

Fabiani Cristina de Oliveira Santana

**CARACTERIZAÇÃO, CAPACIDADE ESPUMANTE E
ESTABILIDADE DE ESPUMAS DE CLARAS DE OVOS
FRESCAS, PASTEURIZADAS E DESIDRATADAS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Maria Olivera Müller

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santana, Fabiani Cristina de Oliveira
Caracterização, capacidade espumante e
estabilidade de espumas de claras de ovos frescas,
pasteurizadas e desidratadas / Fabiani Cristina de
Oliveira Santana ; orientador, Carmen Maria de
Oliveira Müller - SC, 2017.
194 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Espumas. 3.
Proteínas da clara de ovo. 4. Capacidade espumante .
5. Morfologia esférica e poliédrica. I. Müller,
Carmen Maria de Olivera. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos. III. Título.

Fabiani Cristina de Oliveira Santana

**CARACTERIZAÇÃO, CAPACIDADE ESPUMANTE E
ESTABILIDADE DE ESPUMAS DE CLARAS DE OVOS
FRESCAS, PASTEURIZADAS E DESIDRATADAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos

Florianópolis, 2 de março de 2017.

Prof.^a, Dr.^a Renata Dias de Mello Amboni
Coordenadora (UFSC)

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Carmen Maria Olivera Müller
Orientadora (UFSC)

Prof.^a, Dr.^a Marilde Terezinha Bordignon Luiz
Membro (UFSC)

Prof., Dr. Giustino Tribuzi
Membro (UFSC)

Prof., Dr. José Miguel Müller
Membro (UFSC)

Dedico esse trabalho ao meu companheiro Fábio Bartolomeu Santana por ter sido um grande parceiro e incentivador para a realização desse trabalho. Amo-te!

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer! Inclusive à pessoas que nunca conheci e que, provavelmente, nunca conhecerei pessoalmente, mas que sem dúvida, foram decisivas para a concretização desse momento. À essas pessoas, tais como aos Excelentíssimos ex presidentes da república, Senhor Luiz Inácio Lula da Silva e a Senhora Dilma Rouseff, cuja ações de inclusão social e incentivo à educação me permitiram sonhar mais alto, mais do que jamais sonhei. E aos Excelentíssimos digo, fui a primeira da minha família a ingressar em uma universidade pública e serei a primeira novamente a conquistar um título de Mestra. Portanto, meu muito obrigada!

À minha família toda minha gratidão e amor! Agradeço todo o incentivo, carinho e compreensão, especialmente ao meu companheiro da vida, Fábio B. Santana, meu maior incentivador e amigo, que foi capaz de tornar essa jornada mais suave. Aos meus filhos Bianka e Leonardo, agradeço por compartilharem seu amor e por deixarem minha vida mais completa. À minha querida mãe Nelzi agradeço por ser um exemplo de persistência, de mulher guerreira e por me permitir sonhar sem julgamentos.

Aos amigos agradeço a paciência!

Ao grupo de pesquisa Polimat agradeço todo apoio e companheirismo, especialmente ao querido Samuel e minha amiga Fernanda Coutinho pela amizade, carinho e ensinamentos dentro e fora da ciência.

À querida amiga Karoline Panato, agradeço por compartilhar essa jornada junto comigo.

Ao professor Alfredo Tibúrcio, toda minha admiração! Obrigada por me acolher e por me considerar como um membro do seu grupo de pesquisa, me tratando sempre com carinho, atenção e respeito.

À professora Edna Regina Amante, agradeço por todo carinho e aprendizagem.

Ao professor Jose Miguel Müller agradeço pelo auxílio nas análises de viscosidade e por ser sempre muito atencioso, paciente e solícito.

Agradeço ao LAMEB/CCB pelas diversas sessões de microscopia e por enriquecer esse trabalho com imagens lindas.

Aos docentes do PPGCAL agradeço pelos ensinamentos compartilhados e pela dedicação durante as aulas.

Ao CNPq, agradeço o auxílio financeiro e a UFSC agradeço por todas as oportunidades à mim cedidas, sendo ambos de fundamental importância para que esse trabalho fosse concretizado.

Por último agradeço àquela ao qual tenho imensa admiração e que considero uma grande parceira, minha orientadora Carmen Maria Olivera Müller. A você minha querida, cujo carinho me é inestimável, atribuo um dos grandes aprendizados que obtive nessa jornada: o poder da confiança!

E à você dedico uma frase do uruguaio Eduardo Galeano:

“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente, o que fazemos para mudar o que somos.” (Eduardo Galeano)

Obrigada por me ajudar a mudar o que eu sou!

