



**Sofia Francisco
Antunes**

**Estudo das bases científicas da produção do ovo
cozido conservado em salmoura**

**Scientific bases for production of hard-cooked eggs
preserved in brine**



**Sofia Francisco
Antunes**

**Estudo das bases científicas da produção do ovo
cozido conservado em salmoura**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e supervisão da Engenheira Mariana Marinha do Departamento de Inovação & Desenvolvimento da Derovo.

Dedico este trabalho à minha família e amigos pelo apoio incondicional.

o júri

presidente

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes
professor associado com agregação da Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro

orientador

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À empresa Derovo, agradeço a oportunidade que me deram de poder desenvolver este trabalho nas suas instalações, podendo crescer de forma pessoal e profissional. Agradeço a todos os colaboradores com quem pude trabalhar, pela sua ajuda, prontidão e simpatia, principalmente nas provas organoléticas. Agradeço à minha supervisora Engenheira Mariana Marinha pela disponibilidade e acompanhamento do meu trabalho; bem como ao Engenheiro Leonel Conceição, Engenheira Patrícia Faustino, à Sandra Neves e à Mónica Garrote. Um especial agradecimento ao Ricardo Nunes, ao Gonçalo Jordão e à Graça Pinto pelo companheirismo e ajuda prestados durante todos os meses que decorreram durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Manuel António Coimbra, assim como à Universidade de Aveiro, por todo o apoio e disponibilidade que me dedicou ao longo de toda a minha caminhada académica e mais concretamente neste trabalho.

Aos meus pais, irmãs, namorado, toda a família e amigos, por nunca desistirem de mim e das minhas capacidades, por terem sido os meus pilares durante esta caminhada e me terem ajudado a superar todos os obstáculos e a quem dedico este trabalho.

palavras-chave

Ovo cozido, salmoura, ácidos, pH, condutividade, proteínas

resumo

No presente trabalho estudou-se, ao longo de 7 experiências, a influência do sal e dos ácidos nas características físico-químicas e microbiológicas do ovo cozido conservado em salmoura, em ambiente industrial. Nas experiências 1 a 3 foi avaliado o impacto da diminuição de sal e ácidos da salmoura nas características do ovo cozido, na experiência 4 foi avaliada a evolução do pH e condutividade de soluções contendo diferentes concentrações de sal na presença de ovo cozido, na experiência 5 foi avaliado o impacto da temperatura de arrefecimento do ovo e temperatura da salmoura nas características físico-químicas da salmoura na presença de ovo cozido e nas experiências 6 e 7 foi avaliado o impacto de utilização de pré-salmouras nas características do ovo cozido. O aumento do pH das salmouras quando em contacto com os ovos é explicado pela migração de proteína, bicarbonato e água, contribuindo para a perda de massa do ovo. Este aumento pode levar à contaminação microbiológica, razão pela qual as salmouras devem ser suficientemente ácidas para neutralizar a migração dos compostos do ovo. Um dos ácidos utilizados é um ingrediente relevante para esta proteção. A diminuição da condutividade das salmouras deve-se à entrada de sal e de ácidos no ovo, assim como à saída de água, que vão contribuir para o seu sabor salgado e ácido. Neste trabalho é proposto que os ovos sejam submetidos a uma pré-salmoura antes da sua conservação numa salmoura contendo menos ácido e menos sal, permitindo obter ovos que, apesar de organoleticamente poderem possuir uma rigidez ligeiramente maior do que os ovos comerciais, possuam menor acidez e percepção de salgado, aproximando-os dos ovos acabados de cozer sem qualquer conservação. Num contexto de economia circular, a pré-salmoura que será descartada, por ter uma elevada concentração de proteína, o que lhe confere características de espumabilidade, poderá ser utilizada como ingrediente alimentar para outras aplicações.

keywords

Hard-cooked egg, brine, acids, pH, conductivity, proteins

abstract

The present work studies, in 7 experiments, the influence of salt and acid on the physicochemical and microbiological characteristics of hard-cooked eggs at an industrial environment. Experiments 1 to 3 evaluated the impact on characteristics of hard-cooked eggs of the decrease of salt and acids in brine; experiment 4 evaluated the pH and conductivity evolution a long time of solutions with different concentrations of salt in presence of hard-cooked eggs; experiment 5 evaluated the impact of cooling temperature of egg and temperature of brine in physicochemical characteristics of brine in presence of hard-cooked eggs; and in experiments 6 and 7 it was evaluated the impact of using brine as a washing solution (pre-brine) in the characteristics of hard-cooked eggs. The brine pH increase when in contact with the hard-cooked eggs is explained by the migration of protein, bicarbonate, and water from the egg, contributing to a egg mass loss. This increase can result in a microbiological contamination, the reason why the brines should be acid enough to neutralize the compounds that migrate from the egg. One of the acids used is a relevant ingredient for this protection. The decrease of brine conductivity is due to and the salt and acid entrance in the egg and the running out of water, contributing to the egg salty and acid taste. In this work it is proposed to submit the eggs to a pre-brine solution prior to their conservation in a less acid and salty brine. This allows to obtain eggs that despite their slight toughness can be recognised organoleptically to be less acid and salty, approaching the characteristics of eggs ready cooked without any preservative. Under a circular economy context, the pre-brine that will be discarded, having a high concentration of proteins, with a foamability characteristics, can be used as a food ingredient for different applications.

Abreviaturas

GDL – glucona δ -lactona

BPW – “Buffered Peptone Water” – Água Peptonada Tamponada

rpm – rotações por minuto

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography” – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Índice

1. Enquadramento do trabalho de dissertação	1
1.1. A empresa Derovo	1
1.2. Ovo de galinha	2
1.2.1. Ovo de galinha cru	2
1.2.2. Ovo de galinha cozido	6
1.3. Salmoura como meio de conservação de alimentos	9
1.3.1. Sais	9
1.3.2. Ácidos orgânicos	12
1.4. Objetivos da dissertação	14
2. Procedimentos Experimentais	15
2.1. Amostras	15
2.2. Experiências realizadas para avaliar o impacto da salmoura nas características do ovo cozido	15
2.2.1. Experiências 1, 2 e 3 - Diminuição de sal e ácidos da salmoura	15
2.2.2. Experiência 4 - pH e condutividade das soluções aquosas em que os ovos cozidos são colocados	16
2.2.3. Experiência 5 - Descasque e temperatura	17
2.2.4. Experiências 6 e 7 - Utilização de pré-salmoura	17
2.3. Metodologias de análise	19
2.3.1. Análises físico-químicas da salmoura	19
2.3.2. Análises microbiológicas	20
2.3.3. Análises organoléticas	21
3. Resultados e Discussão	22
3.1. Experiências 1, 2 e 3 - Avaliação do impacto da diminuição de sal e ácidos da salmoura nas características do ovo cozido	22
3.2. Experiência 4 - Avaliação da evolução do pH e condutividade de soluções contendo diferentes concentrações de sal na presença do ovo cozido	32
3.3. Experiência 5 - Avaliação do impacto da temperatura de arrefecimento do ovo e temperatura da salmoura nas características físico-químicas da salmoura na presença de ovo cozido	34
3.4. Experiências 6 e 7 - Avaliação do impacto de utilização de pré-salmouras nas características do ovo cozido	37
4. Conclusão	47
5. Referências	48

1. Enquadramento do trabalho de dissertação

O presente trabalho foi realizado em ambiente empresarial nas instalações da Derovo – Derivados de Ovos, S.A. em Pombal e teve como objetivo o estudo das bases científicas que permitirão a otimização da produção do ovo cozido conservado em salmoura.

1.1. A empresa Derovo

Derovo – Derivados de Ovos S.A. é uma empresa de fabrico de ovoprodutos com sede em Pombal e integra o Grupo Derovo, ao qual pertencem também as empresas DDO – Derivados de Ovos, Lda. (Pombal), Gemadouro – Produtores de Ovos, S.A. (Pombal) e Ovofoods, S.A. (Mieres, Astúrias). A ideia de produção de ovoprodutos surgiu em 1994, começando a produção em 1996 na fábrica de Pombal com o ovo líquido (ovo inteiro, gema e clara). Um ano após o início de produção, a Derovo passou a exportar os seus produtos para Espanha, onde em 2010 foi inaugurada a fábrica Ovofoods. Em 2002, o Grupo foi premiado como a Melhor Empresa de Ovoprodutos do Mundo e em 2008 foi reconhecida pelo Presidente da República ao receber o prémio PME Inovação Cotec BPI. Atualmente, o Grupo Derovo conta com cerca de 150 colaboradores empregados diretamente e uma vasta lista de produtos comercializados, tais como ovo líquido, ovo cozido, ovo em pó, ovo em *spray*, tortilhas, omeletes, pastas, complementos (recheios, cremes, geleias, *toppings*, etc...), natas e *Fullprotein*. O grupo, e mais especificamente a Derovo, apresenta 3 certificações no âmbito da Qualidade, Ambiente e Segurança Alimentar: ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 e BRC, bem como todo o plano de HACCP (Derovo, n.d.).

Por ser um dos alimentos com melhor relação custo/benefício, a indústria procura formas de poder comercializar ovo cozido de forma a ser de rápido consumo, surgindo os ovos cozidos e descascados em salmoura. Este produto, tal como indica, consiste na cozedura de ovos, o seu descasque e a colocação em solução conservante. Para garantir um produto de qualidade, é necessário limpar as máquinas com regularidade e verificar o grau de limpeza, sendo desta forma que se inicia a produção. O processo continua com o carregamento e posterior cozedura do ovo por forma a garantir a sua total cozedura, mas de modo a não possuir um halo verde à volta da gema, devido um excesso de cozimento. Depois de cozidos, os ovos são arrefecidos, descascados, separados da casca e selecionados por um operador. Esta etapa tem como função separar os ovos intactos dos imperfeitos, retirando estes últimos. Os ovos que não apresentem defeitos, seguem para a contadora, que coloca a quantidade de ovos pretendida dentro de cada balde, onde

posteriormente lhe irá ser adicionada uma quantidade pré-definida de salmoura. Por fim, o operador de final de linha coloca a tampa no balde e, por sua vez, o balde na paleta. No final da produção de cada paleta, esta é colocada numa câmara frigorífica com temperaturas entre os 0 °C e os 4 °C e possui um prazo de validade de 60 dias. Para além da versão do produto apresentado na Figura 1, a Derovo também comercializa outras versões com 24, 40 e 140 unidades.



Figura 1 – Ovos cozidos comercializado pela Derovo, correspondente à versão com 70 unidades.

Como controlo da qualidade e segurança alimentar, os ovos cozidos, à semelhança do que acontece com todos os outros produtos na Derovo, são periodicamente analisados a nível microbiológico, físico-químico e organolético, de modo a garantir a qualidade dos produtos.

1.2. Ovo de galinha

1.2.1. Ovo de galinha cru

Os ovos são produzidos por aves fêmeas e usualmente consumidos pelos humanos, sendo os ovos de galinha os mais conhecidos e consumidos em todo o mundo e produzidos pela espécie *Gallus gallus*. Tanto a nível de produção como de consumo de ovos no mundo, a Ásia e a América são os líderes (Ritchie, 2017). Em Portugal, em 2018, produziram-se mais 1,1% de ovos relativamente ao ano anterior (Instituto Nacional de Estatística, 2019). Já o consumo *per capita* aumentou em quase 15% nos últimos 5 anos, atingindo um consumo de 11 kg de ovo por habitante em 2019 (Instituto Nacional de Estatística, 2019).

O ovo é constituído pela casca, membrana, clara e gema e cuja estrutura detalhada se pode observar na Figura 2. A formação de cada uma destas partes acontece progressivamente desde o ovário da galinha até à cloaca: inicialmente existe apenas

gema, no ovário da galinha; após ovulação, a clara vai-se juntando ao longo do oviduto; perto da postura, forma-se a membrana e, posteriormente, a casca (Chambers et al., 2017).

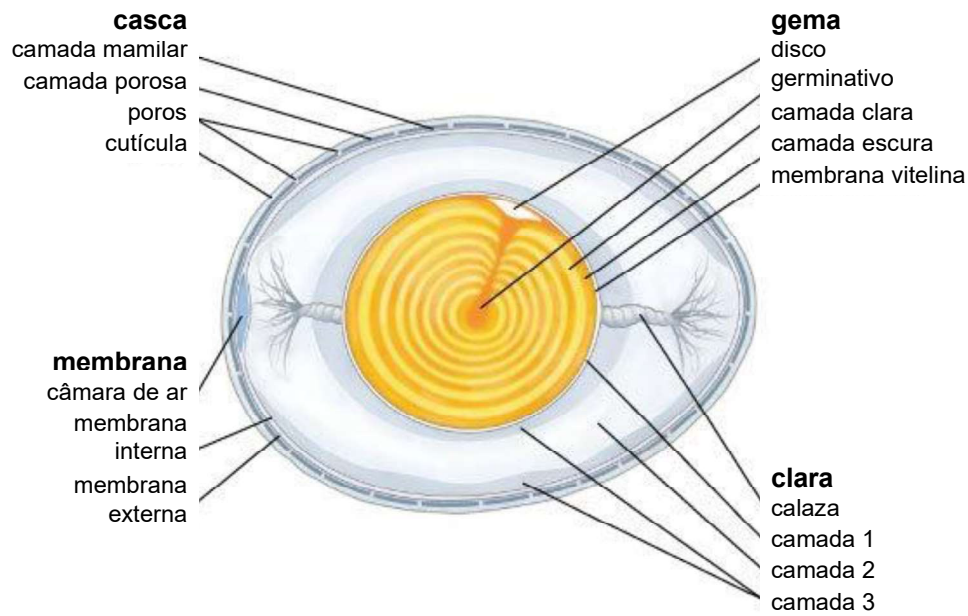


Figura 2 - Constituição do ovo por camadas e as respectivas subdivisões (adaptado de The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2019).

A casca é constituída maioritariamente por carbonato de cálcio, possui poros e é semipermeável, permitindo a passagem de ar e água. As membranas permitem a organização do ovo e são constituídas por polissacarídeos, mais especificamente fibra estrutural, e por proteínas, mais concretamente queratina. A membrana localizada entre a casca e a clara permite também que bactérias não contaminem o interior do ovo. A calaza é um filamento que se dispõe na horizontal que permite a centralização da gema (Chambers et al., 2017)(William J. Stadelman & Cotterill, 1995).

Apesar de o ovo ser constituído por casca, esta parte do alimento não é edível e é retirada juntamente com as membranas, não sendo utilizado para alimentação humana. Assim, apenas se considera comestível a gema e a clara, correspondente a cerca de 88% do ovo (Instituto Nacional de Saúde, n.d.-b). A clara e a gema juntas contêm 76% de água, e os restantes 24% em sólidos repartem-se por essencialmente proteínas e lípidos, uma menor quantidade, mas significativa, em vitaminas e minerais e uma pequena quantidade em hidratos de carbono (William J. Stadelman & Cotterill, 1995). Apesar de não ser comestível, a casca tem um papel essencial na preservação do ovo, impedindo a entrada de microrganismos para o interior. Esta proteção é levada a cabo por proteínas

constituintes da casca, fazendo parte da sua fração orgânica (Aygün, 2017). Da matriz proteica da casca faz parte um conjunto de proteínas como ovalbumina, lisozima, ovotransferrina, clusterina, várias ovoidalixinas e várias ovoidalixinas, organizadas por camadas na casca do ovo, como se pode observar na Figura 3.

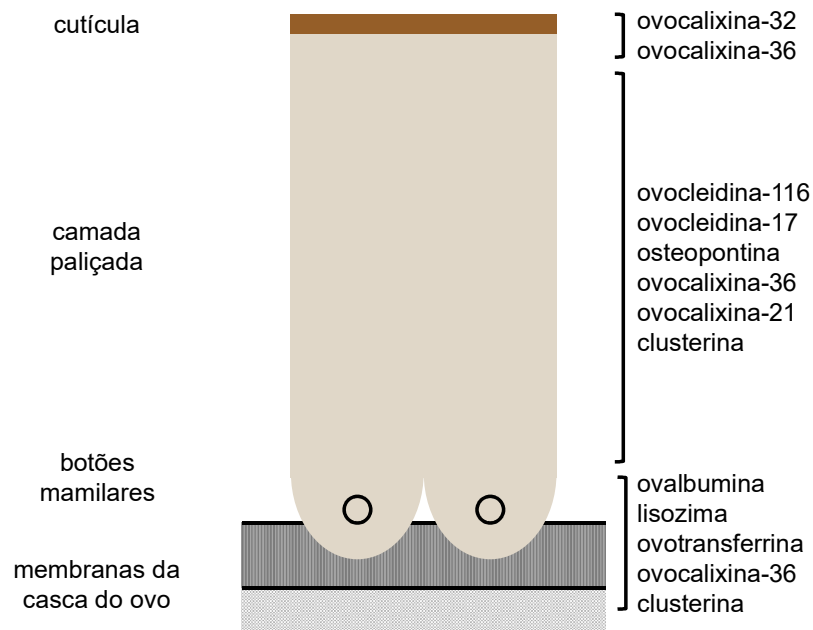


Figura 3 – Constituição da casca por camadas e as respectivas proteínas existentes (baseado em Aygün, 2017).

À semelhança da casca, também a clara possui grande parte da sua constituição em proteínas. Possui cerca de 85% de água e 90% da matéria sólida são proteínas, sendo as mais abundantes a ovalbumina, ovotransferrina, ovomucóide, ovomucina, lisozima e globulinas, representando 92% do total de proteínas (William J. Stadelman & Cotterill, 1995). A principal função destas proteínas é providenciar nutrientes ao embrião e protegê-lo de invasões microbianas, atuando esta última através de três principais mecanismos: lise celular, através da rotura da parede celular; sequestração de nutrientes essenciais, como vitaminas ou minerais; e inibição de enzimas microbianas. A lisozima foi a primeira molécula identificada como bactericida, a primeira proteína a ser sequenciada e possui uma das estruturas tridimensionais mais bem conhecidas (Guyot et al., 2013; Leśnierowski & Kijowski, 2007). Esta proteína existe em vários biofluidos, secreções e tecidos, mas é no ovo que existe em maior concentração, 2500 a 3500 µg/mL, representando cerca de 3,5% do total das proteínas da clara de ovo. Esta proteína também é conhecida como muramidase, pois a sua principal função enzimática é a de hidrolisar ligações glicosídicas β 1-4 entre a N-acetilglucosamina e o ácido N-

acetilmurâmico. Estes polissacarídeos são constituintes de paredes celulares de várias células microbianas, principalmente das Gram-positivas, cujas paredes celulares são constituídas essencialmente por peptidoglicanos, como se pode verificar na Figura 4. Já as bactérias Gram-negativas, possuem uma maior complexidade nas suas paredes celulares, apresentando uma camada de lipoproteínas, lipopolissacarídeos e lípidos a cobrir a camada de peptidoglicanos, impedindo a ação da lisozima (Leśnierowski & Kijowski, 2007). As paredes celulares determinam a forma da célula e protegem-na da lise celular. Sem este constituinte da célula ou quando este é atacado pela lisozima, a célula incha e rebenta. Ainda assim, vários estudos já mostraram que existe atividade antimicrobiana não-enzimática por parte da lisozima, devido a partes da sua estrutura primária ou à sua polimerização, alcançando a inativação de bactérias Gram-negativas (Cegielska-Radziejewska et al., 2009; Mine et al., 2004). A ovotransferrina, segunda proteína mais abundante no ovo, contribui para 13% do total de proteínas na clara de ovo. Esta proteína pertence à família das transferrinas, assim como a lactotransferrina e a transferrina sanguínea, tendo como principal função quelar metais, mais frequentemente o ferro. É esta capacidade de ligar a metais que torna esta proteína antimicrobiana. Podendo ligar-se a duas moléculas de ferro, promove um microambiente deficiente em ferro para as bactérias, diminuindo o seu crescimento uma vez que o ferro é essencial em vários mecanismos bioquímicos, como por exemplo, na fosforilação oxidativa, mecanismo básico para obtenção de ATP (Abeyrathne & Ahn, 2017). Para além desta função, esta proteína ainda tem a capacidade de se ligar diretamente às paredes e membranas celulares, quer de bactérias Gram-positivas, como de Gram-negativas, destruindo as suas estruturas e, conseqüentemente, matando as células (Ma et al., 2020). A ovomucóide, ovoinibidor e ovalbumina são proteínas que integram a família serpinas, um conjunto de proteínas com capacidade inibitória para proteases, como a tripsina, quimotripsina e elastase, função presente nas duas primeiras (Guyot et al., 2013; Rose-Martel & Hincke, 2017). Ao contrário da maioria das proteínas que fazem parte deste grupo, a ovalbumina não apresenta atividade de inibição de proteases. A sua principal função é providenciar nutrientes para o crescimento do embrião, sendo também a proteína mais abundante na clara do ovo, representando mais de metade das proteínas. (Réhault-Godbert et al., 2013). Já a ovomucina, é outra das proteínas constituintes da clara de ovo, que representa apenas 3,5% do total de proteínas da clara, mas é suficiente para lhe dar a consistência viscosa e espumosa característica da clara, devido a ligações com outras proteínas como a lisozima e a globulina através de carboidratos das cadeias laterais da ovomucina. A sua zona hidrofóbica ajuda na emulsificação de todas as

proteínas da clara (Omana et al., 2010).

