riboflavin Binding Protein Binds to Lipoprotein Receptors in Association with Vitellogenin. *J. Biol. Chem.* **269**, 24127–24132 (1994).
  31. Kitamoto, T., Nakashima, M. & Ikai, A. Hen Egg White Ovomacroglobulin Has a Protease Inhibitory Activity. *J. Biochem.* **92**, 1679–1682 (1982).
  32. Green, N. M. *Avidin. Advances in protein chemistry* **29**, (1975).
  33. Wilchek, M. & Bayer, E. A. Applications of Avidin-Biotin Technology: Literature Survey. *Methods Enzymol.* **184**, 14–45 (1990).
  34. Wesierska, E., Saleh, Y., Trziszka, T., Kopec, W., Siewinski, M. & Korzekwa, K. Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 59–64 (2005).
  35. Korzeniowska, M., Bobak, L. & Trziszka, T. Activity of protease inhibitors and lysozyme of hen's egg white depending on feed modification and egg storage. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **14**, 79–83 (2005).
  36. Campbell, L., Raikos, V. & Euston, S. R. Review: Modification of functional properties of egg-white proteins. *Nahrung/Food* **47**, 369–376 (2003).
  37. Froning, G. W., Peters, D., Muriana, P., Eskridge, K., Travnicek, D. & Sumner, S. *S. International egg pasteurization manual.* (2002).
  38. Hoffman, J. R. & Falvo, M. J. Protein - Which is best?: Review article. *J. Sport. Sci. Med.* **3**, 118–130 (2005).
  39. Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P. M., Fischer, A. R. H., Boekel, M. A. J. S., Rutherfurd, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J. & Hendriks, W. H. The future supply of protein for human consumption. *Trends Food Sci. Technol.* **29**, 62–73 (2013).
  40. Nelson, D. I. & Cox, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry.* (W. H. Freeman and Company, 2016).
  41. Evenepoel, P., Geypens, B., Luypaerts, A., Hiele, M., Ghoo, Y. & Rutgeerts, P.

- Human Nutrition and Metabolism Digestibility of Cooked and Raw Egg Protein in Humans as Assessed by Isotope Techniques. *Am. Soc. Nutr. Sci.* **128**, 1716–1722 (1998).
42. Martorell, A., Alonso, E., Boné, J., Echeverría, L., López, M. C., Martín, F., Nevot, S. & Plaza, A. M. Position document : IgE-mediated allergy to egg protein. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. **41**, 320–336 (2013).
  43. Cantani, A. Chapter 9 - Food Allergy. in *Pediatric Allergy, Asthma and Immunology* **114**, 595–682 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008).
  44. Lin, Y., Wu, C., Huang, J., Cheng, J. & Yeh, K. Correlation of ovalbumin of egg white components with allergic diseases in children. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **49**, 112–118 (2016).
  45. Caubet, J. C. & Wang, J. Current Understanding of Egg Allergy. *Pediatr. Clin. North Am.* **58**, 427–443 (2011).
  46. Poulsen, L. K, Hansen, T. K., Nørgaard, A., Vestegaard, H., Skov, P. S & Binslev-Jensen, C. Allergens from fish and egg. *Allergy* **67**, 39–42 (2001).
  47. Cooke, S. K. & Sampson, H. A. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J. Immunol.* **159**, 2026–2032 (1997).
  48. Caubet, Jean-Christoph., Kondo, Y., Urisu, A. & Nowak-Wegrzyn, A. Molecular diagnosis of egg allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **11**, 210–215 (2011).
  49. Lechevalier, V., Croguennec, T., Anton, M. & Nau, F. Chapter 23 - Processed Egg Products : Values. in *Improving the safety and quality of eggs and egg products: Volume 1: Egg chemistry, production and consumption* **2**, 255–274 (Woodhead Publishing Limited, 2010).
  50. Mine, Y. Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World's Poult. Sci. J.* **58**, 31–39 (2002).
  51. Damodaran, S., Anand, K. & Razumovsky, L. Competitive Adsorption of Egg White Proteins at the Air - Water Interface : Direct Evidence for Electrostatic Complex Formation between Lysozyme and Other Egg Proteins at the Interface. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 872–876 (1998).