RESUMO

As claras de ovo na sua forma fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada (S) foram caracterizadas físico-quimicamente e avaliadas quanto à capacidade espumante e estabilidade. Com relação à caracterização, as claras apresentaram pH entre 9,1 e 9,5 e teores de umidade e proteínas de acordo com o disposto na literatura. A análise de açúcares redutores indicaram valores decrescentes entre as claras F, P e S de 0,55; 0,32 e 0,20 %, respectivamente, que foi atribuído a ocorrência da reação de Maillard durante os tratamentos térmicos aos quais as claras P e S foram submetidas. Nos ensaios de cor todas as claras apresentaram coloração amarela esverdeada, atribuída a presença de riboflavina. A clara F apresentou maior luminosidade e a clara S apresentou maior índice de escurecimento (IE), indicando que o processamento térmico causou escurecimento em virtude da ocorrência da reação de Maillard, corroborando com os ensaios de açúcares redutores. No que se refere à viscosidade, as claras apresentaram comportamento pseudoplástico embora a clara F tenha apresentado maior viscosidade (3,67 mPa.s⁻¹), seguida pelas claras P e S (2,70 e 2,65 mPa.s⁻¹, respectivamente). A degradação térmica (TGA) das claras ocorreu até 500 °C, apresentado três estágios, que foram atribuídos à perda de água (67 °C) e a degradação térmica das proteínas (292 e 315 °C). Através das análises de calorimetria exploratória de diferencial (DSC) foram identificados quatro picos endotérmicos na faixa de temperatura entre 56 e 85 °C em todas as claras, sendo atribuídos a desnaturação das proteínas ovotransferrina, lisozima, ovalbumina e S-ovalbumina. As claras P e S apresentaram a menor entalpia de desnaturação indicando que nestas amostras ocorreu uma prévia perda parcial da estrutura conformacional das proteínas em função dos tratamentos térmicos aos quais foram submetidas. As claras P e S também apresentaram os menores valores de tensão superficial em relação à clara fresca, sugerindo que o tratamento térmico alterou a atividade de superfície das proteínas destas claras. Os ensaios com as espumas mostraram curvas de % *overrun* com comportamento similar apresentando aumento até atingir o *overrun* máximo com posterior declínio. A clara F apresentou maior capacidade espumante durante todo o ensaio (1.153 %) seguida da clara S (677 %) e P (560 %), cuja diferença foi atribuída a melhor atividade de superfície das proteínas contidas na clara F. Nos ensaios de estabilidade, a clara S apresentou a espuma menos estável, com maiores valores de drenado (% DR) e menor tempo de meia vida, quando comparada as demais claras, devido

a ação da gravidade, diferença de pressão e às forças de repulsão e atração no sistema coloidal. Os ensaios de microscopia óptica de fluorescência das medidas de *overrun* evidenciaram a geometria poliédrica das bolhas das espumas da clara F e mais esférica para as espumas das claras P e S e permitiram observar a espessura das películas, a presença dos filmes lamelares e das bordas de *Plateau*, mostrando os efeitos da incorporação de ar na estrutura da espuma formada. Durante os ensaios de estabilidade observou-se movimento dinâmico no sistema, saindo de um sistema mais denso de pequenas bolhas para um sistema menos denso de grandes bolhas, onde foram identificados os fenômenos de desestabilização de *creaming*, *coarsening*, maturação de Ostwald e coalescência em todas as espumas, embora a intensidade dos mesmos tenha sido diferente em função da amostra. Desta forma foi concluído que o processo de pasteurização e desidratação aos quais as claras P e S foram submetidas podem ter favorecido nessas claras o escurecimento, a redução da atividade de superfície das proteínas, reduzido a viscosidade e aumentado a tensão superficial, o que ocasionou a redução da capacidade espumante de ambas as claras e o comportamento menos estável da clara S, quando comparadas a clara F.

Palavras-chave: claras, proteínas, *overrun*, estabilidade, filmes lamelares e borda de *Plateau*, geometria poliédrica e esférica.