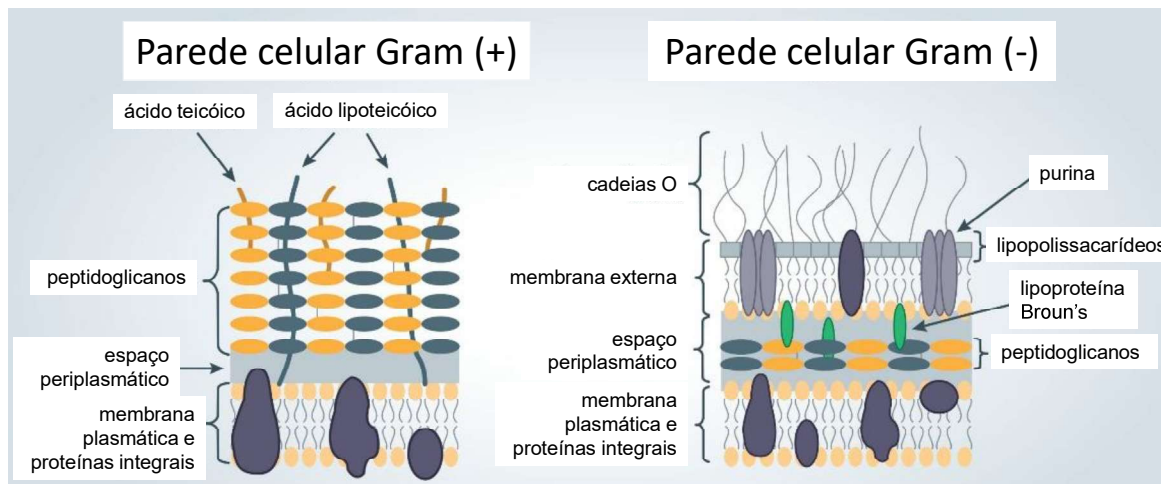


Figura 4 – Esquematização da constituição da parede celular das bactérias Gram-positivas e das Gram-negativas (adaptado de Steward, 2019).

Os ovos de galinha geralmente, aquando da postura, são livres de microrganismos. A contaminação da casca dos ovos dá-se após a postura através do solo, poeira e fezes, e o seu nível de crescimento depende de muitos fatores, como higiene, temperatura e humidade. Assim, os organismos que mais frequentemente contaminam o ovo fazem parte dos géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Arthrobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus*. Ainda assim, as que mais implicações trazem para a saúde humana são os géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus* e *Escherichia* (Aygün, 2017).

1.2.2. Ovo de galinha cozido

Apesar de, por vezes, o ovo ser consumido cru, o seu consumo é maioritário na forma cozinhada, quer sejam mexidos, em omelete, cozidos, entre outros. À semelhança de outros alimentos, o ovo é cozinhado por forma a aumentar a sua digestibilidade, nomeadamente das suas proteínas, e para melhorar as suas propriedades organoléticas. Qualquer uma destas formas de cozinhar este alimento provoca alterações na sua composição química e, conseqüentemente, alterações nutricionais. A cozedura é a forma de ovo ser cozinhado que acarreta menores perdas nutricionais. Ainda assim, o ovo inteiro cozido não é exceção às outras formas de processamento, perdendo alguns nutrientes, como se pode observar na Tabela 1. Apesar das perdas, este processamento aumenta a capacidade de absorção por parte do organismo humano de alguns

nutrientes, como por exemplo de proteínas e de ferro (Bedogni & Battistini, 2002; Evenepoel et al., 1999). Quando se processa o ovo a temperaturas muito elevadas, maiores concentrações de ferro são absorvidas, podendo ainda ser maiores quando, juntamente com o ferro, é ingerido ácido ascórbico, que promove absorção que ultrapassa concentrações existentes em suplementos de ferro (Miller & Nnanna, 1983).

Observando e analisando a Tabela 1, com o processo de cozedura, é logo perceptível que os únicos nutrientes que se vêm diminuídos com o processo de cozedura são as vitaminas. Dentro das vitaminas, estas podem ser classificadas como hidrossolúveis ou lipossolúveis, consoante se dissolvam mais facilmente em água ou em lípidos respetivamente. De acordo com esta classificação, é de notar que as vitaminas hidrossolúveis são as que mais se perdem com a cozedura do ovo, com exceção da vitamina B6. Já as restantes mencionadas na Tabela 1, a tiamina é a vitamina que menos se perde com a cozedura do ovo e a vitamina B12 a que diminuí mais concentração após cozedura. Relativamente às vitaminas lipossolúveis, é retratado que existe uma diminuição da concentração de vitamina A com a cozedura do ovo, o mesmo não acontecendo nas restantes apresentadas, podendo dever-se ao facto de esta vitamina poder estar sob a forma de pró-vitamina e estar aglomerada com carotenóides da gema e assim tornar-se solúvel em água e a sua quantidade diminuir durante a cozedura do ovo.

Tal como verificado na Tabela 1 relativamente aos macronutrientes e minerais, a cozedura do ovo não provoca alterações na concentração nestes nutrientes (Bedogni & Battistini, 2002). Também os carotenóides são afetados pelo processamento do ovo, sendo a luteína e a zeaxantina da gema os carotenóides mais abundantes e também os mais afetados pelo cozimento, podendo perder até cerca de 15% (Nimalaratne et al., 2016). No caso da cozedura, devido às elevadas temperaturas, estes compostos podem isomerizar, diminuindo a sua bioatividade, degradar-se irreversivelmente e também podem libertar compostos voláteis (Nimalaratne et al., 2016).

Tabela 1 – Avaliação da diferença entre nutrientes por 100 g de ovo cru e 100 g de ovo cozido (Instituto Nacional de Saúde, n.d.-b) (Instituto Nacional de Saúde, n.d.-a).

Nutrientes		Quantidade		Diferença do ovo depois de cozido (%)	
		Por 100 g de ovo cru	Por 100 g de ovo cozido		
Água		75,3 g	75,3 g	0	
Proteínas		13 g	13 g	0	
Lípidos	Totais	10,8 g	10,8 g	0	
	Saturados	2,7 g	2,7 g	0	
	Insaturados	totais	7,9 g	7,9 g	0
		mono	3,9 g	3,9 g	0
	poli	4,0 g	4,0 g	0	
Hidratos de carbono	Totais	0 g	0 g	0	
	Açúcares	0 g	0 g	0	
Colesterol		408 mg	408 mg	0	
Minerais	Cálcio	44 mg	44 mg	0	
	Ferro	2,1 mg	2,1 mg	0	
	Magnésio	11 mg	11 mg	0	
	Fósforo	184 mg	185 mg	≈ 0	
	Potássio	130 mg	130 mg	0	
	Sódio	140 mg	140 mg	0	
	Zinco	1,3 mg	1,3 mg	0	
Vitaminas Hidrossolúveis	Tiamina	0,07 mg	0,06 mg	- 14	
	Riboflavina	0,44 mg	0,35 mg	- 21	
	Niacina	0,04 mg	0,03 mg	- 25	
	Vitamina B6	0,36 mg	0,36 mg	0	
	Folato	50 µg	40 µg	- 20	
	Vitamina B12	1 µg	0,5 µg	- 50	
Vitaminas Lipossolúveis	Vitamina A	190 µg	170 µg	- 11	
	Vitamina E	2,3 mg	2,3 mg	0	
	Vitamina D	1,7 µg	1,7 µg	0	

Na perspetiva da saúde, os ovos trazem vários benefícios para o ser humano: a luteína e a zeaxantina estão associadas à função neuronal da retina, promovendo o melhoramento do tempo de reação visual (Bovier et al., 2014); o seu teor elevado em proteína e lípidos, e baixo em hidratos de carbono está ligado à redução do apetite e possível ajuda na prevenção da obesidade (Ratliff et al., 2010); a grande quantidade em proteínas da clara do ovo já foi reportada como responsável pela redução dos níveis séricos de colesterol (Matsuoka et al., 2008); e a presença de colina torna o ovo um excelente aliado da memória, anti-inflamatório e diminuí o risco de cancro da mama, não afetando a concentração plasmática de óxido de trimetilamina, composto associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (Zeisel & Costa, 2009; Zhu et al., 2020).

Devido a possíveis contaminações que podem ocorrer no ovo após a postura, em Portugal foram estabelecidas normas no que concerne à presença de microrganismos em ovoprodutos, onde se inserem os ovos cozidos. De acordo com o Regulamento (CE) N.º 2073/2005, os ovoprodutos têm de ser ausentes de *Salmonella* em 25 g e o teor em *Enterobacteriaceae* não pode ser superior a 10^2 UFC/g no final do processo de fabrico do produto. O ovo cozido também se insere na categoria de produtos prontos para consumo, pelo que este regulamento também obriga à ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de alimento. Para além disso, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, recomenda ainda que, para alimentos totalmente cozinhados e manuseados após o tratamento térmico serem satisfatórios do ponto de vista de segurança alimentar, no qual se insere o ovo cozido, não devem apresentar mais do que 10^4 UFC/g de Mesófilos a 30 °C, nem deve ter presente *Escherichia coli* ou esta ser inferior a 10 UFC/g no alimento pronto para consumo (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2019). Tendo em conta o valor satisfatório, a Derovo colocou o limite máximo de 2×10^3 UFC/g para Mesófilos a 30 °C.

1.3. Salmoura como meio de conservação de alimentos

A salmoura é o líquido conservante que é adicionado aos ovos cozidos com o objetivo de aumentar o seu tempo de vida útil. Segundo a literatura, esta solução é constituída por 0,5 % a 1,0 % de ácido cítrico e por 0,1 % de benzoato de sódio, num rácio solução/ovos de 1:2, sendo posteriormente armazenados sob refrigeração (Fischer et al., 1985).

1.3.1. Sais

Desde o início do processamento dos alimentos que se utiliza o sal como método de conservação, sendo o conservante mais antigo. A salga dos alimentos consiste em tornar

o meio onde se encontram os alimentos, e potencialmente os microrganismos, num meio hipertônico, promovendo assim a saída de água das células por forma a encontrarem o equilíbrio osmótico, como representado na Figura 5. Para restabelecer o crescimento, as células terão de concentrar alguns solutos, necessitando de ATP para esse processo, reduzindo a energia disponível necessária ao seu crescimento (Montville et al., 2012). Apesar de existir esta troca de água, a adição de sal não provoca a rigidez do ovo cozido e descascado em salmoura, sendo que a ternura não sofre diferenças significativas com a adição do sal à formulação da salmoura (W J Stadelman & Rhorer, 1984).

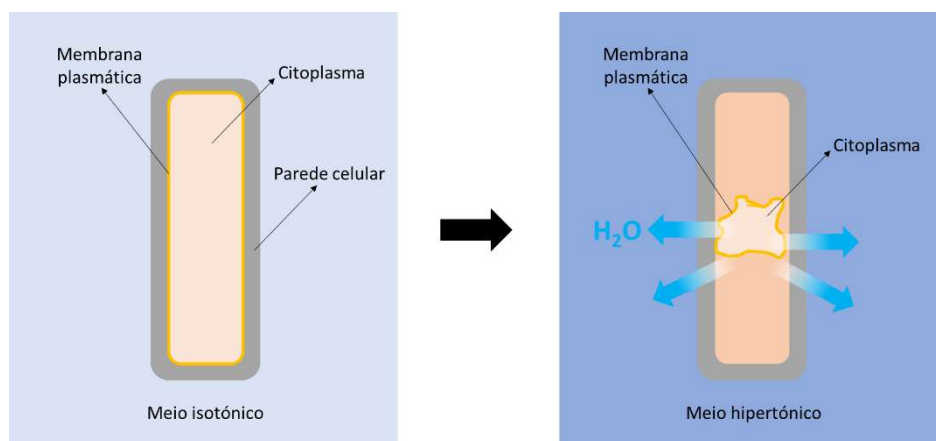


Figura 5 – Representação da alteração celular quando em solução hipertônica.

O sal mais comumente utilizado nos alimentos é o NaCl, enaltecendo e acentuando o sabor dos alimentos. Atualmente, a ingestão de sal é um problema a nível mundial. O excesso de consumo de sal, juntamente com o déficit de ingestão de potássio (menos de 3,5 g por dia) aumenta o risco de doenças cardíacas. Os estados membros da Organização Mundial de Saúde já acordaram em diminuir a ingestão de sal em 30% até 2025, visto, em média, o consumo de sal atual ser o dobro do recomendado, aconselhando-se ao consumo de até 5 g de sal por dia, o que corresponde a menos de 2 g de sódio (World Health Organization, 2020). Devido simultaneamente ao excesso de consumo de NaCl e ao déficit de ingestão de potássio, estudam-se alternativas de substituição do sal tradicional. As alternativas mais comuns são a substituição parcial de cloreto de sódio por outro sal clorado, não contribuindo para o consumo de sódio. Existem várias alternativas, como o cloreto de potássio, o cloreto de magnésio ou o cloreto de cálcio. No caso do ovo cozido, sabendo que o sabor salgado aumenta durante o tempo de armazenamento em salmoura, pensa-se que o sal migre para o interior do ovo e que, paralelamente, perca água por osmose. Também a gema sofre alterações provocadas pela migração do sal, nomeadamente nos grânulos lipídicos existentes na

gema do ovo. Essas alterações passam principalmente pela desorganização desses grânulos, com a saída de alguns dos seus constituintes como fosfolípidos e proteínas, que se irão orientar de forma diferente, originando grânulos maiores e mais desorganizados, promovendo a gelatinização da gema (Xu et al., 2019), como se pode ver na Figura 6.

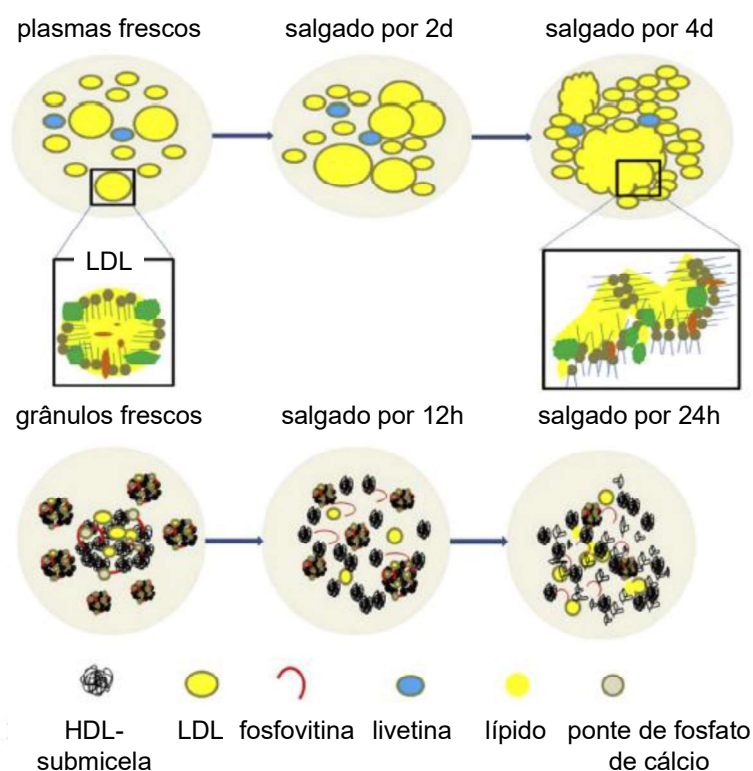


Figura 6 – Esquemática da alteração dos grânulos da gema de ovo com a adição de sal (adaptado de Xu et al., 2019).

Apesar de já ser utilizado como substituto do sal tradicional, o cloreto de potássio pode conferir ao produto final um sabor metalizado. Apesar de não existirem dados sobre a alteração do ovo cozido em salmoura, já foi reportado em azeitonas de conservas que a substituição de NaCl por KCl revelou sabor metálico nas amostras onde houve substituição de 75%, o mesmo resultado não se observou com a substituição de apenas 50% (Ambra et al., 2016).

Também o benzoato de sódio é comumente adicionado às formulações de salmoura numa concentração em cerca de 0,1% para evitar o crescimento de fungos (Fischer et al., 1985). Tendo este composto o ião sódio, rapidamente se torna numa solução pouco viável se o objetivo for diminuir o teor em sódio de um determinado alimento.

1.3.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos são também uma estratégia antiga de conservação de alimentos contra a contaminação e disseminação microbiana. Os ácidos orgânicos, dependendo do meio a que são adicionados e do estado fisiológico do microrganismo presente, podem atuar como bacteriostáticos e bactericidas. Quer isto dizer que alguns ácidos apenas impedem os microrganismos de proliferar e outros têm a capacidade de inviabilizar os microrganismos (Ricke, 2003). Todos os mecanismos de ação contra microrganismos levados a cabo pelos ácidos ainda não são conhecidos, sendo que existem inúmeros mecanismos, pois estes dependem do organismo e da fase de crescimento em que se encontra, bem como da fórmula química do ácido a ser utilizado. No geral, o que o ácido promove é o gasto de energia por parte da célula para manter o pH neutro. Para poder exercer o seu efeito na célula microbiana tem de entrar no citoplasma, e para poder atravessar a membrana, tem de estar na forma protonada, o que só acontece abaixo do pK_a do ácido. Uma vez dentro da célula, devido à presença de pH neutro, o ácido dissocia-se, libertando iões H^+ para o meio, que irão tornar o meio intracelular mais ácido. Desta forma, existe uma alteração de gradiente transmembranar, ativando e inibindo reações dependentes de energia, Figura 7. Esta mudança de acidez ainda pode resultar na protonação e desprotonação de proteínas, levando à alteração da sua estrutura e, conseqüentemente, à perda de função. Isto leva a que o microrganismo passe a gastar energia em tentar manter o pH neutro no interior da célula, não gastando energia para proliferar, produzir toxinas ou resistir a temperaturas adversas (Montville et al., 2012).