  52. Alleoni, A. C. C. Albumen Protein and Functional Properties of Gelation and Foaming. *Sci. Agric.* **63**, 291–298 (2006).
  53. Anton, M. & Gandemer, G. Composition, Solubility and Emulsifying Properties of Granules and Plasma of Egg Yolk. *J. Food Sci.* **62**, 484–487 (1997).
  54. Kato, A., Kobayashi, K. & Minaki, K. Improvement of Emulsifying Properties of

- Egg White Proteins by the Attachment of Polysaccharide through Maillard Reaction in a Dry State. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 540–543 (1993).
55. Woodward, S. A. Chapter 5 - Egg protein gels. in *Food Gels* (ed. Harris, P.) 175–199 (Elsevier Science Publishers Ltd, 1990).
  56. Croguennec, T., Nau, F. & Brulé, G. Influence of pH and Salts on Egg White Gelation. *Food Eng. Phys. Prop.* **67**, 608–614 (2002).
  57. Zayas, J. F. Chapter 6 - Gelling Properties of Proteins. in *Functionality of Proteins in Food* 260–309 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997).
  58. Rodríguez Patino, J. M., Delgado, M. D. D. & Linares, J. A. L. Stability and mechanical strength of aqueous foams containing food proteins. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **99**, 65–78 (1995).
  59. Lomakina, K. & Míková, K. A Study of the Factors Affecting the Foaming Properties of Egg White – a Review. *Czech J. Food Sci.* **24**, 110–118 (2002).
  60. Christian, E. & Vaclavik, V. Chapter 10 - Eggs and Egg Products. in *Essentials of Food Science* 205–235 (Springer Science+Business Media, LLC, 2008).
  61. Raikos, V., Campbell, L. & Euston, S. R. Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. *Food Res. Int.* **40**, 347–355 (2007).
  62. Heidi. Egg White Foams. 1 (2013). Available at: <http://adashofscience.com/egg-white-foams/>. (Accessed: 12th January 2020)
  63. Pernell, C. W., Foegeding, E. A., Luck, P. J. & Davis, J. P. Properties of whey and egg white protein foams. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **204**, 9–21 (2002).
  64. Chambers, J. R., Zaheer, K., Akhtar, H. & Abdel-Aal, E.-S. M. Chapter 1 - Chicken Eggs. in *Egg Innovations and Strategies for Improvements* 3–11 (Elsevier Inc., 2017).
  65. Guard-Petter, J. The chicken, the egg and Salmonella enteritidis: Minireview. *Environ. Microbiol.* **3**, 421–430 (2001).
  66. Baron, F., Gautier, M. & Brule, G. Factors Involved in the Inhibition of Growth of Salmonella enteritidis in Liquid Egg White. *J. Food Prot.* **60**, 1318–1323 (1997).
  67. Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. & Immerseel, F. V. Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. *Fed. Eur. Microbiol. Soc.* **33**, 718–738 (2009).
  68. Upadhyaya, I., Yin, Hsin-bai., Nair, M. S. & Venkitanarayanan, K. Chapter 19 - Natural Approaches for Improving Postharvest Safety of Egg and Egg Products.

- Producing Safe Eggs* (Elsevier Inc., 2017).
69. Baron, F. & Jan, S. Chapter 14 - Egg and egg product microbiology. in *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products* **2**, 1–408 (Woodhead Publishing Limited, 2011).
  70. Bryan, C. A. O., Ricke, S. C. & Crandall, P. G. Chapter 18 - Chemical and Physical Sanitation and Pasteurization Methods for Intact Shell Eggs. in *Producing Safe Eggs* 373–390 (Elsevier Inc., 2017).
  71. Corry, J. E. L. Chapter 9 - Microbiological analysis of eggs and egg products. in *Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs* 183–201 (Woodhead Publishing Limited, 2005).
  72. Mukhopadhyay, S. Patent Application Pub . No .: US 2009/0238943 - Process for removal of pathogens from liquid eggs. 1–18 (2009).
  73. Baker, R. C. & Bruce, C. Chapter 8 - Effects of processing on the microbiology of eggs. in *Microbiology of the avian egg* **4**, 153–173 (Chapman & Hali, 1994).