ABSTRACT

Egg whites in their fresh (F), pasteurized (P) and dehydrated (S) form were characterized physicochemically and evaluated for foaming ability and stability. Regarding the characterization, the egg whites presented pH between 9.1 and 9.5 and moisture and protein contents according to the literature. The analysis of reducing sugars indicated decreasing values between the egg whites F, P and S of 0.55; 0.32 and 0.20%, respectively, which were attributed to the occurrence of the Maillard reaction during the heat treatments to which the P and S whites were submitted. In the color tests all the egg whites presented greenish yellow coloration, attributed to the presence of riboflavin. The egg white F presented higher luminosity and the white S presented a higher darkening index (IE), indicating that the thermal processing caused darkening due to the occurrence of the Maillard reaction, corroborating with the reductive sugars tests. Regarding the viscosity, the egg whites presented pseudoplastic behavior although the egg white F had a higher viscosity ($3.67 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$), followed by the whites P and S (2.70 and $2.65 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively). The thermal degradation (TGA) of the egg whites occurred up to 500°C , presented three stages, which were attributed to water loss (67°C) and thermal degradation of proteins (292 and 315°C). Through the exploratory scanning calorimetry (DSC) analyzes, four endothermic peaks were identified in the temperature range between 56 and 85°C in all the egg whites, with the denaturing of the ovotransferrin, lysozyme, ovalbumin and S-ovalbumin proteins being identified. The P and S egg whites showed the lowest enthalpy of denaturation indicating that in these samples there was a previous partial loss of the conformational structure of the proteins as a function of the thermal treatments to which they were submitted. The P and S egg whites also presented the lowest values of surface tension in relation to the fresh egg white, suggesting that the thermal treatment altered the surface activity of the proteins of these whites. The tests with the foams showed % *overrun* curves with similar behavior showing increase until reaching the maximum *overrun* with subsequent decline of the curve. The egg white F showed higher foaming capacity during the whole test time (1.153%) followed by the clear S (677%) and P (560%), whose difference was attributed to the better surface activity of the proteins contained in the egg white F. Stability, the egg white S was the less stable foam, presenting higher values of drainage (% DR) and lower half - life time, when compared to other egg whites, due to the action of gravity, pressure difference and repulsion forces and attraction in the

colloidal system. The fluorescence optical microscopy tests in the *overrun* tests evidenced the polyhedral geometry of the egg white F and more spherical for the egg whites P and S and allowed to observe and thickness of the films, the presence of the lamellar films and the borders Plateau, showing the effects of the incorporating air into the formed foam structure. During the stability tests, we observed a dynamic movement in the system, moving from a denser system of small bubbles to a less dense system of large bubbles, where phenomena were identified as destabilization of creaming, coarsening, Ostwald maturation and coalescence in all foams although the intensity of the same was different according to the sample. In this way it was concluded that the pasteurization and dehydration process to which the P and S egg whites were submitted may have favored the darkening, reduction of the surface activity of the proteins, reduced viscosity and increased surface tension, which reduction of the foaming capacity of both egg whites and the less stable behavior of the egg white S, when compared to egg white F.

Keywords: Egg whites, proteins, *overrun*, stability, lamellar films, borders *Plateau*, polyhedral and spherical geometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da constituição do ovo de galinha (<i>Gallus domesticus</i>).....	30
Figura 2 - Separação da gema do ovo em duas frações: amarelo claro (plasma) e amarelo escuro (grânulos)	33
Figura 3 - Evolução da produção de ovos de galinha no Brasil por trimestre no período de 2011 a 2016.....	35
Figura 4 - Diagrama esquemático da separação de clara e gema de ovo por pratos (A) e por drenagem (B).....	38
Figura 5 - Fluxograma da produção de ovoprodutos para obtenção de clara pasteurizada líquida e clara desidratada.	39
Figura 6 - Representação ilustrativa do processo de atomização (<i>spray drying</i>).....	43
Figura 7 - Domínio do lóbulo N - (A) e domínio do lóbulo C (B) da ovotransferrina	48
Figura 8 - Estrutura primária da lisozima composta por 129 resíduos de aminoácidos.....	50
Figura 9 - Diagrama esquemático do processo de desnaturação induzido pelo calor e formação de agregados de ovalbumina.....	56
Figura 10 - Sequência da formação de espuma a partir de solução aquosa com tensoativo aniônico.....	62
Figura 11 – Ilustração sugerindo as etapas da formação de espuma em função da capacidade espumante.	67
Figura 12 - Ilustração esquemática da geometria das espumas em função da fração da fase gasosa (ϕ)	69
Figura 13 – Ilustração indicando a presença da lamela permeando as bolhas da espuma	70
Figura 14 - Ilustração generalizada da região de união entre três filmes adjacentes de bolhas com formato poliédrico, indicando a formação das bordas de <i>Plateau</i>	71
Figura 15 - Mecanismos de desestabilização das espumas	74