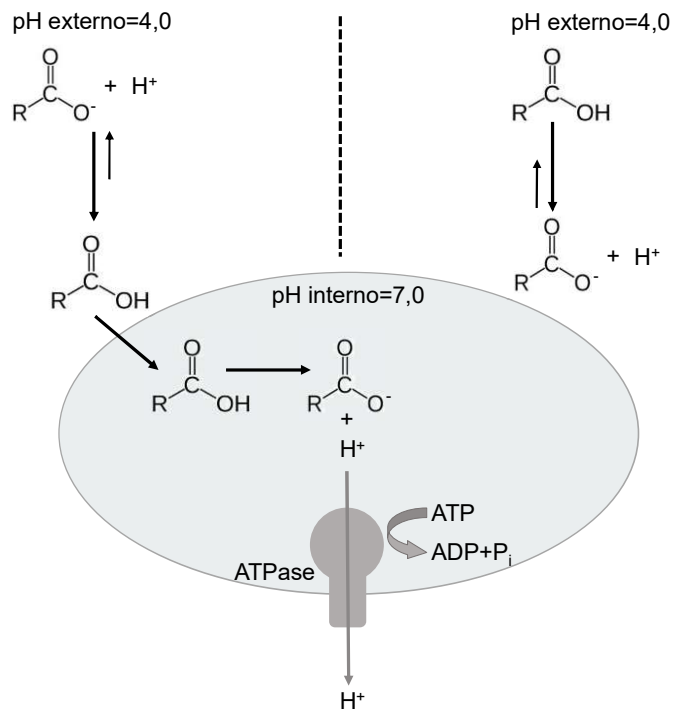


Figura 7 – Esquemática do mecanismo de ação dos ácidos orgânicos em microrganismos. Promoção de gasto de energia, não a usando para sobreviver em condições adversas (baseado em Montville et al., 2012).

Os ácidos mais utilizados como acidificante são o acético, láctico, cítrico e málico (Derossi et al., 2011). O pK_a é o fator determinante para o efeito do ácido nas células microbianas.

Um dos principais ingredientes de uma salmoura é o ácido. Pode ser adicionado só um ou vários, mas o motivo pelo qual são adicionados é o mesmo: diminuir o pH e manter a salmoura estável microbiologicamente. Ainda assim, como cada ácido tem maior impacto num grupo específico de microrganismos, é mais útil usar vários ácidos do que usar apenas um, mesmo que o pH final seja o mesmo (Lucera et al., 2012). Para além disso, soluções ácidas com o mesmo pH, mas acidificadas com ácidos diferentes, irão provocar diferentes alterações de pH no alimento. Usando ácido acético, o pH do alimento no final irá ser maior do que quando é utilizado ácido cítrico (Derossi et al., 2011).

Para além de proteger os ovos contra possíveis contaminações aquando da produção, esta solução pode também proteger os ovos contra possíveis recontaminações, e para isso, é determinante o valor do pH após a sua estabilização em contacto com os ovos. Salmouras com concentrações em ácido cítrico de 0,5%, 0,75% e 1,0% são eficazes contra a contaminação microbiana que possa existir no ovo. Já se existir recontaminação após produção, não existe sobrevivência de microrganismos

quando a contaminação se dá na ordem das 10 células, mas quando este número sobe para as 1×10^4 células, a salmoura permite a sobrevivência dos microrganismos quando a concentração é de 0,75% e 1,0% de ácido cítrico e permite a proliferação quando a concentração de ácido cítrico é de 0,5%. A temperatura de armazenamento dos ovos cozidos em salmoura após produção e após recontaminação não é relevante para a preservação do produto (Fischer et al., 1985).

Apesar de ser eficaz na proteção de produtos alimentares, uma grande desvantagem da utilização de ácidos são as mudanças organolépticas desses produtos, principalmente a nível de sabor e textura. Ainda assim, nem todos os ácidos conferem a mesma intensidade nem o mesmo tipo de sabor. O ácido acético e o cítrico são os que mais alterações induzem nos alimentos com a sua utilização. Já o láctico e a glucona δ -lactona (GDL, éster cíclico do ácido glucónico) são os que menos modificam o sabor do produto (Derossi et al., 2011). Mais uma vez, não existindo dados em ovo cozido, em cogumelos, a adição de GDL à salmoura, em comparação com o ácido cítrico, resulta na diminuição do sabor ácido e não provoca nenhuma alteração à cor do produto (Rodrigo et al., 1999). Por conferir um sabor característico, são os ácidos o que a indústria procura diminuir ou substituir por outros compostos conservantes. A diminuição de 2% para 1% de ácido acético e simultaneamente a adição de 2% trifosfato de sódio ou de 1% de lactose, melhora a ternura dos ovos cozidos e o sabor, tanto da clara como da gema (W J Stadelman & Rhorer, 1984).

1.4. Objetivos da dissertação

A presente dissertação teve como objetivos o estudo das interações entre o ovo cozido descascado e a salmoura ao longo do seu tempo de vida. Permitiu avaliar o impacto dos ingredientes e suas concentrações da salmoura nas características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas dos ovos, com vista a otimizar este produto.

2. Procedimentos Experimentais

2.1. Amostras

Para os vários ensaios realizados, foram utilizados ovos de galinha frescos, com clara viscosa, bem cascados, de tamanho M, armazenados entre 10 °C e 20 °C, e provenientes de vários produtores da região centro de Portugal e também de Espanha. A salmoura utilizada como referência foi uma salmoura teste realizada na Derovo para este trabalho, que foi constituída por sal e ácidos e não continha conservantes, tendo sido utilizado cloreto de sódio e dois ácidos diferentes (ácido 1 e ácido 2) para preparar todas as salmouras.

2.2. Experiências realizadas para avaliar o impacto da salmoura nas características do ovo cozido

2.2.1. Experiências 1, 2 e 3 - Diminuição de sal e ácidos da salmoura

Para avaliar o impacto da diminuição de sal e ácidos da salmoura nas características dos ovos, foram preparadas 3 salmouras tendo como referência a salmoura teste realizada para este trabalho (R) para a conservação do ovo cozido. Para a preparação da salmoura com menos sal, foi realizada uma primeira experiência em que todos os ingredientes foram utilizados na mesma concentração da salmoura referência exceto a concentração do sal, que foi reduzida (S1). O mesmo princípio foi utilizado para a preparação da salmoura com menor concentração em ácido 1 (S2) e da salmoura sem ácido 2 (S3). Depois de preparadas, as salmouras foram mantidas entre 4 °C e 6 °C até serem adicionadas aos ovos cozidos. Cada ensaio foi realizado em baldes contendo 24 ovos cozidos, obtidos na unidade de produção da Derovo, utilizando 950 g de salmoura, num total de 28 baldes. Após cheios com salmoura, os baldes foram fechados e colocados numa câmara a 4 °C até serem utilizados para análise. Um balde foi utilizado para medir as propriedades físico-químicas da salmoura e 6 baldes foram utilizados para controlar a microbiologia ao longo do tempo, servindo também para a realização das provas organoléticas.

Uma segunda experiência foi realizada variando somente a concentração de sal em relação à composição da salmoura referência. Foram preparadas 3 novas salmouras com diferentes reduções de sal, sendo a primeira redução de sal a menor relativamente à salmoura referência (S4), a segunda redução de sal intermédia igual à redução da experiência anterior (S1) e a terceira redução de sal sendo a maior redução (S5). Como referência, foi utilizada a salmoura teste realizada para este trabalho, num total de 28 baldes, utilizando os procedimentos descritos no parágrafo anterior.

Uma terceira experiência foi realizada utilizando uma nova salmoura S5, uma salmoura contendo redução do ácido 1 e a quantidade de sal em S5 relativamente à salmoura referência (S6) e uma salmoura contendo redução do ácido 2 e a quantidade de sal em relativamente à salmoura referência (S7). Como referência, foi utilizada a salmoura teste realizada para este trabalho. Foram utilizados 28 baldes no total.

2.2.2. Experiência 4 - pH e condutividade das soluções aquosas em que os ovos cozidos são colocados

Por forma a avaliar as alterações da variação de pH e condutividade das soluções aquosas em que os ovos cozidos são colocados, ovos foram colocados em água a 100 °C durante 15 minutos e arrefecidos numa tina com água a 15 °C durante 15 minutos, tendo sido estas as condições que se consideraram mais adequadas para o cozimento dos ovos em laboratório. Posteriormente, foram descascados e colocados em diferentes soluções aquosas. Um dos ensaios foi realizado em água (água), outro em água contendo sal na mesma concentração em que é utilizado na salmoura referência (sal) e outro em água contendo sal no dobro da concentração da salmoura referência (2sal). Como referência, foi utilizada a salmoura teste realizada para este trabalho (referência) (Figura 8). Cada ensaio foi realizado em porta-amostras de 150 mL contendo 1 ovo cozido, utilizando 60 g de solução aquosa, num total de 8 porta-amostras. Os porta-amostras com os ovos foram fechados e colocados a 4 °C até serem utilizados para análise.

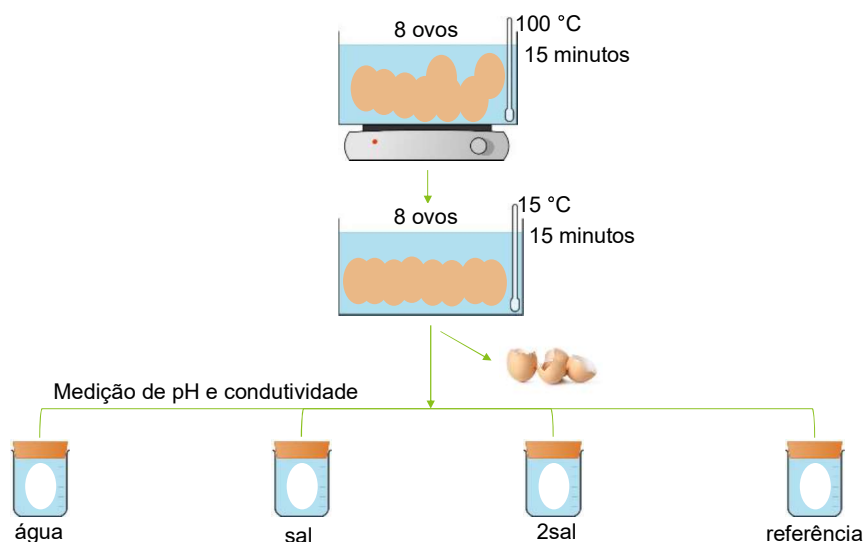


Figura 8 – Esquema de realização da experiência 4 - Avaliação da evolução do pH e condutividade de soluções contendo diferentes concentrações de sal na presença do ovo cozido.

2.2.3. Experiência 5 - Descasque e temperatura

Para avaliar a influência do descasque do ovo cozido e da temperatura de arrefecimento e da salmoura nas características físico-químicas da salmoura, no laboratório foram cozidos ovos em água a 100 °C durante 15 minutos. Metade dos ovos cozidos foram colocados numa tina com água a 15 °C a arrefecer durante 15 minutos e a outra metade dos ovos cozidos foram descascados. Dos ovos descascados, metade foram arrefecidos em água fria, a 15 °C (dAFSF) e os restantes arrefecidos em água quente, a 35 °C (dAQSF), todos durante 15 minutos, tendo sido posteriormente todos colocados em salmoura referência a 15 °C. Os ovos que tinham sido colocados numa tina com água a 15 °C, ainda com casca, foram descascados e colocados metade em salmoura fria, a 15 °C (cAFSF), e metade em salmoura quente, a 35 °C (cAFSQ) (Figura 9). Cada ensaio foi realizado em porta-amostras de 150 mL contendo 1 ovo cozido, utilizando 60 g de salmoura, num total de 8 porta-amostras. Os porta-amostras com os ovos foram fechados e colocados a 4 °C até serem utilizados para análise.

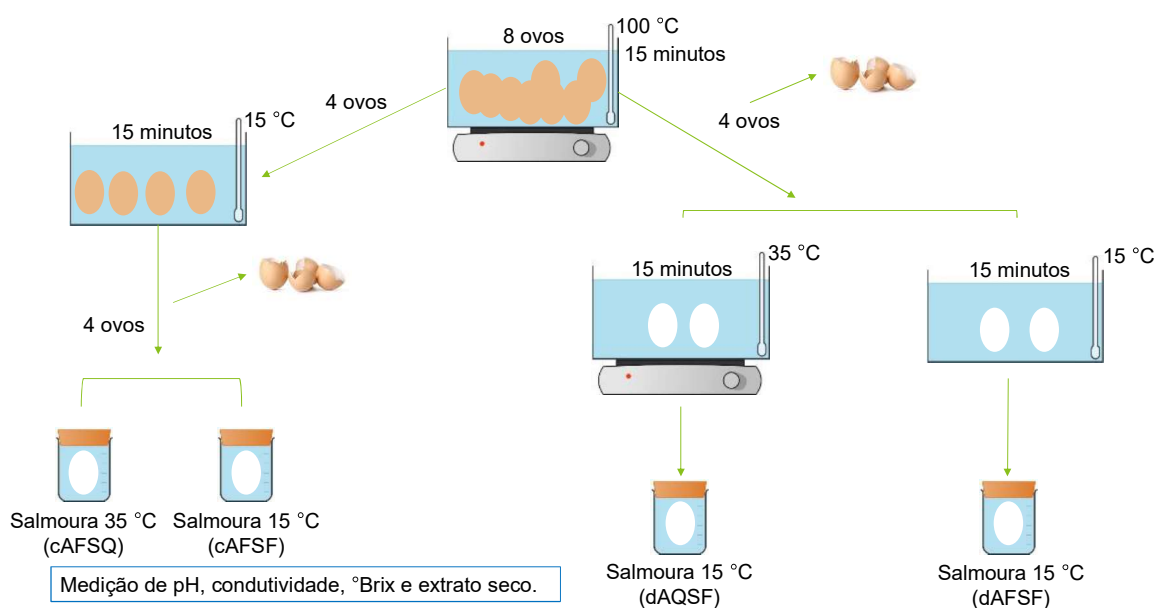


Figura 9 – Esquema de realização da experiência 5 – Avaliação do impacto da temperatura de arrefecimento do ovo e temperatura da salmoura nas características físico-químicas da salmoura na presença de ovo cozido.

2.2.4. Experiências 6 e 7 - Utilização de pré-salmoura

De forma a avaliar o impacto no ovo cozido da utilização de pré-salmoura, a cada conjunto de 4 baldes contendo 24 ovos cozidos, obtidos na unidade de produção da Derovo, foi realizada uma primeira experiência em que foram adicionados 950 g de

diferentes soluções aquosas, uma contendo uma salmoura com redução do ácido 1 e a quantidade de sal em S5 (salmoura S6) em relação à salmoura referência (M), outra sendo a salmoura referência (R) e aos outros 2 conjuntos foi adicionada água (A). Os baldes foram fechados e colocados a 4 °C até serem utilizados. Passadas 2 horas, as soluções aquosas foram descartadas, tendo sido adicionados 950 g de salmoura S6 a um ensaio A (AM) e ao ensaio M (MM) e salmoura referência ao outro ensaio A (AR) e ao ensaio R (RR) (Figura 10). Os baldes foram fechados e colocados a 4 °C até serem utilizados para análise.

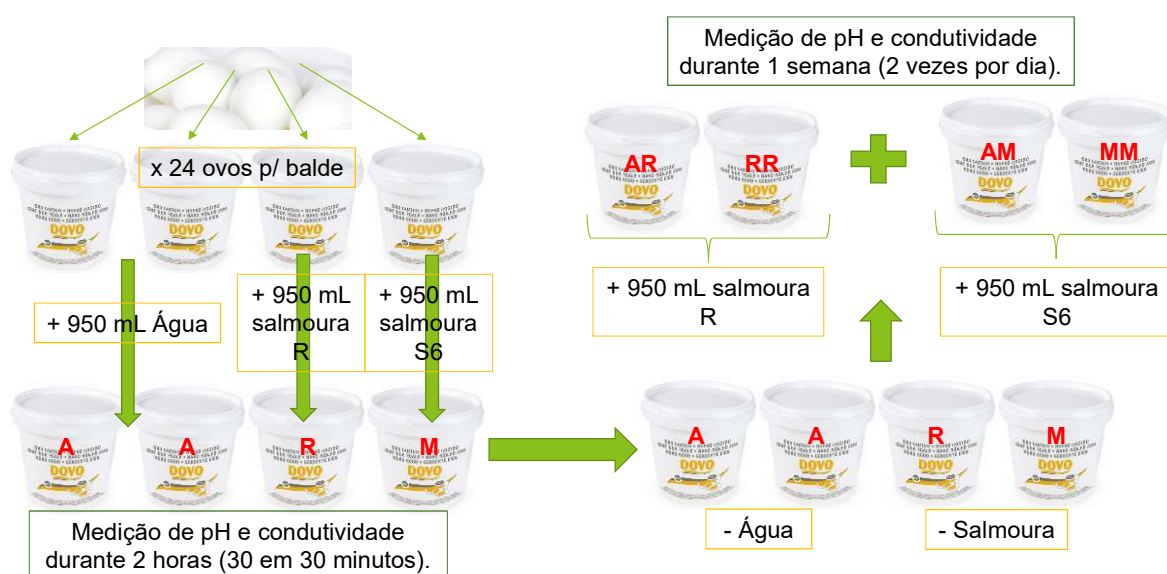


Figura 10 – Esquema de realização da experiência 6 – Avaliação do impacto de utilização de 1 pré-lavagem com soluções aquosas de diferentes composições nas características físico-químicas da salmoura.

Numa segunda experiência, foram utilizados em todos os ensaios 950 g de salmoura referência (R) como primeira pré-salmoura, em baldes contendo 24 ovos cozidos, obtidos na unidade de produção da Derovo, num total de 8 baldes. Passadas 2 horas, a salmoura foi descartada em 6 baldes, tendo sido adicionados 950 g de nova salmoura R a 4 baldes (R2) e nova salmoura S6 a 2 baldes (RM). Passadas 2 horas, a salmoura é novamente descartada nos baldes R2, tendo sido adicionados 950 g de salmoura R a 2 deles (R3) e aos outros 2 foi adicionada nova salmoura S6 (R2M) (Figura 11). De cada ensaio, 1 balde foi utilizado para medir as propriedades físico-químicas da salmoura e 1 balde foi utilizado para controlar a microbiologia ao longo do tempo, servindo também para a realização das provas organoléticas.