  74. Katz, M., Jay, N., Lui, S. & Prefontaine, D. Patent Application Pub . No .: US 2009/0220674A1 - Egg Protein Product. **1**, 1–7 (2009).
  75. Sarcinelli, M. F., Venturini, K. S. & César da Silva, L. Processamento de ovos e ovoprodutos e as suas aplicações. *Bol. Técnico - PIE-UFES02307* **1**, 1–8 (2007).
  76. Fujiwara, N., Nishijima, N., Sasahara, R., Kobayashi, H. & Ito, A. Patent Application Pub. No.: US 2017/0119030A1 - Frozen liquid egg whites, method for producing same, and liquid egg whites resulting from defrosting frozen liquid egg whites. **1**, (2017).
  77. Lechevalier, V., Jeantet, R., Arhaliass, A., Legrand, J. & Nau, F. Egg white drying : Influence of industrial processing steps on protein structure and functionalities. *J. Food Eng.* **83**, 404–413 (2007).
  78. Alamprese, C. Chapter 24 - The Use of Egg and Egg Products in Pasta Production. in *Egg Innovation and Strategies for Improvement* 251–259 (Elsevier Inc., 2017).
  79. Garcés-Rimón, M., Sandoval, M., Molina, E., López-Fandiño, R. & Miguel, M. Egg protein hydrolysates : New culinary textures. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 1–6 (2015).
  80. Jones, R. E. & Calif, O. Patent Application Pub. No .: US 1969/3475180A - Low-calorie egg product. 1–7 (1969).
  81. Fabridoce - Doces Regionais. Diretório de Produtos. 1–48 (2019).
  82. Magdelaine, P. *Chapter 1 - Egg and egg product production and consumption in*

- Europe and the rest of the world. Improving the safety and quality of eggs and egg products: Volume 1: Egg chemistry, production and consumption* (Woodhead Publishing Limited, 2011).
83. Schwägele, F. C. *Chapter 5 - Egg quality assurance schemes and egg traceability. Improving the safety and quality of eggs and egg products: Volume 1: Egg chemistry, production and consumption* (Woodhead Publishing Limited, 2011).
  84. McGinnes, M. Can Egg Whites Crack into New Protein-Packed Categories? (2018). Available at: <https://www.nosh.com/news/2018/can-egg-whites-crack-into-new-protein-packed-categories>. (Accessed: 16th January 2020)
  85. *Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. Jornal Oficial da União Europeia* 9–25 (2006).
  86. West, H. Egg Whites Nutrition: High in Protein, Low in Everything Else. (2018). Available at: <https://www.healthline.com/nutrition/egg-whites-nutrition>. (Accessed: 16th January 2020)
  87. Brennan, A. M., Derbyshire, E., Tiwari, B. K. & Brennan, C. S. Ready-to-eat snack products: The role of extrusion technology in developing consumer acceptable and nutritious snacks. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**, 893–902 (2013).
  88. Garcia, A., Reis, C., Serpa, J., Viegas, J., Ferreira, M., Almeida, S., Nunes, M. C. & Tavares, N. Physical-sensory evaluation of a cereal bar with quinoa: a preliminary study. *J. Biomed. Biopharm. Res.* **15**, 25–36 (2018).
  89. Mesu, G. J. United States Patent, No.:9,603,381B2 - Cereal bar having a crunchy texture. **2**, 1–6 (2017).
  90. Ward, L. S. & Hahn, G. L. Patent Application Publication, Pub. No.: US 2012/0269939A1 - Cereal binder compositions and methods for making cereal bars and cereal clusters. **1**, 1–13 (2012).
  91. James, L. E. A. Chapter 1 - Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, Chemistry, Nutritional, and Functional Properties. in *Advances in Food and Nutrition Research* **58**, 1–31 (Elsevier Inc., 2009).
  92. Jancurová, M., Minarovičová, L. & Dandár, A. Quinoa – a Review. *Czech J. Food Sci.* **27**, 71–79 (2009).
  93. Coorey, R., Tjoe, A. & Jayasena, V. Gelling Properties of Chia Seed and Flour. *E Food Eng. Phys. Prop.* **79**, 859–866 (2014).