Figura 16 – Ilustração sugerindo o processo de difusão de gás entre bolhas vizinhas com raios diferentes, conhecido como maturação de Ostwald	76
Figura 17 – Diagrama ilustrativo sugerindo o fenômeno de coalescência em bolhas que compõem a espuma.....	78
Figura 18 - Preparo das amostras de clara fresca.....	82
Figura 19 - Reconstituição da clara desidratada.....	83
Figura 20 - Tensão superficial pelo método do anel Du Noüy	87
Figura 21 - Sequência esquemática da drenagem da espuma durante um período de repouso.....	91
Figura 22 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência com ampliação de 100 vezes das espumas de clara desidratada reconstituída (S) para observação do fenômeno de autofluorescência.	101
Figura 23 - Curvas da viscosidade (mPa.s) em função da taxa de deformação (s^{-1}) para as claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída(S).....	106
Figura 24 - Modelo matemático de Ostwal-of-Waele ajustado aos dados experimentais de tensão de cisalhamento (mPa.s) e taxa de deformação (s^{-1}) para as claras F, P e S.	108
Figura 25 - Termogramas TGA (A) e DTG (B) das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada (S).....	110
Figura 26 - Curvas dos termogramas da análise em DSC das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).	112
Figura 27 - Curvas das médias e desvio padrão do <i>overrun</i> (%) (capacidade espumante) das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída S).	122
Figura 28 - Imagens dos ensaios de <i>overrun</i> das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).	131
Figura 29 - Curvas das médias e desvio padrão do <i>overrun</i> (%), densidade ($g.cm^{-3}$) e fração da fase gasosa (ϕ) das espumas das claras fresca (A), pasteurizada (B) e desidratada reconstituída (C).....	137
Figura 30 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência das análises de <i>overrun</i> das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) nos três primeiros minutos de batimento,	

no <i>overrun</i> máximo e no final do batimento, com ampliação de 40 vezes	140
Figura 31 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência com ampliação de 100 vezes, dos ensaios de <i>overrun</i> no tempo de 18 minutos das espumas das claras fresca (A) e desidratada reconstituída (B)	148
Figura 32 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de <i>overrun</i> das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) no tempo de batimento de três minutos, com ampliação de 100 X (A) e 400 X (B) indicando regiões de filmes proteicos e suas respectivas espessuras	150
Figura 34 - Cinética de estabilidade das médias e desvio padrão do drenado (% DR) das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), durante os ensaios de estabilidade.	158
Figura 35 - Imagens das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), durante os ensaios de estabilidade, obtidas antes de iniciar o ensaio de drenagem e após os 120 minutos de drenagem.	158
Figura 36 - Imagens capturadas durante os ensaios de drenagem apontando o tempo de meia vida das espumas de clara fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).....	159
Figura 37 – Avaliação das mudanças estruturais dinâmicas das espumas das claras fresca (imagens A – D), pasteurizada (Imagens E – H) e desidratada reconstituída (imagens I – L) nos tempos de 0, 40, 90 e 120 minutos dos ensaios de estabilidade com auxílio de microscopia óptica de fluorescência com ampliação de 40 vezes	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional da clara, gema e do ovo inteiro sem casca em 100g	30
Tabela 2 - Características físico-químicas das proteínas presentes na clara de ovo.	45
Tabela 3 - Comprimento de onda de excitação e emissão dos filtros para imagem de fluorescência das espumas da clara	86
Tabela 4 - Teores de umidade, proteína e pH para claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).....	95
Tabela 5 - Análise colorimétrica das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).	98
Tabela 6 - Parâmetros reológicos à temperatura de 25 °C das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) para os Modelos de Ostwald-of-Waele e Newtoniano.	103
Tabela 7 - Valores de T_d e ΔH_d para claras frescas, pasteurizadas e desidratadas, reportados na literatura	113
Tabela 8 - Médias e desvio padrão dos valores do <i>overrun</i> (%) (capacidade espumante) das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) para cada tempo de batimento.	124
Tabela 9 - Comparação das médias e desvio padrão dos valores de <i>overrun</i> nos tempos de três minutos, no tempo do <i>overrun</i> máximo e no tempo final de batimento, para as claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).	130
Tabela 10 - Valores médios e desvio padrão das medidas de densidade das claras e das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (P) do líquido (tempo 0) e das medidas das espumas após três minutos de batimento, no <i>overrun</i> máximo e no final do batimento.....	132
Tabela 12 - Médias e desvio padrão dos ensaios de fração da fase gasosa (ϕ) das espumas de claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).	134
Tabela 13 - Médias e desvio padrão do número de bolhas obtidas pelo tratamento das imagens de microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de <i>overrun</i> das claras (F), pasteurizada (P) e desidratada	

reconstituída (S), referentes os tempos de três minutos, *overrun* máximo e tempo final. 145

Tabela 14 - Médias e desvio padrão das medidas de espessura dos filmes interfaciais das espumas elaboradas a partir das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), nos tempos de três minutos de batimento, no *overrun* máximo e no final do batimento .. 151

Tabela 15 - Média e desvio padrão da drenagem (% DR) dos ensaios de estabilidade das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) nos tempos: 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos..... 154