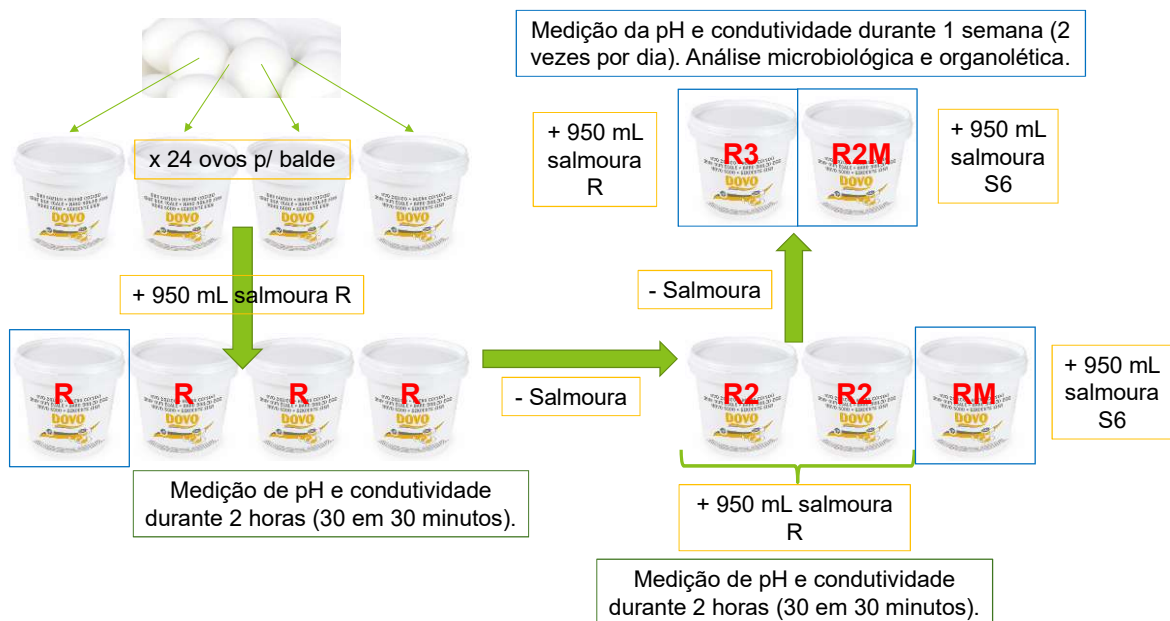


Figura 11 – Esquema de realização da experiência 7 – Avaliação do impacto de utilização de 2 pré-salmouras referência e utilização de salmoura definitiva com diminuição de sal e ácido 1 nas características do ovo cozido.

2.3. Metodologias de análise

2.3.1. Análises físico-químicas da salmoura

De modo a caracterizar as amostras de salmoura, foram analisados os parâmetros de pH, temperatura, condutividade, °Brix e extrato seco. O pH foi medido através de um medidor de pH utilizado também para medir a temperatura. A condutividade foi medida por um potenciômetro portátil que possui uma sonda que é mergulhada no líquido a medir. O °Brix foi medido por refratometria. O extrato seco foi medido através de um medidor de extrato seco utilizando um programa de secagem específico com temperatura máxima atingida de 130 °C para uma alíquota de amostra de cerca de 2,1 g.

Para a obtenção da perda de massa dos ovos, mediu-se a diferença de peso inicial e final de 24 ovos presentes em baldes após a salmoura ter sido escorrida.

O teor de proteína, fosfato, carbonato e carotenóides foi quantificado num laboratório externo após verificação de não existir contaminação por mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais (<10 UFC/g). A proteína foi determinada de acordo com o teor em nitrogénio, o fosfato foi determinado através do método espectrofotométrico e os carotenóides foram determinados por HPLC.

2.3.2. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas efetuadas foram aos seguintes microrganismos: mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *Escherichia coli*, enterobactérias totais, *Salmonella* e *Listeria*. Sendo as análises efetuadas em ovo cozido, uma amostra sólida, foi necessário preparar previamente as amostras. Começou-se por desinfetar a zona de trabalho, as mãos, bem como a balança analítica. Depois de o bico de Bunsen ligado, desinfetou-se o material necessário, pinça e bisturi, e de seguida passou-se pela chama. Para a determinação de mesófilos, coliformes, *E. coli* e enterobactérias, foram pesados 10 g de amostra para um saco de *stomacher*, adicionados 90 g de *Buffered Peptone Water* (BPW) – Água Peptonada Tamponada e colocado o saco de *stomacher* a homogeneizar 1 minuto a 260 rpm. No caso da determinação de *Salmonella*, foram pesados 25 g de amostra, adicionou-se 225 g de BPW, colocou-se uma cápsula de suplementação e o saco foi colocado no *stomacher* nas mesmas condições. Para a determinação de *Listeria*, pesaram-se 25 g de amostra, adicionaram-se 225 g de Half-fraser broth e colocou-se o saco no *stomacher*. Após a homogeneização, o saco para a determinação da *Salmonella* foi colocado na estufa a incubar à temperatura de 37 °C durante 24 horas, inoculado com uma ansa estéril fazendo riscado numa placa com meio seletivo Iris *Salmonella*[®] e incubada a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, as colónias rosa/magenta eram presumíveis de ser *Salmonella*. No caso do saco para determinação de *Listeria*, foi colocado a incubar na estufa a 30 °C durante 24 horas, inoculados 0,1 mL de amostra por espalhamento com um espalhador estéril numa placa com meio seletivo Compass[®] *Listeria* Agar e incubado a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, as colónias azuis são presumíveis de ser *Listeria*. Para a determinação de coliformes, *E. coli* e enterobactérias, a técnica utilizada para inocular foi por incorporação, pelo que se mediu, para uma placa de Petri esterilizada descartável 1 mL de amostra com um pipetador e com uma pipeta esterilizada descartável. Colocou-se meio de cultura na placa de forma a cobrir o fundo, agitou-se para homogeneizar e deixou-se solidificar o meio durante 10 minutos. Os meios de cultura adicionados eram meios seletivos para o tipo de microrganismo a determinar, pelo que para determinar coliformes e *E. coli* se utilizou Gelose chromID™ Coli e para determinar enterobactérias se utilizou Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG Agar). Após os meios terem solidificado, as placas foram invertidas e colocadas na estufa a 37 °C durante 24 horas. No caso da determinação de mesófilos totais, foi utilizado um meio diferencial, 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate, tendo sido pipetado apenas 1 mL de amostra com pipeta estéril descartável e colocado a incubar na estufa a 30 °C durante 48 horas. Tanto para a determinação de mesófilos

totais como para a determinação de coliformes e *E. coli*, quando foi necessário realizar mais diluições por suspeita de maior contaminação, foram pipetados 0,1 mL de amostra para um tubo com 0,9 mL de água peptonada, homogeneizado num vórtex e incubado seguindo os procedimentos descritos anteriormente. Passado o tempo de incubação, foram contadas as colônias na maior diluição em que estas surgissem. As colônias de coliformes totais e de *E. coli* cresceram no mesmo meio, distinguindo-se pela cor, sendo as primeiras de cor azul e as segundas de cor rosa/violeta. Já as enterobactérias apresentaram cor vermelha e os mesófilos cor rosa/violeta.

Em todas as experiências, quando foi realizada a análise de presença de *Salmonella* e *Listeria* em 25 g de amostra, esta foi realizada sempre ao tempo 0. As análises aos restantes microrganismos foram realizadas ao tempo 0 e aproximadamente de 15 em 15 dias, até se verificar que o teor de mesófilos totais a 30 °C fosse bastante superior ao limite recomendado, 2×10^3 UFC/g de ovo.

2.3.3. Análises organolélicas

Os ovos foram provados em laboratório por funcionários da Derovo, nem sempre os mesmos devido à sua disponibilidade, não tendo tido qualquer tipo de treino nem formação em prova organolélica. Para a realização destas provas de laboratório, foram retiradas amostras dos baldes de 24 ovos. Os ovos foram cortados em 4 partes, mais ou menos iguais, e foram provados dos menos para os mais intensos, tanto quanto foi possível. Foi utilizada água como limpa palato. Não foram registados quaisquer dados pessoais acerca dos provadores. As provas organolélicas só foram realizadas em amostras cujos resultados das análises microbiológicas mostrassem a sua segurança alimentar.

3. Resultados e Discussão

3.1. Experiências 1, 2 e 3 - Avaliação do impacto da diminuição de sal e ácidos da salmoura nas características do ovo cozido

É possível conservar o ovo cozido utilizando uma solução ácida contendo sal, designada de salmoura. No entanto, esta solução poderá conferir ao ovo cozido algumas alterações a nível organolético e físico-químico quando comparado com o ovo acabado de cozer. Para avaliar o impacto do sal e dos ácidos da salmoura nas características dos ovos, foi feita uma primeira experiência em que estes foram conservados numa salmoura com redução do sal da salmoura referência (S1), numa salmoura com redução da concentração de ácido 1 (S2) e numa salmoura sem ácido 2 (S3), tendo como referência uma salmoura realizada como teste para este trabalho para a conservação do ovo cozido (R). Os ovos foram mantidos 14 dias nas respetivas salmouras, tendo sido medido ao longo do tempo o pH e a condutividade das salmouras, assim como a massa dos ovos.

De acordo com a Figura 12a, verifica-se em todas as amostras um grande aumento de pH da salmoura nas primeiras horas em contacto com os ovos, tendendo a estabilizar do 8º para o 14º dia. Ao fim de 14 dias, o pH da salmoura R era 5,0, 5,4 para a salmoura S1, 5,7 para a salmoura S3 e 6,2 para a salmoura S2. Todas as salmouras revelaram pH mais alto do que a salmoura R desde o início até ao fim da experiência, até mesmo a amostra com salmoura S1. É possível que o facto de a salmoura S1 ter sido preparada em diferentes condições da salmoura R, possa ter levado a que o pH tenha sido diferente. Para as amostras cuja salmoura foi diminuída em ácido, os valores de pH ao longo do tempo foram sempre maiores do que os da salmoura R, mostrando a relevância destes ácidos para o efeito tampão, principalmente o ácido 1, por ser um ácido triprótico.

A condutividade diminuiu em todas as amostras ao longo do tempo, sendo esta diminuição mais acentuada nos primeiros dias, até que estabilizou ao 4º dia (Figura 12b). Ao fim de 14 dias, a salmoura R apresentou condutividade igual a 25,9 mS/cm, a condutividade da salmoura S2 foi de 23,8 mS/cm, a salmoura S3 apresentou condutividade de 23,4 mS/cm e a salmoura S1 de 15,9 mS/cm. A diminuição da condutividade é mais evidente na salmoura R, seguida das salmouras S2 e S3, sendo menos evidente na salmoura S1. As salmouras S2 e S3 mostram, ao longo da experiência, condutividades muito semelhantes, devido à quantidade de sal adicionada ter sido a mesma. A diferença destas duas salmouras em relação à salmoura R pode dever-se ao facto de terem sido preparadas em diferentes condições. A salmoura S1 é a que apresenta condutividade mais baixa no início da experiência, uma vez que foi reduzida a quantidade de sal adicionado à salmoura.

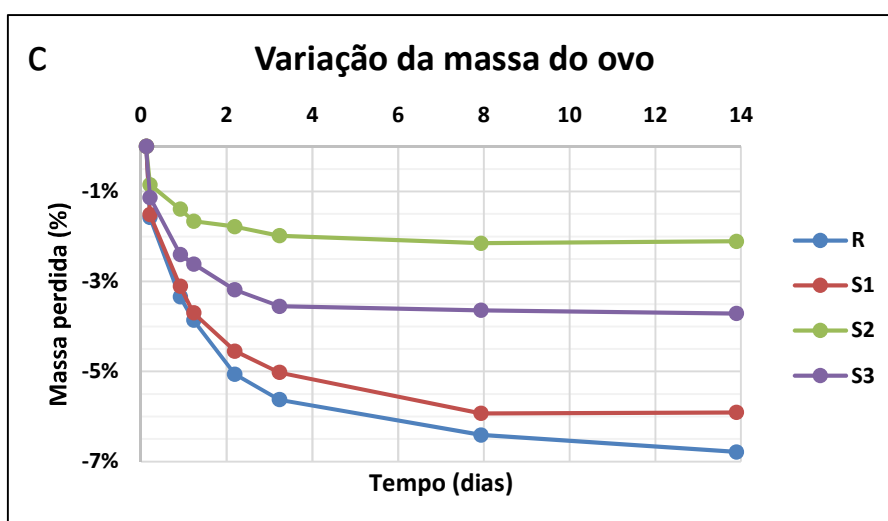
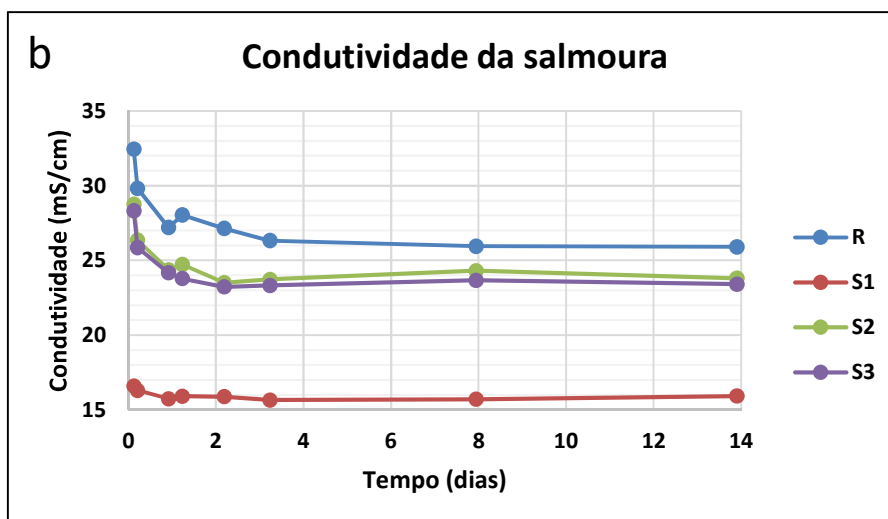
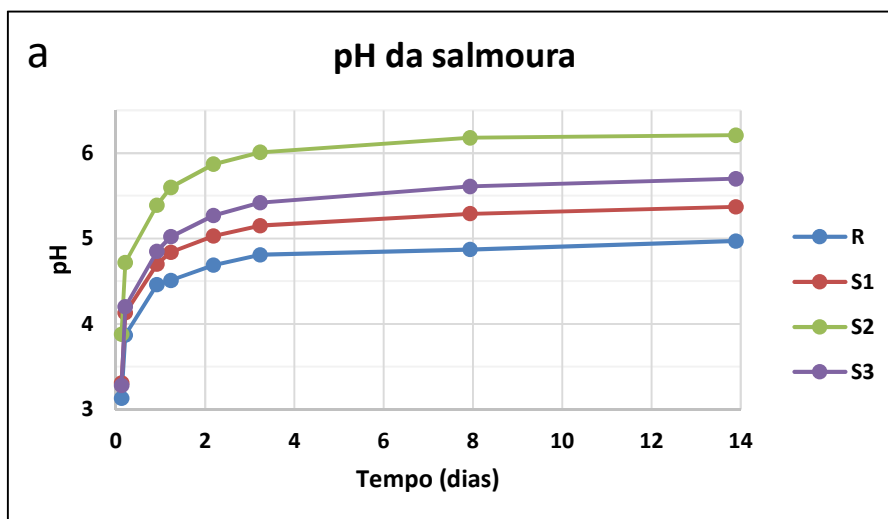


Figura 12 – Variação do pH (a) e condutividade (b) da salmoura e da massa do ovo cozido (c) ao longo de 14 dias de conservação com diminuição de sal e ácidos da salmoura referência.

A Figura 12c mostra que a massa de ovo em todas as amostras diminuiu ao longo do tempo. A maior perda verificou-se para os ovos em salmoura R (6,8%), seguida da perda dos ovos em salmoura S1 (5,9%). Os ovos em salmoura S3 perderam 3,7% e os ovos em salmoura S2 perderam 2,1% da sua massa. Atendendo a que a diminuição da concentração de ácidos levou a uma menor perda de massa dos ovos, é possível inferir que os ácidos são os ingredientes que mais impacto têm na perda de massa dos ovos em salmoura. A diminuição de sal também leva à perda de massa, mas aparentemente numa menor extensão do que a verificada para os ácidos.

Nas análises microbiológicas realizadas no dia 0, todas as amostras resultaram em <math><10\text{ UFC/g}</math> para mesófilos totais a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais, com exceção das amostras com salmoura S2 e S3, que revelaram mesófilos totais a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 e 20 UFC/g, respetivamente. Também foram realizadas análises de presença de *Salmonella* e *Listeria* na amostra com salmoura R, tendo dado negativo em ambas. Aos 15 dias de conservação em salmoura, a amostra de ovos com salmoura R resultou em <math><10\text{ UFC/g}</math> para mesófilos totais a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais (Figura 13). No caso dos ovos com salmoura S1 apenas revelou crescimento de mesófilos totais a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ de $6 \times 10^3\text{ UFC/g}$, tendo resultado <math><10\text{ UFC/g}</math> para coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais. Os ovos em salmoura S2 apresentaram contaminação de mesófilos totais a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, coliformes totais e enterobactérias totais de $5,6 \times 10^4$, $1,2 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^3\text{ UFC/g}$, respetivamente, não apresentando contaminação por *E. coli* (<math><10\text{ UFC/g}</math>). Os ovos em salmoura S3 apresentaram contaminação por mesófilos totais a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, coliformes totais e enterobactérias totais de $1,4 \times 10^4$, $1,8 \times 10^2$ e $1 \times 10^2\text{ UFC/g}$, respetivamente, não apresentando contaminação por *E. coli* (<math><10\text{ UFC/g}</math>). Tendo sido a amostra S1 a que apresentou menor contaminação microbiana e a amostra S2 a que maior contaminação microbiana apresentou, pode-se inferir que o ácido 1 é um ingrediente mais importante para a estabilidade microbiológica do produto do que o sal. A amostra S2 foi também a amostra que apresentou maiores valores de pH ao longo de toda a experiência, mostrando que o pH ácido é um dos principais fatores de proteção conferidos pela salmoura no ovo cozido.

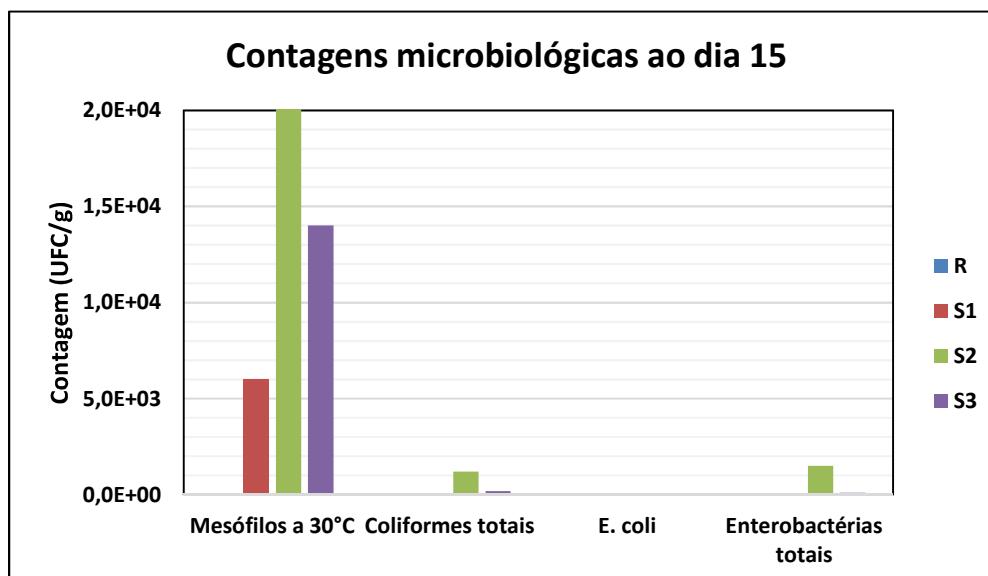


Figura 13 – Análises microbiológicas realizadas aos 15 dias de conservação com diminuição de sal e ácidos da salmoura referência. Análises microbiológicas realizadas aos seguintes grupos de microrganismos: Mesófilos totais a 30 °C, Coliformes totais, *Escherichia coli* e Enterobactérias totais.