  94. Segura-Campos, M. R., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L. &

- Betancur-Ancona, D. Chemical and Functional Properties of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Gum. *Int. J. Food Sci.* **2014**, 1–5 (2014).
95. Alfawaz, M. A. Chemical Composition and Oil Characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Seed Kernels. *Food Sci. Agric.* 5–19 (2004).
  96. Anjum, F. M., Nadeem, M., Khan, M. I. & Hussain, S. Nutritional and therapeutic potential of sunflower seeds :a review. *Br. Food J.* **114**, 544–552 (2012).
  97. Borchani, C., Besbes, S., Blecker, Ch. & Attia, H. Chemical Characteristics and Oxidative Stability of Sesame Seed, Sesame Paste, and Olive Oils. *J. Agr. Sci. Tech.* **12**, 585–596 (2010).
  98. Elleuch, M., Besbes S., Roiseux, O., Blecker, C. & Attia, H. Food Chemistry Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chem.* **103**, 641–650 (2007).
  99. Gasin, G. A. P. O seu guia detalhado para Embalagem com Atmosfera Modificada. *Air Prod. Chem. Inc.* 1–86 (2018).
  100. Devlieghere, F., Debevere, J. & Gil, M. I. Chapter 11 - Modified Atmosphere Packaging (MAP), product safety and nutritional quality. in *Novel food packaging techniques* 208–230 (Woodhead Publishing Limited, 1995).
  101. Fellows, P. *Food Processing Technology - Principles and Practice.* (Woodhead Publishing Limited, 2000).
  102. Mathlouthi, M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control* **12**, 409–417 (2001).
  103. Real, H., Tristão, I., Barbosa, M., Frias, A., Perdigão, A., Martins, A. & Abrantes, R. Rotulagem alimentar: um guia para uma escolha consciente. *Associação Portuguesa de Nutricionistas* 1–83 (2017).
  104. Farkye, N. Y. Chapter 44 - Acid-Heat Coagulated Cheeses. in *Cheese* 1111–1115 (Elsevier Ltd, 2017).
  105. O’Brien, N. M & O’Connor, T. P. Chapter 24 - Nutritional Aspects of Cheese. in *Cheese* 603–611 (Elsevier Ltd, 2017).
  106. El Owni, O. A. O. & Osman, S. E. Evaluation of Chemical Composition and Yield of Mozzarella Cheese Using Two Different Methods of Processing. *Pakistan J. Nutr.* **8**, 684–687 (2009).
  107. Mcsweeney, P. L. H., Ottogalli, G. & Fox, P. F. Chapter 1 - Diversity of Cheese Varieties: An Overview. in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* **2**, 1–23 (Elsevier Ltd, 2004).

108. Legg, A. K., Carr, Al. J., Bennett, R. J. & Johnston, K. A. Chapter 26 - General Aspects of Cheese Technology. in *Cheese Technology* 643–675 (Elsevier Ltd, 2017).
109. Barbieri, G., Bolzoni, L., Careri, M., Mangia, A., Parolari, G., Spagnoli, S. & Virgilit, R. Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1170–1176 (1994).
110. Hassan, F. A. M., Gawad, M. A. M. A. E.- & Enab, A. K. Flavour Compounds in Cheese ( Review ). **2**, 15–29 (2013).
111. Singh, N., Singh, S. & Shevkani, K. Chapter 9 - Maize: Composition , Bioactive Constituents, and Unleavened Bread. in *Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention*. 89–99 (Elsevier Inc., 2011).
112. Serna-Saldivar, S. O. & Carrillo, E. P. Chapter 16 - Food Uses of Whole Corn and Dry-Milled Fractions. in *Corn* 435–467 (Elsevier Inc., 2019).
113. Sheng, S., Li, T. & Liu, R. Corn phytochemicals and their health benefits. *Food Sci. Hum. Wellness* **7**, 185–195 (2018).
114. Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q. & Wang, S. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **14**, 568–585 (2015).
115. Day, L. Chapter 10 - Wheat gluten: production, properties and applications. in *Handbook of Food Proteins* 267–288 (Woodhead Publishing Limited, 2011).
116. Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **24**, 115–119 (2007).
117. Cui, S. W., Brummer, Y., Izydorczyk, M., Liu, Q., Wang, Q. & Xie, S. X. *Food Carbohydrates - Chemistry, Physical Properties and Applications. Journal of Biological Chemistry* **270**, (Taylor & Francis Group, LLC, 2005).
118. Del Nobile, M. A., Martoriello, T., Mocci, G. & La Notte, E. Modeling the starch retrogradation kinetic of durum wheat bread. *J. Food Eng.* **59**, 123–128 (2003).
119. Erbay, Z. & Koca, N. Effects of whey or maltodextrin addition during production on physical quality of white cheese powder during storage. *J. Dairy Sci.* **98**, 8391–8404 (2015).
120. Miller, K. A. & Hoseney, R. C. Dynamic Rheological Properties of Wheat Starch-Gluten Doughs. *Cereal Chem.* **76**, 105–109 (1999).
121. Huang, D. P. New Perspectives on Starch and Starch Derivatives for Snack Applications. *Cereal. Foods World* 1–7 (1995).
122. Gudmundsson, M. Retrogradation of starch and the role of its components. *Thermochim. Acta* **246**, 329–341 (1994).

123. Regulamento (UE) n° 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n. o 1924/2006 e (CE) n. o 1925/2006. (2011).
124. Sajilata, M. G. & Singhal, R. S. Specialty starches for snack foods. *Carbohydr. Polym.* **59**, 131–151 (2005).
125. Miyoshi, E. Effects of Heat-Moisture Treatment and Lipids on Gelatinization and Retrogradation of Maize and Potato Starches. *Cereal Chem.* **79**, 72–77 (2002).
126. Luning, P. A., Vries, R. V., Yuksel, D. Ebbenhorst-Seller, T., Wichers, H. J. & Roozen, J. P. Combined Instrumental and Sensory Evaluation of Flavor of Fresh Bell Peppers (*Capsicum annuum*) Harvested at Three Maturation. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2855–2861 (1994).
127. Khoshgozaran, S., Azizi, M. H. & Bagheripoor-Fallah, N. Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: a review. *Dairy Sci. Technol.* **92**, 1–24 (2012).
128. Dermiki, M., Ntzimani, A., Badeka, A., Savvaidis, I. N. & G. Kontominas, M. Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese ‘Myzithra Kalathaki’ using modified atmosphere packaging. *LWT* **41**, 284–294 (2008).
129. Woodward, S. A., & Cotterill, O. J. Texture and Microstructure of Heat-Formed Egg White Gels. *J. Food Sci.* **51**, 333–339 (1986).
130. Pearce, J. A., & Lavers, C. G. Liquid and Frozen Egg: Viscosity, Baking Quality and Other Measurements on Frozen Egg Products. *Can. Journal Res.* **27**, 231–240 (1949).
131. Lisa Bradford. Eight vital ingredients in nutrition-bar applications. *New Hopes Network* (2009). Available at: <https://www.newhope.com/ingredients/8-vital-ingredients-nutrition-bar-applications>. (Accessed: 20th March 2020)
132. Regulamento (UE) n° 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011 relativo a aditivos alimentares. *J. Of. da União Eur.* 1–177 (2011).
133. Christiaens, S., Buggenhout, S., Houben, K., Kermani, Z. J., Moelants, K. R. N., Ngouémazong, E. D., Loey, A. & Hendrickx, M. E. G. Process – Structure – Function Relations of Pectin in Food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 1021–1042 (2016).
134. Padmashree, A., Sharma, G. K., Srihari, K. A. & Bawa, A. S. Development of shelf stable protein rich composite cereal bar. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 335–341 (2012).

135. Zayas, J. F. Chapter 5 - Foaming Properties of Proteins. in *Functionality of Proteins in Food* 260–309 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997).
136. Regulamento de Execução (UE) 2020/24 da Comissão de 13 de Janeiro de 2020 que autoriza a extensão da utilização de sementes de chia (*Salvia Hispanica*) como novo alimento e alteração das condições de utilização e dos requisitos específicos de rotulagem. *J. Of. da União Eur.* **2015**, 12–17 (2020).