Tabela 16 - Número de bolhas das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), das imagens A – L dos ensaios de estabilidade com auxílio de microscopia óptica de fluorescência nos tempos de 0, 40, 90 e 120 minutos. 167

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês: <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTA	Derivada da TGA
F	Clara fresca
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (do inglês: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
HTST	<i>High Temperatur, Short Time</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITAL	Instituto Adolfo Lutz
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
P	Clara pasteurizada
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
S	Clara desidratada
T _d	Temperatura de desnaturação
TGA	Análise termogravimétrica
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
% DR	Porcentagem do drenado
ΔH _d	Variação de entalpia de desnaturação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	OBJETIVOS	26
1.1.1	Objetivo geral.....	26
1.1.2	Objetivos específicos	26
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	OVO DE GALINHA (<i>Gallus domesticus</i>)	29
2.1.1	Produção e de consumo de ovos.....	34
2.2	PRODUTOS DE OVOS (OVOPRODUTOS).....	36
2.2.1	Clara de ovo pasteurizada líquida.....	39
2.2.2	Clara de ovo desidratada	40
2.3	PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO.....	44
2.3.1	Ovalbumina	46
2.3.2	Ovotransferrina	47
2.3.3	Ovomucóide.....	49
2.3.4	Lisozima.....	49
2.3.5	Ovomucina.....	51
2.3.6	Proteínas em menor concentração	52
2.4	EFEITOS DO PROCESSAMENTO E DO TEMPO DE ESTOCAGEM NAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO	53
2.4.1	Efeito da temperatura de processamento	54
2.4.2	Efeito do pH e do cisalhamento	57
2.4.3	Efeito das condições e do tempo de estocagem	58
2.5	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS.....	59
2.6	ESPUMAS	60
2.6.1	Atividade de superfície das proteínas e formação de espuma	63
2.6.2	Capacidade espumante (<i>Overrun</i>) e fração da fase gasosa (ϕ)	66
2.6.3	Pressão de Laplace.....	71
2.6.4	Estabilidade	73

2.6.4.1	<i>Drenagem</i>	74
2.6.4.2	<i>Coarsening</i>	75
2.6.4.3	<i>Maturação de Ostwald</i>	76
2.6.4.4	<i>Creaming</i>	77
2.6.4.5	<i>Coalescência</i>	77
2.6.5	Estudos que buscam melhorar a capacidade espumante e a estabilidade de espumas a partir de clara de ovo.	79
3	MATERIAL E MÉTODOS	81
3.1	AMOSTRAS	81
3.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	81
3.2.1	Clara Fresca	81
3.2.2	Clara pasteurizada líquida refrigerada	82
3.2.3	Clara desidratada (reconstituída)	82
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS CLARAS.....	83
3.3.1	Medida do pH	83
3.3.2	Teor de umidade	84
3.3.3	Determinação da fração proteica	84
3.3.4	Determinação do teor de açúcares redutores pelo método do ácido dinitro 3,5-salicílico (ADNS)	84
3.3.5	Análise colorimétrica (cor)	85
3.3.6	Autofluorescência	85
3.3.7	Viscosidade aparente (η_a)	86
3.3.8	Determinação da tensão superficial	87
3.3.9	Análise termogravimétrica (TGA)	88
3.3.10	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	88
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS ESPUMAS	89
3.4.1	Capacidade espumante	89
3.4.1.1	<i>Overrun</i>	89
3.4.1.2	<i>Fração da fase gasosa</i>	90
3.4.1.3	<i>Densidade</i>	90
3.4.2	Estabilidade das espumas	91
3.4.2.1	<i>Porcentagem de drenado</i>	91

3.4.2.2	<i>Tempo de meia vida</i>	92
3.4.3	Análise microestrutural por microscopia óptica de fluorescência	92
3.4.3.1	<i>Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de overrun</i>	92
3.4.3.2	<i>Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de estabilidade: avaliação das mudanças estruturais dinâmicas</i>	93
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	93
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS CLARAS.....	95
4.1.1	Umidade, pH, proteína e açúcares redutores	95
4.1.2	Cor das claras F, P e S.....	98
4.1.3	Autofluorescência.....	100
4.1.4	Viscosidade aparente	102
4.1.5	Análise termogravimétrica (TGA)	109
4.1.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	112
4.1.7	Tensão superficial	118
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS ESPUMAS	122
4.2.1	<i>Overrun</i> , densidade e fração da fase gasosa	122
4.2.2	Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de <i>overrun</i>	139
4.2.3	Porcentagem de drenado e tempo de meia vida	154
4.2.4	Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de estabilidade: avaliação das mudanças estruturais dinâmicas ..	161
5	CONCLUSÃO	175
	REFERÊNCIAS	177