Todas as amostras de ovo cozido foram provadas ao dia 15 por vários trabalhadores da Derovo. A nível de rigidez, os ovos da salmoura R foram considerados mais rijos do que os ovos das restantes salmouras, não tendo sido notada qualquer diferença entre si neste parâmetro. No entanto, todas as amostras foram distinguidas pelo seu sabor salgado, tendo sido considerado o ovo conservado em salmoura R o mais salgado, seguido do ovo conservado em salmoura S2, seguido do ovo em salmoura S3, tendo sido considerado o ovo conservado em salmoura S1 o menos salgado e o que mais agradou aos provadores como apreciação global. No entanto, apesar de ser a amostra de ovo menos salgada, foi considerada pelos provadores ainda como demasiado salgada.

Tendo em conta que o menor crescimento microbiano e a melhor apreciação organoléptica foi obtida para a amostra com salmoura S1, com o intuito de diminuir o sabor salgado ainda demasiado intenso identificado nos ovos cozidos conservados em salmoura S1, e por forma a entender o impacto da redução de sal na salmoura nas características do ovo cozido, foi realizada a segunda experiência em que os ovos foram conservados em salmouras com diferentes reduções de sal, sendo a primeira redução de sal a menor relativamente à salmoura referência (S4), a segunda redução de sal intermédia e igual à redução da experiência anterior (S1) e a terceira redução de sal sendo a maior redução (S5), tendo como referência uma salmoura realizada como teste para este trabalho para a conservação do ovo cozido (R). Os ovos foram mantidos nas

respetivas salmouras 42 dias, tendo sido medido ao longo do tempo o pH e a condutividade da salmoura, assim como a massa do ovo.

Tal como verificado na experiência anterior, o pH das salmouras aumentou rapidamente nas primeiras horas em todas as amostras, estabilizando por volta do 6º dia (Figura 14a). O pH inicial da salmoura R foi de 2,1, o da salmoura S4 e o da salmoura S1 foi de 2,2, e o da salmoura S5 foi de 2,3. Esta variação deve-se ao facto de os ácidos da salmoura não estarem a exercer efeito tampão nesta gama de pH. Ao fim de 42 dias, a salmoura referência tinha pH de 4,9, enquanto as salmouras S4, S1 e S5 tinham pH de 5,3, mostrando que o ovo liberta compostos que neutralizam o ácido da salmoura. Durante os 42 dias da experiência, a salmoura aumentou cerca de 3 unidades de pH. Não se observando diferenças de pH entre salmouras com diferentes percentagens de sal, deduz-se que o sal não promove a extração destes compostos do ovo cozido nem inibe a sua difusão. Tal como observado na primeira experiência, a ligeira diferença de pH entre a salmoura R e as restantes salmouras, pode ser devida ao facto de terem sido preparadas em diferentes condições.

No início da experiência, a salmoura R apresentou condutividade de 43,1 mS/cm, a salmoura S4 apresentou condutividade de 28,0 mS/cm, a salmoura S1 apresentou 20,1 mS/cm e a salmoura S5 apresentou 11,5 mS/cm de condutividade (Figura 14b). Em todas as salmouras, a condutividade diminuiu ao longo do tempo, estabilizando por volta do 6º dia, permitindo inferir que houve entrada de sal no ovo. Os valores estabilizaram em 28,5 mS/cm para a salmoura R, 20,8 mS/cm para a salmoura S4, 16,1 mS/cm para a salmoura S1 e 11,6 mS/cm para a salmoura S5. Estes valores de condutividade estão de acordo com a diferente concentração de sal das salmouras. No caso da salmoura S5, a condutividade mantém-se sensivelmente constante ao longo do tempo, sugerindo que a concentração de sal desta salmoura é idêntica à de sais do ovo, estabelecendo-se um equilíbrio durante todo o ensaio.

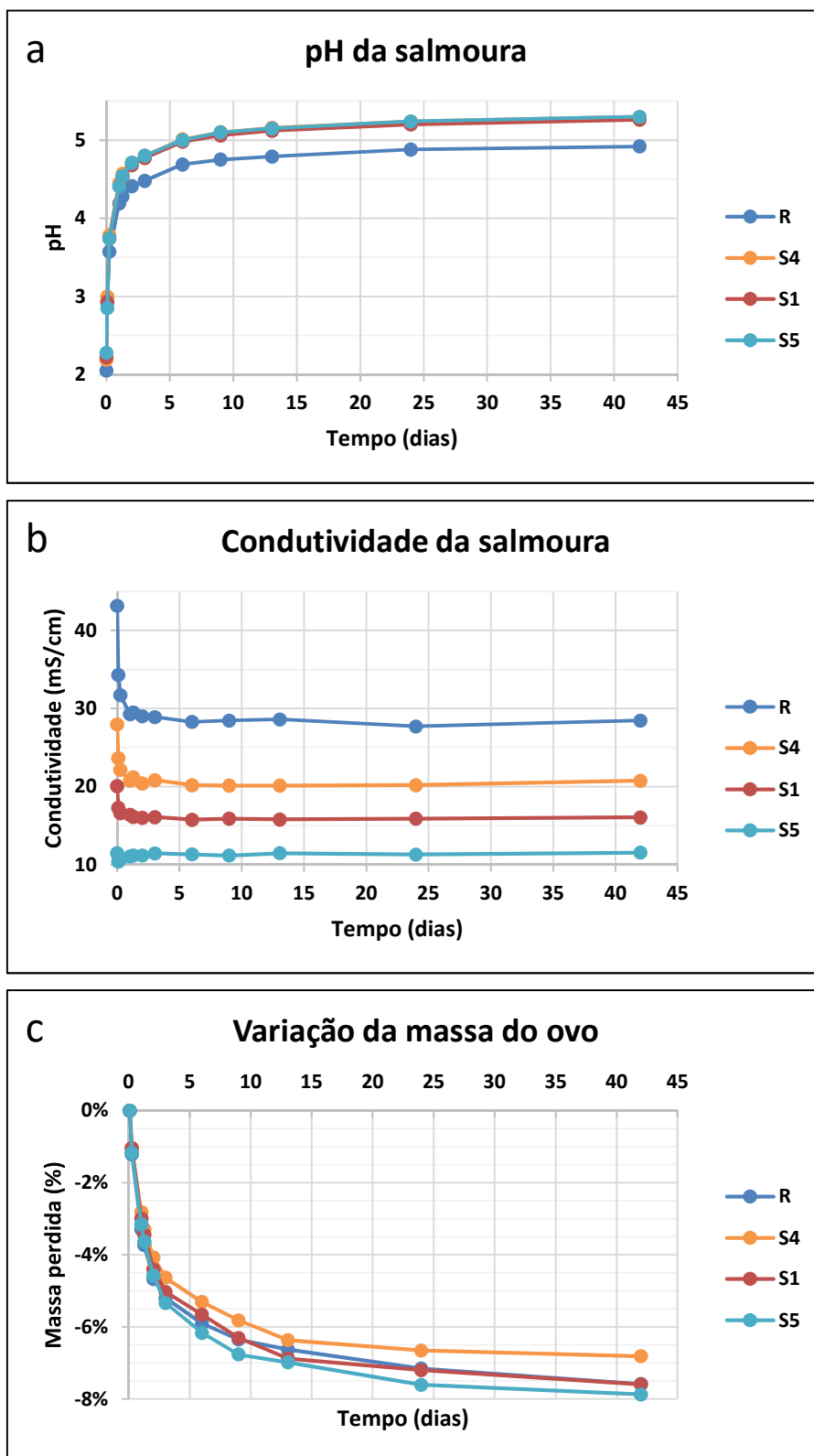


Figura 14 – Variação do pH (a) e condutividade (b) da salmoura e da massa do ovo cozido (c) ao longo de 42 dias de conservação com diferentes diminuições de sal da salmoura referência.

A Figura 14c mostra que em todas as amostras, a massa de ovo diminuiu ao longo do tempo em salmoura. Ao fim de 42 dias, os ovos nas diferentes salmouras perderam entre 6,8% e 7,9% de massa, valores que estão de acordo com a primeira experiência e que mostram que o sal contribui ligeiramente para a perda de massa do ovo, apesar do aumento de massa devido à entrada de sais. Tal é visível pela perda de 7,9% da massa do ovo na salmoura S5, 7,6% na salmoura S1 e 6,8% na salmoura S4.

Com exceção da amostra com salmoura S5 aos dias 24 e 56 em que o resultado foi de 10 UFC/g para mesófilos totais a 30 °C, para todas as restantes amostras, os resultados para mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais aos dias 0, 13, 24, 42 e 56 foram de <10 UFC/g. Também as análises de presença de *Salmonella* e *Listeria* na amostra com salmoura R foram negativas. Aos 73 dias de conservação do ovo cozido em salmoura, as amostras com salmoura R, S4 e S1 não apresentaram qualquer tipo de contaminação (<10 UFC/g) para mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais. Apenas a amostra com salmoura S5 apresentou desenvolvimento de mesófilos totais a 30 °C ($6,6 \times 10^5$ UFC/g), tendo resultado em <10 UFC/g para coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais. Estes resultados mostram que o sal é o ingrediente que menos impacto parece ter na preservação do ovo cozido em salmoura.

Aos dias 16, 27, 43 e 57 da experiência, foram dadas a provar a alguns trabalhadores da Derovo todas as amostras. A maioria dos provadores identificou o sabor salgado dos ovos, tendo classificado como mais salgado o que esteve em salmoura com mais sal e como menos salgado o que esteve em salmoura com menos sal. Ainda assim, esta percepção entre amostras foi-se dissipando com o tempo, já que na prova aos 43 e 57 dias tornou-se difícil distinguir entre as amostras com salmoura S4 e S1, notando ainda que em todas as amostras existia menor sabor salgado do que na prova dos dias 16 e 27. Ainda assim, no global de todas as provas e de todos os provadores, foi consensual que a melhor amostra foi a dos ovos em salmoura S5, tendo sido caracterizada por alguns provadores como idêntica a ovo cozido caseiro, apenas com algum sabor ácido. Uma vez que a amostra S5 apresentou melhores resultados a nível organolético e praticamente não apresentou desenvolvimento microbiano até ao dia 56, utilizou-se esta amostra como base para a realização da experiência seguinte.

A terceira experiência teve como objetivo a diminuição do sabor ácido da amostra com salmoura S5, mantendo a concentração de sal de S5 e diminuindo o teor de cada um dos ácidos da salmoura. Dado que na primeira experiência se tinha verificado que a redução de ácido 1 utilizada na salmoura S2 e a remoção do ácido 2 resultava em

crescimento microbiano ao fim de 15 dias, a redução em ácidos nesta experiência foi menor do que a utilizada na primeira experiência. Para este ensaio, os ovos foram conservados numa nova salmoura S5, numa salmoura reduzida no ácido 1 e com a quantidade de sal utilizada na salmoura S5 (S6) e numa salmoura reduzida no ácido 2 e com a quantidade de sal utilizada na salmoura S5 (S7), tendo como referência uma salmoura realizada como teste para este trabalho para a conservação do ovo cozido (R). Os ovos foram mantidos nas respectivas salmouras durante 14 dias, tendo sido medido o pH e a condutividade da salmoura ao longo do tempo, assim como a massa do ovo.

A Figura 15a mostra que, ao fim de 14 dias, o pH da salmoura S7 era de 5,6 e o da salmoura S6 era de 6,0, superiores ao pH da salmoura R (5,2) e da salmoura S5 (5,4). Estes resultados mostram que a diminuição da concentração dos ácidos na salmoura não permitem ter um pH suficientemente baixo como o verificado para a salmoura R. O aumento de pH maior para a salmoura S6 mostra a relevância do ácido 1, que é um ácido triprótico, na manutenção de um pH ácido na salmoura.

Ao fim de 14 dias, a condutividade da salmoura R era de 23,6 mS/cm, a das salmouras S5 e S6 era de 10,9 mS/cm e a condutividade da salmoura S7 era de 10,5 mS/cm (Figura 15b). Tanto no início como no final da experiência, a salmoura R teve sempre maior condutividade que as restantes amostras devido à sua maior concentração de sal, uma vez que as restantes salmouras tinham todas a mesma concentração de sal. De entre as salmouras reduzidas em sal não existem diferenças, nem no início nem no fim da experiência, uma vez que a concentração de sal foi a mesma para estas 3 salmouras. A estabilização da condutividade das salmouras com redução de sal ao longo de toda a experiência, tal como observado na segunda experiência, permite inferir que a concentração de sais no ovo é semelhante à de sal destas salmouras.

Ao longo dos 14 dias, os ovos em salmoura S7 perderam 6,6% da massa e os ovos em salmoura S6 perderam 4,0% da massa (Figura 15c). Estes valores são menores do que a perda de massa observada para os ovos cozidos na salmoura R, que perderam 7,2% da massa, e para os ovos em salmoura S5, que perderam 7,1% da massa. Estes resultados estão também de acordo com os resultados da primeira experiência, em que foi verificada menor perda de massa em ovos em salmouras contendo menor quantidade de ácidos, sugerindo que a presença de maior concentração em ácidos leva a maior perda de massa nos ovos, sendo o ácido 1 o ácido que mais influencia este parâmetro, uma vez que os ovos em salmoura S6 foram os que perderam menos massa.

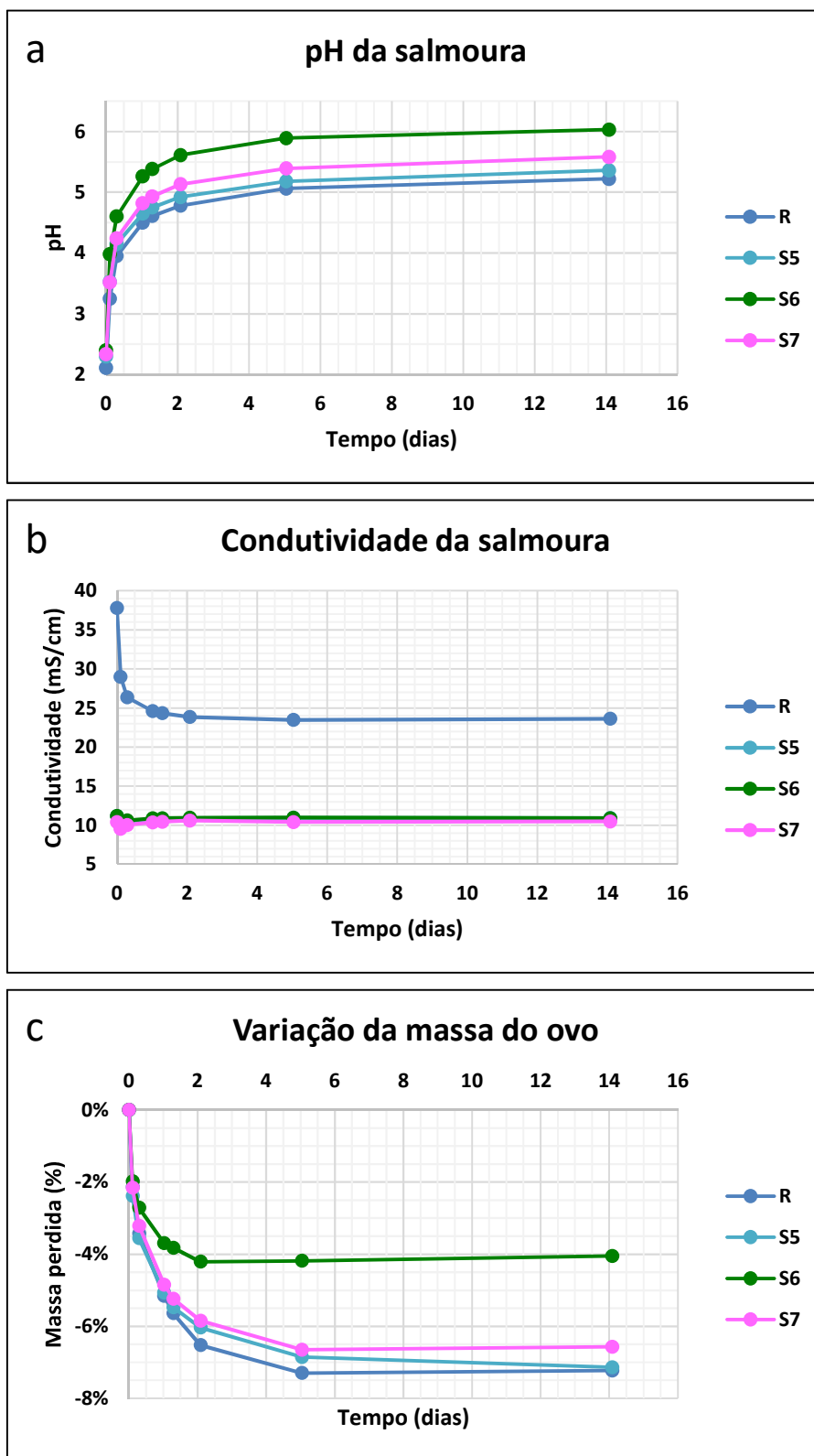


Figura 15 – Variação do pH (a) e condutividade (b) da salmoura e da massa do ovo cozido (c) ao longo de 14 dias de conservação com diminuição de cada um dos ácidos, mantendo a concentração de sal igual à da salmoura S5, relativamente à salmoura referência.

As análises microbiológicas aos ovos realizadas aos dias 0 e 14 resultaram em <10 UFC/g para mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais para todas as amostras, com exceção da amostra em salmoura S6 ao dia 14 que apresentou 60 UFC/g de mesófilos totais a 30 °C. Também não foi detectada a presença de *Salmonella* e *Listeria*. Ao dia 26, as amostras de ovo na salmoura R e S7 não apresentaram desenvolvimento microbiano (<10 UFC/g) para mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais. A amostra de ovo em salmoura S5 apresentou 9×10^3 UFC/g de mesófilos totais a 30 °C e <10 UFC/g de coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais e a amostra de ovo em salmoura S6 apresentou 3×10^5 UFC/g de mesófilos totais a 30 °C e <10 UFC/g de coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais. As amostras de ovo em salmoura S5 e S6 estavam ambas acima do valor aceitável para o ovo cozido (2×10^3 UFC/g). Como as salmouras S6 e S7 diferem apenas no tipo ácido que foi diminuído, e tendo em conta que os ovos com salmoura S6 ficaram mais contaminados, mostra-se que o ácido 1 seja mais importante na preservação do ovo cozido, tal como se tinha observado na primeira experiência.

Os provadores gostaram mais das amostras provenientes da salmoura S6, provada ao fim de 19 dias, porque não tinha tanto sabor ácido quanto a amostra de ovo em salmoura S5 e não era tão salgada como a amostra em salmoura R. Apesar de também não ter um sabor ácido, a amostra com salmoura S7 foi identificada com um sabor desagradável.