1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos, os ovos são considerados como um ingrediente multifuncional, podendo ser incorporados em diversos sistemas alimentares incrementando o valor nutricional, conferindo cor, aroma e sabor (*flavour*), bem como, melhorando as propriedades de emulsificação, de formação de espumas e de gelificação (KIOSSEOGLU; PARASKEVOPOULOU, 2006). Dentre os componentes do ovo, a clara (albúmen) é responsável pela maior fração, sendo composta basicamente por água e proteínas, destacando-se devido a suas propriedades funcionais, especialmente por atuarem como bons agentes espumantes (MINE; ZHANG, 2013). A clara pode ser usada em sua forma fresca ou como ovoproduto, seja na forma desidratada, pasteurizada, congelada ou como um componente isolado (MINE, 2002; STRIXNER; KULOZIK, 2011). De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) o comércio mundial de ovoprodutos tem crescido em ritmo acelerado dado que a exportação de ovos desidratados e pasteurizados no mundo mais que dobrou entre o período de 2003 a 2013. Embora no Brasil a produção de ovoprodutos não seja ainda muito significativa, estudos apontam que há potencial de crescimento para esses produtos no país (AMARAL et al., 2015; FAOSTAT, 2017).

Embora o processamento de claras para obtenção de claras pasteurizadas e desidratadas apresente diversas vantagens a esses produtos quando comparados à clara na sua forma fresca, estudos apontam que as etapas empregadas no processamento podem levar a alterações químicas e físicas dos componentes da clara, especialmente de suas proteínas. Estas modificações são mais intensas quanto mais elevadas forem as temperaturas empregadas durante a etapa de tratamento térmico, uma vez que a clara é uma mistura complexa de proteínas com diferentes temperaturas de desnaturação, fazendo com que o tratamento térmico afete de maneira diferente cada uma delas (CLARK; JUNG; LAMSAL, 2014; HAMMERSHØJ et al., 2006).

Alterações estruturais nas proteínas, devido ao processamento, causam mudanças nas suas propriedades funcionais, sendo assim a capacidade espumante das claras pode ser afetada uma vez que a atividade de superfície das proteínas pode ser prejudicada, principalmente devido à ocorrência da desnaturação proteica (LECHEVALIER et al., 2011). A espuma é um sistema coloidal que consiste em uma massa de bolhas de ar dispersas em um líquido,

separados por uma fina película. Na indústria de alimentos as espumas são importantes por sua contribuição no volume e na textura de produtos alimentares, pois a incorporação de ar reduz a densidade do produto e aumenta seu volume (SCHRAMM, 2014; USTUNOL, 2015 a).

Devido à importância do uso de ovoprodutos de claras, bem como, da aplicação de espumas para obtenção de produtos específicos pela indústria de alimentos, estudos que avaliam os efeitos dos processamentos nas claras, bem como as implicações nas suas propriedades espumantes são pouco explorados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar físico-quimicamente as claras de ovos fresca, pasteurizada líquida e desidratada e avaliar a capacidade espumante, a estabilidade das espumas obtidas a partir dessas claras e caracteriza-las morfológicamente.

1.1.2 Objetivos específicos

Avaliar as claras fresca, pasteurizada e desidratada quanto ao teor de umidade, teor de proteínas, pH e concentração de açúcares redutores.

Caracterizar às claras quanto à cor com auxílio da escala de cor CIELab, pelo índice de escurecimento (IE) e pela diferença total de cor (ΔE^*).

Analisar as claras quanto a presença de elementos auto fluorescentes, com auxílio de microscopia óptica de fluorescência.

Determinar a viscosidade e a tensão superficial da clara fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída.

Avaliar, utilizando as técnicas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) o comportamento de

degradação térmica, temperaturas de desnaturação e variação de entalpia de desnaturação das proteínas presentes nas claras.

Caracterizar as claras quanto a capacidade espumante, através dos ensaios de % *overrun*, fração da fase gasosa (ϕ) e densidade.

Avaliar a estabilidade das espumas, com auxílio dos ensaios de % drenado (% DR) e determinação do tempo de meia vida.

Caracterizar morfológicamente as espumas utilizando a técnica de microscopia óptica de fluorescência durante as medidas de % *overrun* e % DR.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

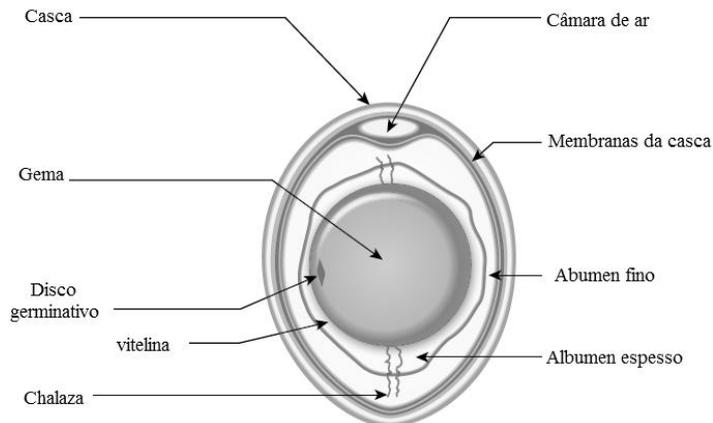
2.1 OVO DE GALINHA (*Gallus domesticus*)

O ovo de galinha (*Gallus domesticus*) é um importante elemento da dieta humana, sendo um dos poucos alimentos usado em todo mundo (MINE, 2002). Além disso, é muito versátil, podendo ser consumido *in natura* e como parte de diversos produtos manufaturados (STRIXNER; KULOZIK, 2011).

Os ovos são ingredientes desejáveis em muitos alimentos e são classificados pela indústria como um alimento multifuncional. Podem ser incorporados em diversos sistemas alimentares com o intuito de incrementar o valor nutricional, conferir cor, aroma e sabor (*flavour*), melhorar as propriedades de emulsificação (gema), formação de espuma e gelificação (clara) (KIOSSEOGLOU; PARASKEVOPOULOU, 2006). Devido a essas características físico-químicas, o ovo tornou-se um importante ingrediente na indústria de alimentos podendo ser usando em sua forma fresca, desidratado, pasteurizado, congelado ou como um derivado isolado. Desta maneira, pode ser incorporado em produtos tais como maionese, bolos, merengues, molhos de salada, macarrão, produtos de confeitaria, formulados cárneos, entre outros. Sua aplicação em diversos produtos se deve não apenas ao seu valor nutricional, mas também por suas características sensoriais e propriedades funcionais (MINE, 2002; STRIXNER; KULOZIK, 2011).

O ovo pode ser separado em três partes principais: casca (9 a 11 %), clara (60 a 63 %) e gema (28 a 30 %) (Figura 1), embora sua composição possa variar com a idade, linhagem, estirpe, deita da galinha e variações individuais entre galinhas, bem como, condições e o tempo de armazenagem dos ovos após a postura (ARAÚJO et al., 2015).

Os ovos são constituídos principalmente por água, que varia entre 74,8 e 75,8 %, proteínas cujo teor se encontra entre 12 e 13 %, lipídeos com teores entre 9,4 e 12 % e minerais, vitaminas e carboidratos que totalizam aproximadamente 2 %. Os ovos não contêm fibra dietética e se caracterizam por apresentar baixos teores de carboidratos (LOPÉZ-FANDIÑO, 2007; POWRIE; NAKAI, 1986; KOVACS-NOLAN; PHILLIPS; MINE, 2005; LI-CHAN; KIM, 2008; MINE, 2015 WALSH, 2014).

Figura 1 - Ilustração da constituição do ovo de galinha (*Gallus domesticus*)

Fonte: Adaptado de Mine e Zhang (2013).

Do ponto de vista nutricional, o ovo oferece uma fonte de proteínas de alta qualidade, bem como fonte de minerais, tais como cálcio, ferro, magnésio, potássio, zinco, selênio e de vitaminas lipossolúveis como D, E, K, riboflavina, niacina, retinol entre outras (WALSH, 2014). A composição nutricional mais detalhada do ovo inteiro, clara e gema, sem a casca ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional da clara, gema e do ovo inteiro sem casca em 100g

Nutrientes	Clara	Gema	Ovo
Proporção (g)	60	30,7	90,7
Energia (kcal)	47	64	154
Água (g)	88,6	49	74,4
Proteína (g)	10,6	16,1	12,3
Carboidratos (g)	0,8	0,5	0,7
Cinzas (g)	0,5	0,9	4,6
Lipídeos (g)	0,1	34,5	11,9
Triglicérides (g)	-	22,9	7,7
Fosfolipídeos (g)	-	10,0	3,4
Colesterol (g)	-	1,2	0,42

Continuação tabela...