Com esta avaliação do impacto da diminuição de sal e ácidos da salmoura nas características dos ovos foi possível verificar que, sempre que a salmoura é adicionada aos ovos, o pH sobe e a condutividade baixa, mais rapidamente no início, estabilizando passados poucos dias. O pH varia apenas com a concentração de ácidos adicionados à salmoura, sendo mais elevado quanto menos ácido é adicionado, e a sua subida ao longo do tempo pode dever-se à libertação de compostos que estejam retidos na clara de ovo desnaturada, podendo ser proteínas, iões como fosfatos e carbonatos e/ou água. A condutividade é maior quanto maior é a concentração de sal na salmoura e, conseqüentemente, maior é a descida de condutividade até estabilizar. A salmoura com maior redução de sal não altera a sua condutividade na presença do ovo. A perda de massa é potenciada pelos ácidos, mais intensamente pelo ácido 1 que pelo ácido 2, podendo esta perda de massa dever-se à saída de água do ovo, mas também à saída de outros compostos para a salmoura, nomeadamente proteínas e iões. As análises microbiológicas sugerem que o ácido 1 é o ingrediente que tem maior efeito protetor no ovo cozido durante o armazenamento em salmoura. Do ponto de vista organolético, o ovo

cozido armazenado em salmoura tende a ficar rijo, salgado e ácido ao longo do tempo, sendo atenuado o sabor salgado com o tempo.

3.2. Experiência 4 - Avaliação da evolução do pH e condutividade de soluções contendo diferentes concentrações de sal na presença do ovo cozido

Como existe um aumento rápido de pH e diminuição rápida da condutividade da salmoura nas primeiras horas em contacto com os ovos, para compreender este comportamento, foi realizada uma experiência em que se mediram o pH e a condutividade em soluções aquosas contendo ovos cozidos mergulhados. Uma solução continha apenas água (água), outra água e sal na mesma concentração em que é utilizado na salmoura referência (sal) e outra contendo água e sal no dobro da concentração da salmoura referência (2sal). Como referência, foi utilizada uma salmoura realizada como teste para este trabalho (referência). Os ovos foram mantidos nestas soluções durante 7 horas e 30 minutos.

O pH inicial da amostra água foi de 7,09, o da amostra sal foi de 7,07, o da amostra 2sal foi de 7,05, valores que estão de acordo com o pH neutro da água, e que contrastam com o pH da salmoura referência, que foi de 2,47 (Figura 16a). Nos primeiros 15 minutos de contacto com os ovos, o pH da amostra água foi de 8,41, da amostra sal foi de 8,53 e da amostra 2sal foi de 8,33, mostrando um aumento muito rápido de pH, estabilizando em 8,75 na amostra água, 8,80 na amostra sal e 8,65 na amostra 2sal, valores medidos ao fim de 7 horas e 30 minutos. No caso da salmoura referência, também se verificou um aumento de pH, mais gradual, sendo de 4,44 ao fim de 7 horas e 30 minutos. Estes resultados mostram que o ovo cozido libertou compostos básicos capazes de aumentar o pH neutro da água e da água com sal para valores básicos, estabelecendo um equilíbrio a pH 8,3-8,5 nos primeiros 15 minutos.

A concentração de sal na solução não parece influenciar esta migração de compostos do ovo. Pela análise da condutividade, verifica-se que quanto maior for a concentração de sal na salmoura, maior é a entrada imediata de sal no ovo (Figura 16b). No caso da amostra água, tendo a condutividade inicial sido de 0,5 mS/cm, ao fim de 7 horas e 30 minutos era de 7,2 mS/cm, tendo aumentado gradualmente. Este resultado permite inferir que o ovo perde compostos carregados para a solução envolvente. Este facto não é notado nas soluções com sal devido à sua elevada condutividade.

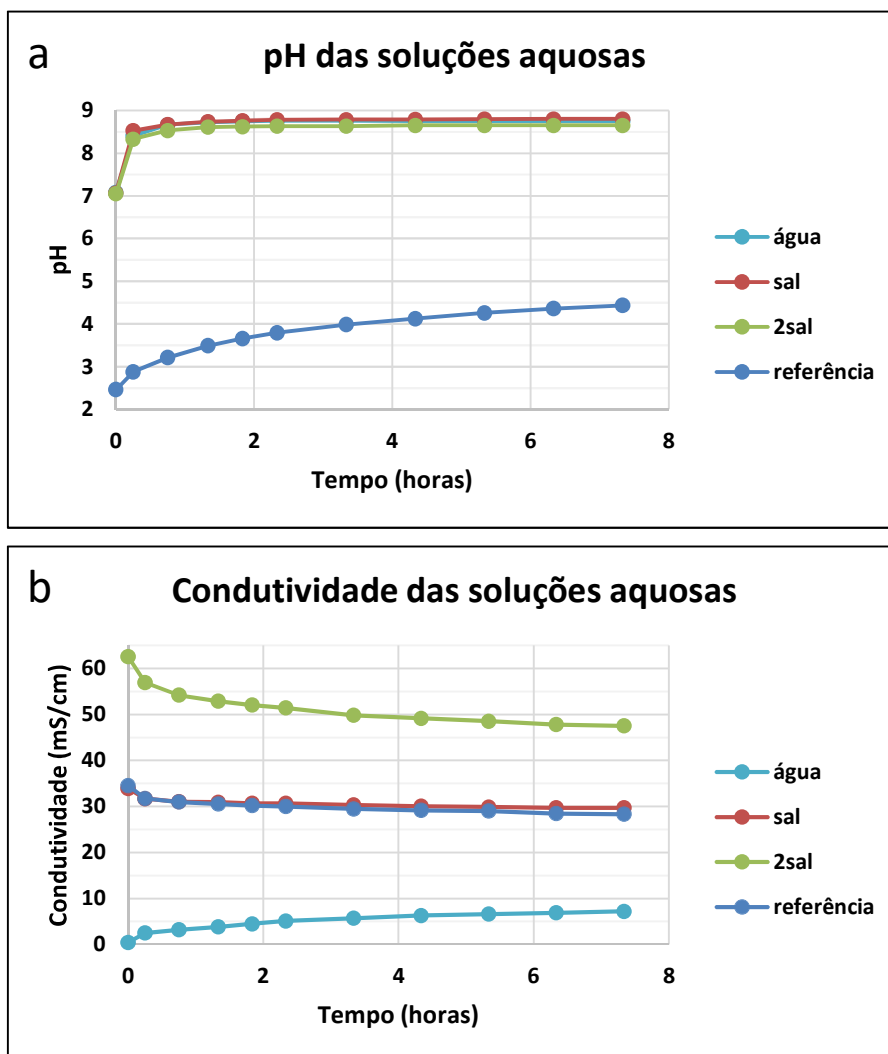


Figura 16 – Variação do pH (a) e condutividade (b) das soluções aquosas ao longo de 7,5 horas de conservação.

Nesta experiência evidencia-se a existência de compostos no ovo com grande capacidade de neutralização de pH na salmoura. É possível que estes compostos sejam proteínas da clara que nesta gama de pH contribuam para o aumento deste parâmetro para valores básicos. Também é possível que haja migração de água por osmose devido à elevada concentração de sal na salmoura, de íões fosfato intracelular e também de carbonato, uma vez que é um ião que entra na composição da casca do ovo.

Com o objetivo de compreender os mecanismos de difusão que estão envolvidos entre a salmoura e o ovo cozido, foi mandada analisar num laboratório externo uma salmoura referência com 3 semanas de conservação de ovo cozido. A análise de proteína na salmoura revelou presença de 11 g/L, confirmando a hipótese da migração de proteínas do ovo para a salmoura, promovendo o aumento do pH ao longo do tempo.

As proteínas identificadas nesta análise deverão ser as da clara uma vez que a adição do ovo à água estabilizou o pH na zona alcalina e este constituinte do ovo ser alcalino (Figura 16a). A análise à salmoura revelou também bicarbonato numa concentração de 0,92 g/L, sendo inconclusiva quanto à presença de fosfatos, dado que o limite de quantificação do método utilizado pelo laboratório era de 1 g/kg. Estes resultados mostram que, pelo menos o carbonato e a proteína, são responsáveis pelo ganho de condutividade da água após contacto com ovo cozido (Figura 16b). A variação de massa do ovo observada nas experiências 1, 2 e 3 (Figura 12c, Figura 14c e Figura 15c) pode dever-se à saída de água, proteínas e bicarbonato do ovo para a salmoura. Como a salmoura após algumas semanas de conservação de ovo cozido apresenta uma cor amarela, foi também efetuada uma análise para quantificar carotenóides. Como a sua concentração foi inferior a 0,30 mg/kg, limite de quantificação do método utilizado pelo laboratório, esta análise é inconclusiva, podendo a cor amarela ser resultado de carotenóides em menores concentrações assim como de reações de Maillard.

3.3. Experiência 5 - Avaliação do impacto da temperatura de arrefecimento do ovo e temperatura da salmoura nas características físico-químicas da salmoura na presença de ovo cozido

O aumento de temperatura aumenta a vibração das moléculas, favorecendo o seu movimento. Para avaliar de que forma a temperatura de arrefecimento do ovo e a temperatura da salmoura têm influência nas características físico-químicas da salmoura, foi realizada uma experiência em que os ovos foram divididos em 2 grupos, sendo um grupo arrefecido com casca em água a 15 °C (cAF) e outro arrefecido sem casca. O grupo cAF foi descascado, tendo metade destes ovos sido colocada em salmoura referência a 15 °C (cAFSF) e a outra metade colocada em salmoura referência a 35 °C (cAFSQ). Quanto aos ovos arrefecidos sem casca, estes foram também divididos em 2 subgrupos, tendo um sido arrefecido em água a 15 °C (dAF) e outro arrefecido em água a 35 °C (dAQ). Ambos os subgrupos foram colocados em salmoura referência a 15 °C, resultando nas amostras dAFSF e dAQSF.

Após 6 dias em salmoura, as amostras cAFSF, dAFSF e dAQSF tinham pH 4,4 e a amostra cAFSQ tinha pH 4,5 (Figura 17a). Sendo a composição das salmouras iguais, e não existindo diferenças de pH entre amostras, estes resultados sugerem que nem o descasque do ovo após a cozedura, nem a temperatura da água de arrefecimento, nem a temperatura da salmoura interferem com a difusão de compostos que alterem o pH. A condutividade inicial em todas as salmouras foi de 41,8 mS/cm, tendo após 6 dias

estabilizado em 30,4 mS/cm nas amostras cAFSF e cAFSQ, em 30,0 mS/cm na amostra dAFSF e em 29,8 mS/cm na amostra dAQSF (Figura 17b). Sendo as diferenças de condutividade entre amostras muito pequenas, infere-se que não existem diferenças para a difusão de sal entre arrefecer o ovo com ou sem casca, em água a 15 °C ou 30 °C ou adicionar salmoura a 15 °C ou 30 °C.

No início, o °Brix é de 3,7 para todas as salmouras, começando por diminuir ao longo do 1º dia até atingir o mínimo de 3,1 no caso das salmouras com ovos arrefecidos com casca (cAFSF e cAFSQ) e de 2,9 no caso das salmouras com ovos arrefecidos sem casca (dAFSF e dAQSF), Figura 17c. Desde o dia 1 até ao dia 6, o °Brix sobe em todas as salmouras, terminando em 3,7 para a cAFSF, 3,6 para a cAFSQ e 3,5 para as amostras dAFSF e dAQSF. É perceptível uma ligeira diferença entre o grupo de amostras em que os ovos foram arrefecidos com casca e os que foram arrefecidos sem casca, sugerindo que existe uma maior difusão de compostos da salmoura para o ovo quando o ovo é arrefecido sem casca e também uma maior difusão de compostos do ovo para a salmoura após o primeiro dia. A diminuição de °Brix no 1º dia pode dever-se à predominância de entrada de sal e à saída de água do ovo. Após o dia 1, passam a predominar as trocas de compostos do ovo para a salmoura, fazendo aumentar o °Brix. A casca faz retardar ligeiramente estas trocas. Relativamente às diferenças de temperatura de descasque e da salmoura não se observa influência no °Brix da salmoura.

O extrato seco, à semelhança do que acontece com o °Brix, em todas as salmouras, inicialmente desceu, mas após o 1º dia, começou a subir (Figura 17d). No início, todas as salmouras tinham 3% de extrato seco e atingiram o mínimo de 2,6% ao dia 1 para as amostras de salmoura com ovos arrefecidos com casca. A amostra dAQSF atingiu o mínimo de 2,5% de extrato seco e a amostra dAFSF de 2,4%. O extrato seco de todas as salmouras subiu ao fim do 1º dia. No dia 6, registaram-se os valores de 2,9% para a amostra dAQSF, 2,8% para as amostras cAFSF e cAFSQ e 2,7% para a amostra dAFSF. Tal como verificado para a variação do °Brix das salmouras, a casca influencia a difusão de compostos de e para o ovo, não se observando influência no extrato seco da salmoura com a temperatura de descasque do ovo e com a temperatura da salmoura em que o ovo é colocado.

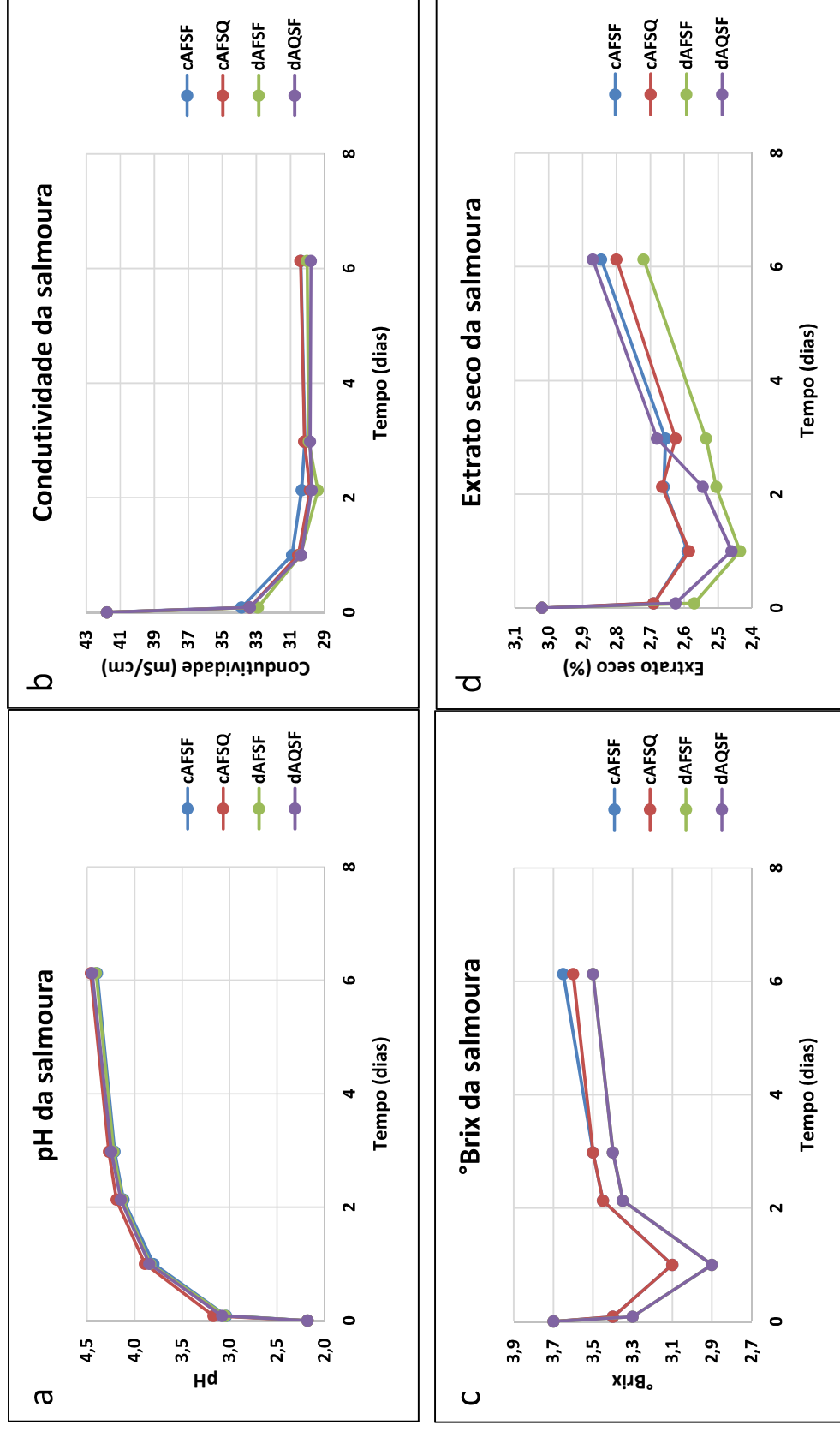


Figura 17 – Variação do pH (a), condutividade (b), °Brix (c) e extrato seco (d) da salmoura ao longo de 6 dias de conservação em salmoura referência, c/ ou s/ descasque do ovo cozido durante o arrefecimento, com variação da temperatura de arrefecimento e com variação da temperatura da salmoura.

Com esta experiência verificou-se que a casca do ovo influencia a difusão de compostos da salmoura para o ovo e do ovo para a salmoura. No entanto, esta diferença não parece afetar os parâmetros de pH e condutividade dada a elevada concentração de sal e ácidos da salmoura. A temperatura da água de arrefecimento do ovo e a temperatura da salmoura a que o ovo é colocado não mostraram influenciar os parâmetros de pH, condutividade, °Brix e extrato seco.

3.4. Experiências 6 e 7- Avaliação do impacto de utilização de pré-salmouras nas características do ovo cozido

Como forma de sequestrar os compostos que estão a neutralizar o pH da salmoura e diminuir o aumento rápido de pH que se verificou nas primeiras horas de contacto do ovo com a salmoura, foi avaliado o impacto nas características do ovo cozido da utilização de uma pré-salmoura antes da colocação dos ovos na salmoura definitiva. Para isso, foi realizada uma primeira experiência em que inicialmente se colocaram ovos cozidos em diferentes soluções aquosas, uma contendo salmoura reduzida em ácido 1 e com grande diminuição de sal (salmoura S6) em relação à salmoura referência (M), outra sendo a salmoura referência (R) e outras duas contendo água (A). Os ovos foram mantidos 2 horas nas respetivas soluções aquosas.

A Figura 18a mostra que o pH das soluções com adição de ácidos (R e M) tinham um pH inicial de 2,12 e 2,47, respetivamente, passados 30 minutos, tinham pH de 2,97 e 3,35 e passadas 2 horas, tinham pH igual a 3,39 e 3,88, respetivamente. A mesma tendência, mais pronunciada, verificou-se para a amostra A, com pH inicial de 6,71, pH de 8,84 passados 30 minutos e passadas 2 horas estabilizou a pH de 9,01. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos na experiência 4 (Figura 16a), que mostraram a migração de compostos alcalinos do ovo para a solução envolvente. O aumento de pH das salmouras R e M também nestes estágios iniciais de contacto do ovo com a salmoura, apesar de não tão pronunciado como o verificado para a água, é explicado pela migração destes compostos. Como a salmoura M possui menor concentração de ácido do que a salmoura R, a variação de pH observada é maior. No entanto, a concentração de ácido 1 utilizada revela-se suficiente para manter o pH da salmoura baixo.

Os valores de condutividade corroboram as conclusões obtidas com a variação de pH. Observa-se que a salmoura R tem um maior decréscimo de condutividade nos primeiros 30 minutos, tendo começado com 38,7 mS/cm de condutividade e ao fim de 2 horas ter 30,0 mS/cm (Figura 18b). A amostra M, com a mesma composição da salmoura

S6 da experiência 3 (Figura 15b), com uma concentração de sal semelhante à concentração de sais do interior do ovo, apresentou uma condutividade de 10,9 mS/cm e após 2 horas tinha 10,0 mS/cm. À semelhança do observado na experiência 4 (Figura 16b), a condutividade da amostra A foi subindo ao longo do tempo, passando de 0,3 mS/cm para 3,1 mS/cm ao fim de 2 horas, confirmando a saída de compostos do ovo para a salmoura.

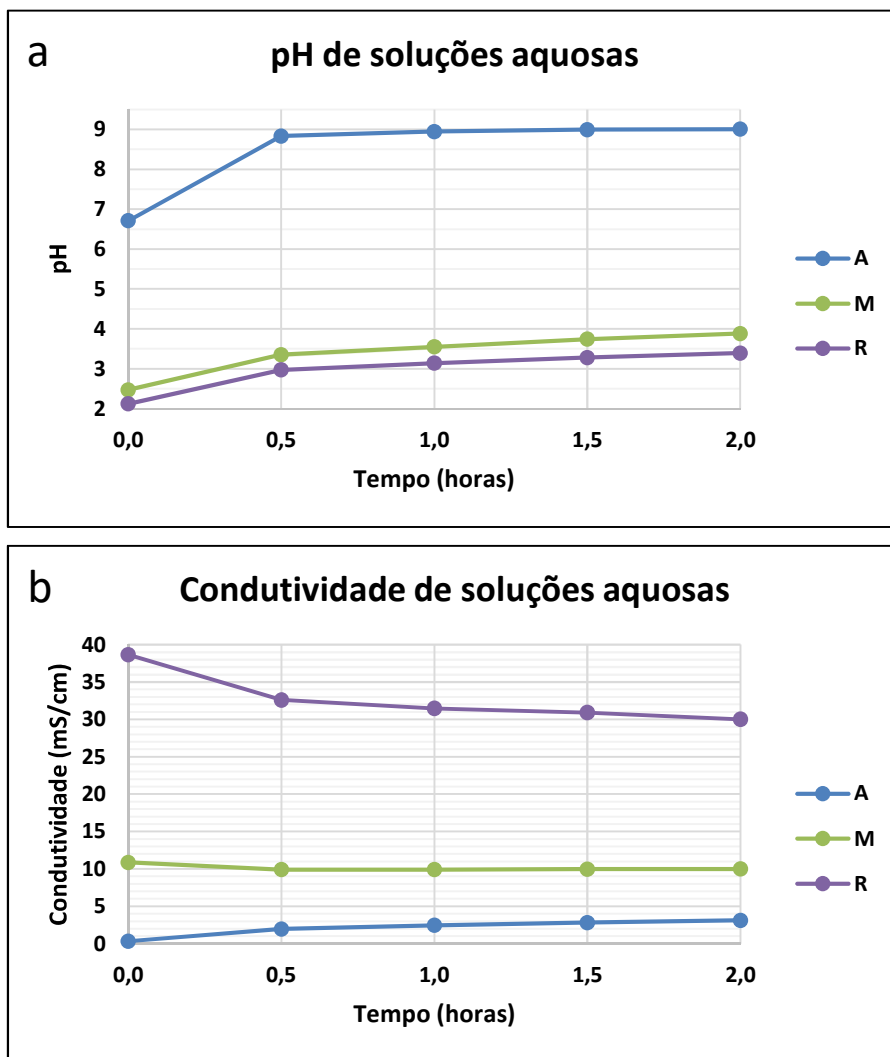


Figura 18 – Variação do pH (a) e condutividade (b) das soluções aquosas ao longo de 2 horas de conservação.

Tratando-se de pré-salmouras, as soluções A, M e R foram descartadas, tendo sido adicionadas aos ovos novas salmouras: salmoura S6 a um ensaio A (AM) e ao ensaio M (MM) e salmoura referência ao outro ensaio A (AR) e ao ensaio R (RR). Os ovos foram mantidos 4 dias nas respectivas salmouras.

Tal como observado na primeira parte da experiência com a pré-salmoura, verificou-se um rápido aumento de pH da salmoura nas primeiras horas em contacto com os ovos (Figura 19a). Nas amostras AR e RR, o pH das salmouras, ao fim de 4,2 dias, foi de 4,77 e 4,45, respetivamente. Estes valores são mais baixos do que os verificados para a salmoura R (pH de 4,8 após 2 dias e de 5,1 após 5 dias) realizada na experiência 3 (Figura 15a). A mesma diminuição de pH foi observada para as amostras AM e MM, que ao fim de 4,2 dias foi de 5,39 e 4,94, respetivamente, relativamente aos valores verificados na experiência 3 para a salmoura S6 (pH de 5,6 após 2 dias e 5,9 após 5 dias), nesta experiência identificada como M. Estes resultados mostram que o facto de os ovos terem estado previamente 2 horas em soluções aquosas, com ou sem sal e ácidos, permite baixar o pH das salmouras. Como a salmoura R tem mais sal e ácido que a salmoura M, a variação de pH é menor na salmoura R, refletindo num menor pH nas salmouras AR e RR do que nas salmouras AM e MM. Apesar de a salmoura AM apresentar um valor de pH superior a 5 ao fim de 4,2 dias, a salmoura MM permite obter um pH abaixo deste valor. Como na experiência 4 se verificou que nas primeiras horas de contacto do ovo com a salmoura há migração de compostos da salmoura para o ovo (Figura 16a), a utilização de uma pré-salmoura contendo ácidos vai permitir a acidificação do ovo. Quando o ovo é colocado numa nova salmoura, é possível que esses ácidos sejam libertados juntamente com os compostos alcalinos do ovo, contribuindo para que o pH não aumente tanto como o verificado com a utilização de água, nem como o verificado com a utilização da salmoura sem renovação.

A amostra RR apresentou a condutividade mais elevada (30,0 mS/cm) ao fim de 4,2 dias (Figura 19b), com um valor superior ao observado na salmoura R na experiência 3 (23,8 mS/cm ao dia 2 e 23,5 mS/cm ao dia 5). Pelo contrário, a amostra AR apresentou condutividade semelhante à da experiência 3, tendo sido de 24,2 mS/cm ao fim de 4,2 dias (Figura 15b), mostrando que a maior entrada de sal no ovo durante a pré-salmoura leva a uma menor entrada de sal pela salmoura definitiva. O mesmo se verificou para a condutividade das amostras MM e AM (11,0 mS/cm e 9,4 mS/cm, respetivamente), mas com um efeito não tão pronunciado quanto o verificado para a salmoura R pelo facto de a salmoura M possuir uma menor concentração de sal.

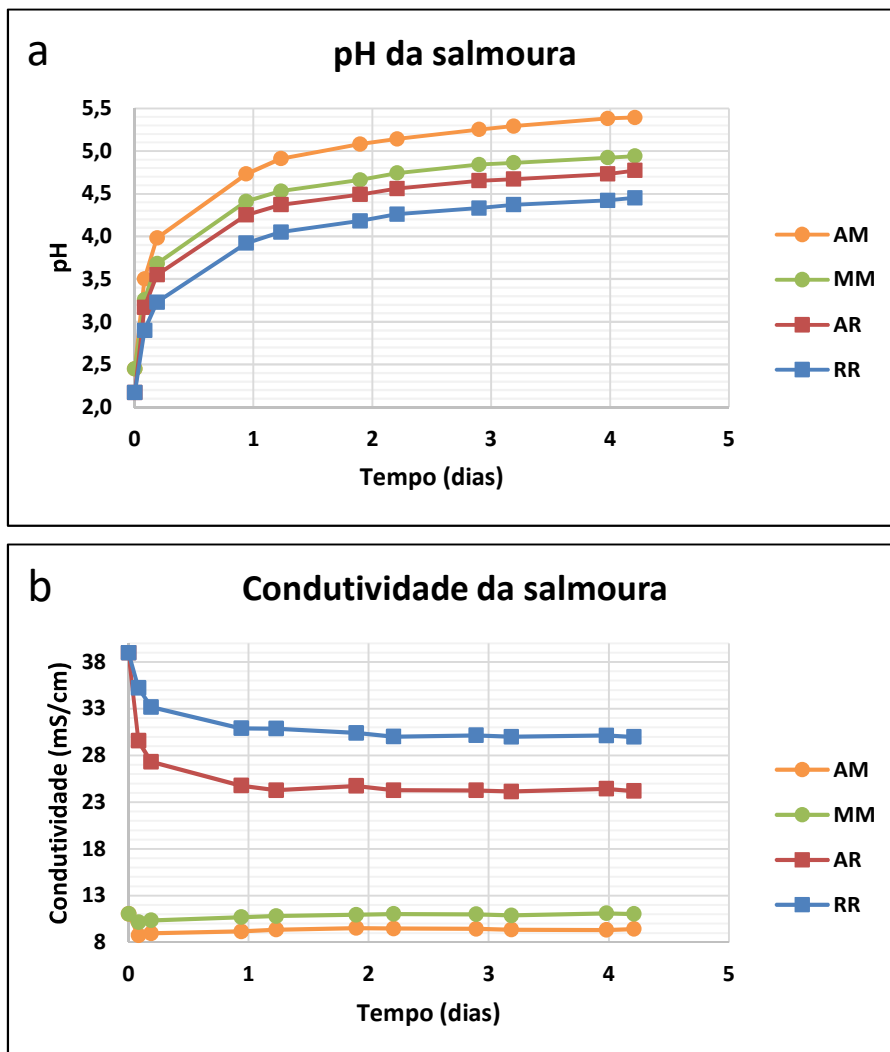


Figura 19 – Variação do pH (a) e condutividade (b) das salmouras com diminuição de sal e ácido (M) e referência (R) ao longo de 4,2 dias de conservação.

Com esta experiência verificou-se que a utilização de soluções aquosas para reter os compostos que neutralizam o pH ácido da salmoura pode ser uma possibilidade para reduzir o aumento rápido de pH da salmoura nas primeiras horas em contacto com os ovos. A utilização de salmoura como solução de lavagem (pré-salmoura) parece favorecer a diminuição de pH, impedindo o desenvolvimento microbiano. Tendo em conta que ainda é visível um aumento acentuado de pH na salmoura nas primeiras horas de contacto com os ovos, foi realizada uma experiência em que a salmoura referência (R) foi utilizada como primeira pré-salmoura e, passadas 2 horas, foi descartada e adicionada nova salmoura referência (R2). Os ovos foram mantidos 2 horas nas respectivas salmouras, num total de 4 horas. Ao fim deste tempo, a salmoura R2 foi descartada e os ovos foram colocados numa nova salmoura referência (R3).

O pH inicial da pré-salmoura era de 2,21, tendo-se observado, ao fim de 2 horas, um aumento para 3,35. A colocação dos ovos numa nova salmoura de pH 2,21 levou a que, ao fim das novas 2 horas, o pH fosse de 2,92, um aumento muito menor do que o verificado para a salmoura R ao fim de 2 horas (Figura 20a). A colocação dos ovos na salmoura R3 levou a que, ao fim de 30 minutos, o pH fosse de 2,44. Estes resultados mostram que a variação de pH nos primeiros 30 minutos foi menor quanto maior o número de lavagens com salmoura for feito. Quando os ovos permanecem na mesma salmoura, o valor de pH é muito maior do que quando os ovos são submetidos a pré-lavagem com salmoura (Figura 20a). Ao fim de 8 dias, as salmouras R e R3 tinham pH de 4,93 e 4,34, respetivamente, mostrando que a pré-lavagem permite diminuir o pH final da salmoura (Figura 21a).

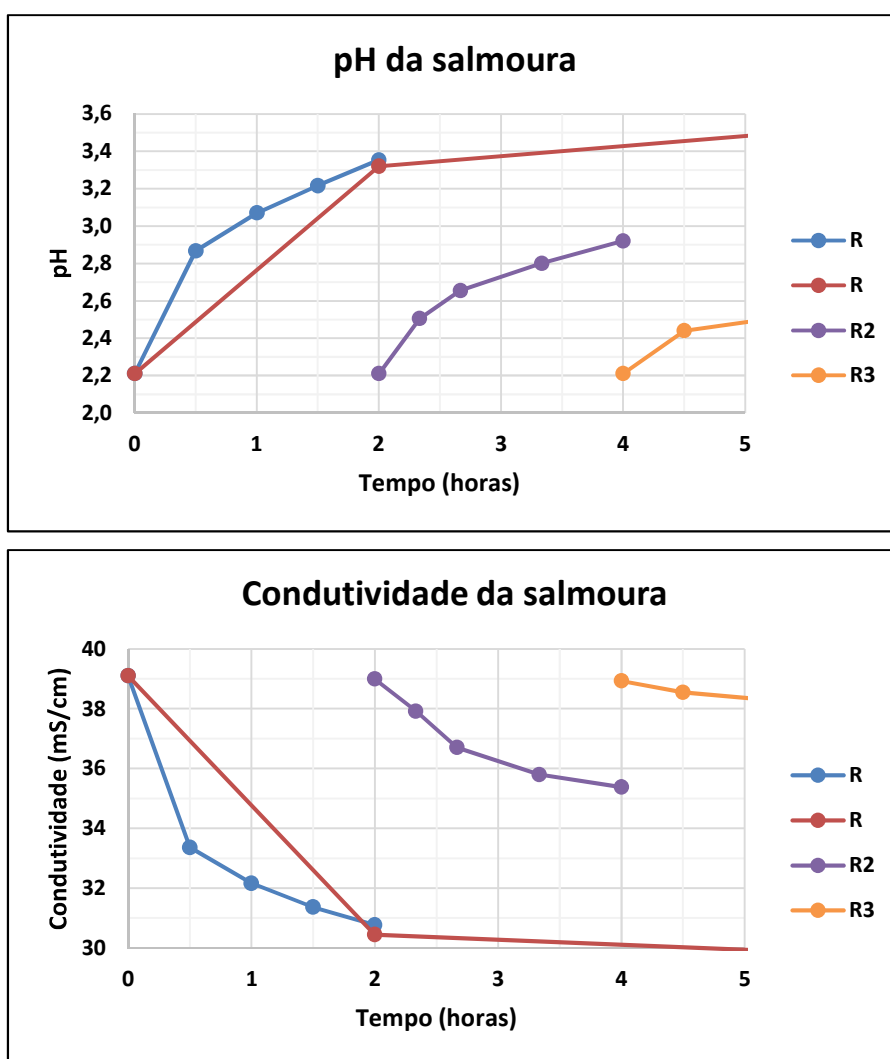


Figura 20 – Variação do pH (a) e condutividade (b) das salmouras ao longo de 5 horas de conservação, variando o número de lavagens dos ovos com salmoura referência.

A amostra R diminuiu a condutividade de 39,1 mS/cm para 30,8 mS/cm durante 2 horas e a amostra R2 diminuiu para 35,4 mS/cm após mais 2 horas (Figura 20b). A colocação dos ovos numa terceira salmoura (R3) permitiu uma diminuição para 38,6 mS/cm em 30 minutos, mostrando que a sucessiva lavagem com salmoura referência leva ao aumento de entrada de sal no ovo até que se atinja o equilíbrio. Com a terceira salmoura a condutividade não desce tanto, possivelmente devido ao facto de o ovo já ter absorvido sal nas salmouras anteriores, estando a concentração de sal no interior do ovo já em equilíbrio com a concentração de sal na salmoura referência. As diferenças observadas na condutividade ao fim de 8 dias entre as salmouras R e R3 (26,3 mS/cm e 32,7 mS/cm, respetivamente), mostram que este efeito de entrada de sal no ovo (Figura 21b) pode tornar o ovo mais salgado do que o ovo que permanece somente na salmoura referência (R).

Quando os ovos colocados em salmoura durante 2 horas e adicionados a uma nova salmoura reduzindo a concentração de ácido 1 e utilizando a maior redução de sal relativamente à salmoura referência (salmoura S6), ensaio RM, a salmoura tinha pH de 4,82 ao fim de 8 dias (Figura 21a), menor do que o pH verificado para a salmoura R (4,93), mas maior do que o verificado para a salmoura R3 (4,34) após o mesmo período de tempo. Estes resultados mostram que uma lavagem dos ovos com salmoura referência é suficiente para diminuir o pH da salmoura, mesmo se colocada numa salmoura definitiva contendo menos ácido e sal. O aumento de condutividade verificado para a salmoura RM de 11,9 mS/cm para 15,5 mS/cm (Figura 21b), ao fim de 8 dias, mais pronunciado nas primeiras horas, mostra que o ovo perdeu sal que tinha sido adquirido através da salmoura R, que era mais concentrada do que a salmoura M. Este facto ocorreu de forma mais acentuada no caso da salmoura R2M (17,2 mS/cm), uma salmoura em que os ovos estiveram 2 vezes 2 horas na salmoura referência e depois foram colocados na salmoura M. Estes ovos concentraram mais sal no seu interior, tendo-o libertado para a salmoura M. Este efeito também se observa nos valores de pH da salmoura R2M de 4,59 ao fim de 8 dias (Figura 21a), evidenciando a diminuição do pH da salmoura quanto mais lavagens com pré-salmoura forem feitas devido à acidificação do ovo, que ajuda na neutralização dos compostos alcalinos da salmoura definitiva. Esta diminuição de pH da salmoura pode ser um fator favorável para o impedimento do desenvolvimento microbiano. A saída de sal do ovo, aumentando a sua concentração na salmoura e verificada pela condutividade, pode ajudar a tornar a salmoura M mais viável do ponto de vista microbiológico, um problema encontrado na experiência 3, mantendo

ainda assim baixa a quantidade de sal na salmoura, podendo favorecer o ovo do ponto de vista do sabor menos salgado.

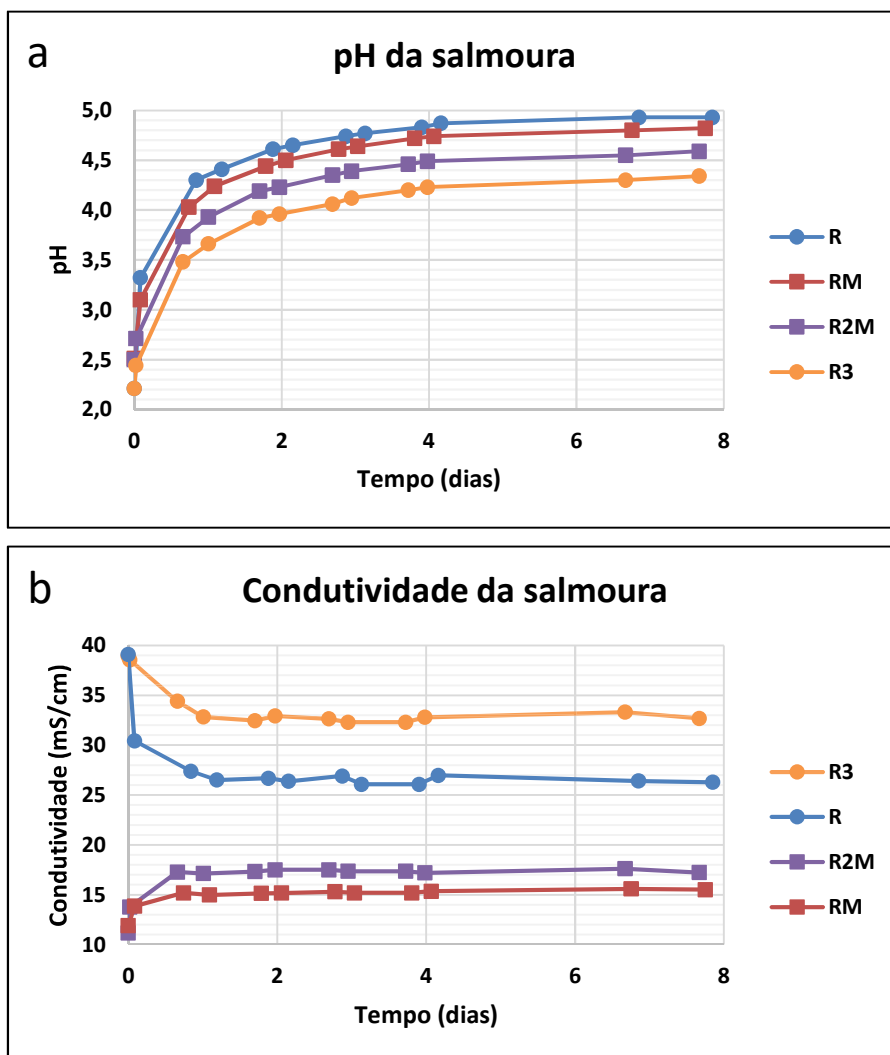


Figura 21 – Variação do pH (a) e condutividade (b) das salmouras com diminuição de sal e ácido (M) e referência (R) ao longo de 8 dias de conservação.

As análises microbiológicas realizadas às amostras de ovo em salmoura R, RM, R2M e R3, conservados até aos dias 15, 29 e 43, não registaram crescimento (<10 UFC/g) para mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais, à exceção da amostra de ovo em salmoura R3, cujo resultado foi incontável na diluição a 10^{-1} ao dia 43 para determinação de mesófilos totais a 30 °C, e da amostra de ovo em salmoura R2M, que revelou 40 UFC/g de mesófilos totais a 30 °C ao dia 29 e foi incontável na diluição 10^{-1} no dia 43. Ao dia 57, o maior desenvolvimento microbiano aconteceu na amostra de ovo R2M com contaminação por mesófilos totais a 30 °C de 3×10^5 UFC/g e

por coliformes totais e enterobactérias totais de 3×10^3 UFC/g, não revelando contaminação por *E. coli* (<10 UFC/g), Figura 22. A segunda amostra de ovo cozido mais contaminada foi a R3, com 7×10^3 UFC/g de mesófilos totais a 30 °C, mas não apresentando contaminação por coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais. A amostra de ovo RM apresentou 40 UFC/g de mesófilos totais a 30 °C, tendo resultado negativo para coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais (<10 UFC/g) e a amostra R não apresentou qualquer tipo de contaminação (<10 UFC/g) para os microrganismos mesófilos totais a 30 °C, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias totais. As amostras de ovo cozido R2M e R3, para as análises aos microrganismos onde apresentaram contaminação, estiveram acima dos limites impostos pelo Regulamento 2073/2005 e estabelecidos pela Derovo com base nos valores guia do INSA para o ovo cozido. Já as amostras de ovo R e RM estavam ambas dentro dos limites impostos. Apesar de as amostras mais contaminadas (R3 e R2M) serem as que apresentaram salmoura com pH mais baixo, este elevado desenvolvimento microbiano pode dever-se à elevada manipulação a que estas amostras foram sujeitas aquando da execução da experiência. Este terá de ser um ponto crítico de controlo caso uma solução deste tipo venha a ser implementada. Como a manipulação foi mais baixa no caso da amostra RM e muito mais baixa no caso da amostra R, estas apresentaram menor e nenhuma contaminação, respetivamente. Ainda assim, existe uma grande diferença de contaminação microbiana entre as amostras R2M e R3, podendo aqui o pH mais ácido no caso da salmoura R3 ter sido o fator crucial para impedir maior desenvolvimento microbiano. Tendo em conta que a salmoura RM teve como salmoura definitiva a salmoura S6, salmoura essa que não era viável microbiologicamente na experiência 3 quando utilizada como salmoura única, os resultados mostram que, quando adicionada após lavagem com salmoura referência durante 2 horas, esta salmoura tornou-se microbiologicamente viável podendo ser provada para avaliar as suas características organoléticas.

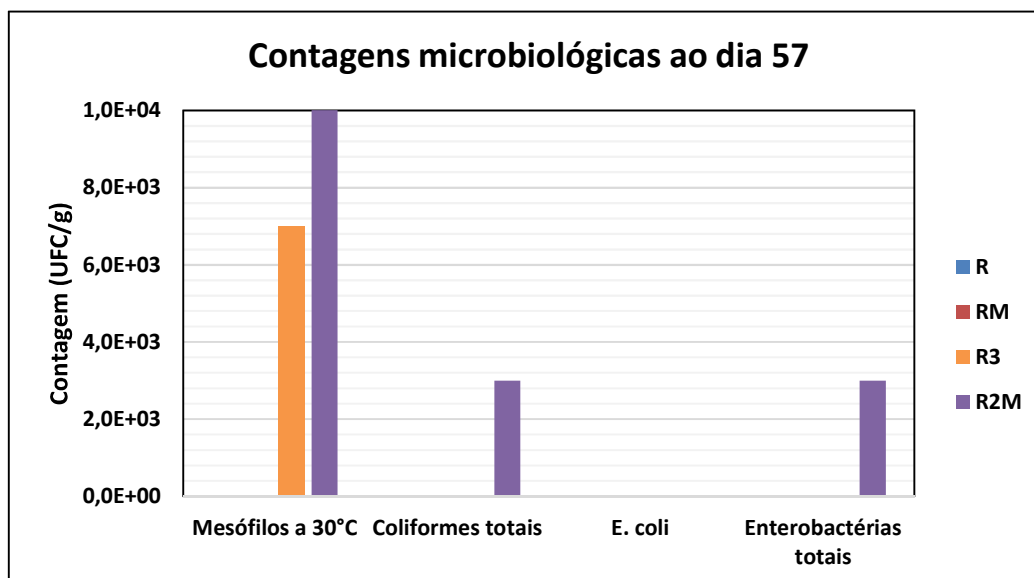


Figura 22 – Análises microbiológicas realizadas aos 57 dias de conservação utilizando pré-salmouras referência. Análises microbiológicas realizadas aos seguintes grupos de microrganismos: Mesófilos totais a 30 °C, Coliformes totais, *Escherichia coli* e Enterobactérias totais.

As amostras de ovo cozido em salmoura R, RM, R2M e R3 foram provadas aos dias 15, 30 e 44 e avaliadas do ponto de vista da sua rigidez, acidez e sabor salgado tendo como referência o ovo cozido acabado de cozer da produção da Derovo, ainda sem qualquer tratamento de conservação. Atribuindo à rigidez do ovo acabado de cozer a classificação de 2 na escala de 1 a 5, aos ovos cozidos ao fim de 15 dias em salmoura, é atribuída a classificação 4 sem distinção de qualquer amostra. No entanto, a rigidez do ovo na salmoura R tende a diminuir ligeiramente, tendo uma classificação de 3 passados 44 dias. Esta tendência de diminuição de rigidez é perceptível na amostra RM, não sendo suficiente para mudança de escala de 4 para 3. A rigidez dos ovos em salmoura R2M e R3 mantiveram a sua rigidez ao longo dos 44 dias. Estas observações mostraram que ao longo do tempo a rigidez do ovo tende a diminuir, mas a lavagem em novas salmouras parece contrariar essa diminuição. Quanto à acidez, classificando com 1 o ovo acabado de cozer, os ovos conservados nas diferentes salmouras durante 15 dias, foram classificados com 4, não havendo diferenças entre si. No entanto, ao fim dos 44 dias de conservação, o ovo conservado na salmoura R manteve a acidez, o ovo das salmouras R2M e R3 aumentou a acidez para uma classificação de 5, ligeiramente menor para a salmoura R2M, e o ovo cozido conservado na salmoura RM diminuiu a acidez para 3. A partir destas observações, é possível concluir que a lavagem com sucessivas salmouras referência leva ao aumento de sabor ácido do ovo cozido. Quando os ovos são lavados apenas uma vez com salmoura referência e colocada salmoura S6, o sabor ácido do ovo

cozido diminui ao longo do tempo, sendo o que mais se aproxima do sabor do ovo acabado de cozer. Quanto ao sabor salgado, classificando o ovo acabado de cozer entre 1 e 2, ao fim de 15 dias, todas as amostras de ovo cozido foram classificadas com 4. No entanto, ao fim de 44 dias, apenas a amostra de ovo RM mostrou diminuição de sabor salgado com classificação entre 2 e 3, tendo as restantes mantido a classificação de 4. Estas observações mostram que, se o ovo for colocado numa salmoura R durante 2 horas e de seguida for colocado numa salmoura M, pode-se reduzir o sabor salgado do ovo, à semelhança do que se verificou com o sabor ácido. Segundo os trabalhadores da Derovo, a amostra mais apreciada, de uma forma global, foi a RM. Quanto à amostra de ovos R2M, foi considerada semelhante à amostra R, sendo a amostra R3 considerada a pior. Os resultados das provas organoléticas mostram que uma lavagem dos ovos com salmoura referência e posterior colocação de nova salmoura S6 pode ajudar a melhorar o sabor dos ovos relativamente aos ovos em salmoura referência, aproximando-se a amostra com salmoura S6 da amostra do ovo cozido acabado de cozer.

Caso fosse implementado um processo de lavagem com salmoura referência e posterior descarte, numa perspetiva de economia circular, a difusão de compostos da clara de ovo para a salmoura poderá levar a que a salmoura adquira propriedades de espumabilidade que permitam a sua aplicação como ingrediente alimentar. Para testar esta hipótese, realizou-se uma experiência em que se bateu a salmoura com um batedor durante 10 minutos. Apesar de alguns segundos após se parar de bater se verificar alguma água no fundo da taça, a espuma continuou consistente (Figura 23).



Figura 23 – Salmoura referência batida durante 10 minutos após 56 dias em contacto com ovos cozidos.

4. Conclusão

Com este trabalho foi possível estudar a importância do sal e de cada um dos ácidos para as características da salmoura e para as características microbiológicas e organolépticas dos ovos cozidos, bem como os compostos que estão envolvidos.

Assim que os ovos são adicionados à salmoura, há um rápido aumento de pH e diminuição de condutividade provocados pela neutralização do ácido pela saída de água e de proteína da clara e pela entrada de sal no ovo, respetivamente. Este aumento de pH poderá ser excessivo caso a concentração de ácidos na salmoura seja baixa, levando ao crescimento microbiológico. O ácido 1 tem uma importância relevante para evitar o aumento excessivo do pH da salmoura e, conseqüentemente, a contaminação microbiológica. No entanto, este é também um ingrediente que potencia a saída de água, proteína e bicarbonato do ovo, tendo como consequência negativa o aumento da rigidez do ovo ao longo do tempo de conservação. Este trabalho mostrou que a presença do ácido 1 nas salmouras é relevante para a sua conservação microbiológica, mas tem que haver um compromisso para que a sua concentração seja mínima de modo a minimizar o seu efeito de saída de compostos do ovo que potenciem a sua rigidez.

A migração de sal e ácidos da salmoura para o ovo e a migração de água, proteína e carbonatos do ovo para a salmoura, são minimizadas pela casca do ovo. No entanto, estas trocas não são afetadas por alteração da temperatura de arrefecimento do ovo cozido nem da temperatura da salmoura aquando da colocação do ovo cozido.

A utilização durante 2 horas de uma pré-salmoura com a composição da salmoura utilizada como referência e a colocação posterior dos ovos numa salmoura reduzida no ácido 1 e com uma maior redução da concentração de sal relativamente à salmoura referência, permite a acidificação do ovo e conseqüente estabilização microbiológica necessária para que os ovos possam ser conservados durante pelo menos 57 dias. Estes ovos, apesar de poderem ter uma rigidez ligeiramente superior aos ovos em salmoura referência, melhoram a perceção organoléptica de acidez e salgado do ovo cozido.

Numa perspetiva de economia circular, a pré-salmoura descartada, devido ao seu elevado conteúdo em proteína, que lhe confere características de espumabilidade, poderá ser utilizada como ingrediente alimentar para outras aplicações.

5. Referências

- Abeyrathne, E. D. N. S., & Ahn, D. U. D. (2017). Function and separation of ovotransferrin from chicken egg. In *Egg Innovations and Strategies for Improvements* (1st ed., pp. 243–249). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00023-8>
- Ambra, R., Lucchetti, S., Moneta, E., Peparai, M., Nardo, N., Baiamonte, I., Di Costanzo, M. G., Saggia Civitelli, E., & Pastore, G. (2016). Effect of partial substitution of sodium with potassium chloride in the fermenting brine on organoleptic characteristics and bioactive molecules occurrence in table olives debittered using Spanish and Castelvetro methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 662–670. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13319>
- Aygun, A. (2017). The eggshell microbial activity. In *Egg Innovations and Strategies for Improvements* (1st ed., pp. 135–144). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00013-5>
- Bedogni, G., & Battistini, N. C. (2002). Effects of cooking and storage on the nutritional value of eggs. In R. R. W. Ph.D. (Ed.), *Eggs and Health Promotion* (1st ed., pp. 177–183). Iowa State Press. <https://doi.org/10.1002/9780470376973.ch17>
- Bovier, E. R., Renzi, L. M., & Hammond, B. R. (2014). A double-blind, placebo-controlled study on the effects of lutein and zeaxanthin on neural processing speed and efficiency. *PLoS ONE*, 9(9), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108178>
- Cegielska-Radziejewska, R., Lesniewski, G., & Kijowski, J. (2009). Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *European Food Research and Technology*, 228, 841–845. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0997-5>
- Chambers, J. R., Zaheer, K., Akhtar, H., & Abdel-Aal, E. S. M. (2017). Chicken eggs. In *Egg Innovations and Strategies for Improvements* (1st ed., pp. 3–11). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00001-9>
- Derossi, A., Fiore, A. G., Pilli, T. De, & Severini, C. (2011). A review on acidifying treatments for vegetable canned food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 955–964. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.491163>
- Derovo. (n.d.). *Derovo*. Retrieved January 20, 2021, from <https://www.derovo.com/>
- Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Hiele, M., Geboes, K., Rutgeerts, P., & Ghoo, Y. (1999). Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *American Physiological Society*, 277(5), 935–943.
- Fischer, J. R., Fletcher, D. L., Cox, N. A., & Bailey, J. S. (1985). Microbiological properties

- of hard-cooked eggs in a citric acid-based preservative solution. In *Journal of Food Protection* (Vol. 48, Issue 3). http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/48/3/252/1650929/0362-028x-48_3_252.pdf
- Guyot, N., Jan, S., Rehault-Godbert, S., Nys, Y., Gautier, M., & Baron, F. (2013). Antibacterial activity of egg white: influence of physico-chemical conditions. *Poultry Science Journal*, 69, 1–15. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01209474>
- Instituto Nacional de Estatística. (2019). Estatísticas Agrícolas 2018. In Instituto Nacional de Estatística (Ed.), *Instituto Nacional de Estatística*.
- Instituto Nacional de Saúde. (n.d.-a). *Ovo (de galinha) cozido*. Instituto Nacional de Saúde. Retrieved June 16, 2021, from <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS086>
- Instituto Nacional de Saúde. (n.d.-b). *Ovo (de galinha) inteiro cru*. Instituto Nacional de Saúde. Retrieved June 16, 2021, from <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS083>
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2019). Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia. In *Lisboa: INSA IP*. http://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/12/INSA_Valores-guia.pdf
- Leśniewski, G., & Kijowski, J. (2007). Lysozyme. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 33–42). Springer.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>
- Ma, B., Guo, Y., Fu, X., & Jin, Y. (2020). Identification and antimicrobial mechanisms of a novel peptide derived from egg white ovotransferrin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 131, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109720>
- Matsuoka, R., Kimura, M., Muto, A., Masuda, Y., Sato, M., & Imaizumi, K. (2008). Mechanism for the cholesterol-lowering action of egg white protein in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(6), 1506–1512. <https://doi.org/10.1271/bbb.80016>
- Miller, J., & Nnanna, I. (1983). Bioavailability of iron in cooked egg yolk for maintenance of hemoglobin levels in growing rats. *Journal of Nutrition*, 113(6), 1169–1175. <https://doi.org/10.1093/jn/113.6.1169>

- Mine, Y., Ma, F., & Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1088–1094. <https://doi.org/10.1021/jf0345752>
- Montville, T. J., Matthews, K. R., & Kniel, K. E. (2012). Food microbiology: An introduction. In ASM Press (Ed.), *ASM Press* (third).
- Nimalaratne, C., Schieber, A., & Wu, J. (2016). Effects of storage and cooking on the antioxidant capacity of laying hen eggs. *Food Chemistry*, 194, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.116>
- Omana, D. A., Wang, J., & Wu, J. (2010). Ovomucin - a glycoprotein with promising potential. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Issue 9, pp. 455–463). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.001>
- Ratliff, J., Leite, J. O., de Ogburn, R., Puglisi, M. J., VanHeest, J., & Fernandez, M. L. (2010). Consuming eggs for breakfast influences plasma glucose and ghrelin, while reducing energy intake during the next 24 hours in adult men. *Nutrition Research*, 30, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.01.002>
- Réhault-Godbert, S., Labas, V., Helloin, E., Hervé-Grépinet, V., Slugocki, C., Berges, M., Bourin, M.-C., Brionne, A., Poirier, J.-C., Gautron, J., Coste, F., & Nys, Y. (2013). Ovalbumin-related protein x is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17285–17295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469759>
- Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82, 632–639. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0032579119449985?token=656A85487A151B34B963EE1510F1933305E2F1B211762376BCE9AA261EABA8E80C7E5B6843457CC97513DE7186A65E1F>
- Ritchie, H. (2017). Meat and Dairy Production. *Our World in Data*.
- Rodrigo, M., Calvo, C., Sanchez, T., Rodrigo, C., & Martínez, A. (1999). Quality of canned mushrooms acidified with glucono- δ -lactone. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(2), 161–166. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1999.00248.x>
- Rose-Martel, M., & Hincke, M. T. (2017). The eggshell proteome yields insight into its antimicrobial protection. In *Egg Innovations and Strategies for Improvements* (1st ed., pp. 157–163). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00015-9>
- Stadelman, W J, & Rhorer, A. R. (1984). Quality Improvement of Hard Cooked Eggs. *Poultry Science*, 63, 949–953.
- Stadelman, William J., & Cotterill, O. J. (1995). *Egg science and technology* (4th ed.). The

Haworth Press.

Steward, K. (2019). *Gram Positive vs Gram Negative*. Technology Networks.

<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>

The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2019). *Egg*. Encyclopædia Britannica.

<https://www.britannica.com/science/egg-biology>

World Health Organization. (2020). *Salt reduction*. WHO; WHO.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>

Xu, L., Zhao, Y., Xu, M., Yao, Y., Wu, N., Du, H., & Tu, Y. (2019). Changes in physico-chemical properties, microstructure, protein structures and intermolecular force of egg yolk, plasma and granule gels during salting. *Food Chemistry*, 275, 600–609.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.078>

Zeisel, S. H., & Costa, K.-A. da. (2009). Choline: an essential nutrient for public health.

Nutrition Reviews, 67(11), 615–623. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x>

Zhu, C., Sawrey-Kubicek, L., Bardagjy, A. S., Houts, H., Tang, X., Sacchi, R., Randolph, J. M., Steinberg, F. M., & Zivkovic, A. M. (2020). Whole egg consumption increases plasma choline and betaine without affecting TMAO levels or gut microbiome in overweight postmenopausal women. *Nutrition Research*, 78, 36–41.

<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.04.002>