Nutrientes	Clara	Gema	Ovo
Lecitina (mg)	-	7,2	9,5
Ácidos graxos saturados (g)		13,0	4,4
Ácidos graxos insaturados (g)		20,7	7,0
<u>Aminoácidos essenciais (mg)</u>			
Isoleucina	230	410	290
Leucina	560	870	660
Lisina	880	1.390	1.040
Metionina + Cisteína	660	1.170	820
Fenilalanina + Tirosina	670	660	640
Treonina	1.020	1.420	1.150
Triptofono	470	850	590
<u>Minerais (mg)</u>			
Sódio	155	50	20
Cloro	175	162	172
Potássio	140	100	125
Cálcio	8	133	50
Fósforo	18	530	193
Ferro	0,1	4,8	1,7
Magnésio	10	15	12
Enxofre	163	165	164
Zinco	0,12	3,9	1,4
Cobre	0,02	0,14	0,06
Manganês	0,007	0,11	0,04
Iodo	0,003	0,14	0,05
<u>Vitaminas (µg)</u>			
A, retinol equivalente	-	450	150
D	-	4,5	1,5
E	-	3.600	1.200
B1	10	250	913
B2	430	480	447
Ácido Fólico	12	140	56
Niacina	90	60	79
Biotina	7	60	79

Fonte: Adaptado de López-Fandiño (2007)

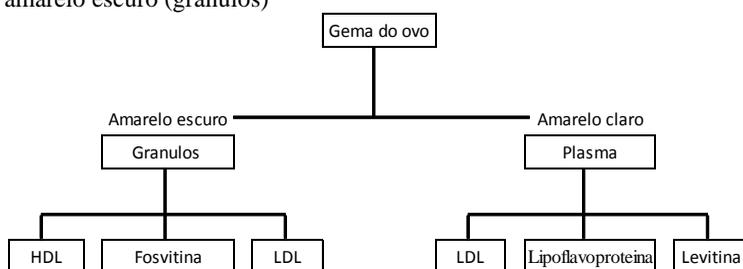
A casca parte não comestível do ovo, é constituída por aproximadamente 95 % de minerais, principalmente cálcio, e outros como magnésio e fósforo. Cerca de 3,5 % da matéria orgânica da casca é composta de proteínas, ácidos graxos e polissacarídeos. A casca é formada por uma estrutura policristalina composta principalmente de carbonato de cálcio (98 %) entrelaçado com proteínas, uma cutícula e duas membranas. A cutícula é uma camada orgânica fina composta por 90 % de proteínas insolúveis, 5 % de carboidratos e 3 % de cinzas, que recobre a camada de cristal mineral da casca onde se localiza cerca de 7.000 - 17.000 pequenos poros, responsáveis pela realização das trocas gasosas (CO₂ e O₂). As membranas ficam localizadas no interior da casca, chamadas de membrana externa e interna. Essas membranas circundam o albúmen e formam a câmara de ar e sua constituição é basicamente de proteínas como colágeno e proteínas matrizes (ovalbumina, lisozima e ovotransferrina). A função da cutícula bem como das membranas da casca é de aumentar o sistema de defesa antimicrobiana do ovo (LI-CHAN; KIM, 2008; MINE, 2015; MINE; ZHANG, 2013).

A gema é uma emulsão de gordura em água circundada pela membrana vitelina, constituída por um sistema complexo que contém partículas (grânulos) em suspensão em um fluido de cor amarelo claro denominado plasma (ANTON, 2007; LI-CHAN; KIM, 2008). A gema contém menos água do que a clara (~ 49 %) e teores mais elevados de proteínas e lipídeos que correspondem a aproximadamente 16 % e 35 %, respectivamente, e o restante é composto por minerais e vitaminas. É considerada uma fonte altamente biodisponível de carotenoides, luteína e zeaxantina (responsáveis pela coloração da gema) (ARAÚJO et al., 2015; MINE, 2015). Uma parcela das proteínas da gema se encontra ligada aos lipídeos formando lipoproteínas. As proteínas e as lipoproteínas estão dispersas em camadas de cor distintas na gema e, quando separadas, dois tipos de emulsões de composições distintas são observados: a fração amarelo escura e a fração amarelo clara (ANTON, 2007).

Os grânulos (fração amarelo escura) possuem agregados de proteínas insolúveis cuja concentração proteica é cerca de três vezes maior do que no plasma. São constituídos por lipoproteínas de alta densidade (HDL), fosvitina e pequena proporção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Enquanto o plasma (fração amarelo clara) contém LDL, livetina e lipoflavoproteína (fração proteica solúvel) e

possui maior conteúdo de lipídeos do que nos grânulos (MINE, 2015; MINE; ZHANG, 2013). Para melhor compreensão, essas frações são apresentadas no fluxograma da Figura 2. As LDLs são estruturas micelares compostas por proteínas (14 %) e lipídeos (86 %). São constituídas por apoproteínas (proteínas de lipoproteínas) e fosfolipídeos. Apresentam propriedades anfífilas e podem ser dispersas na interface óleo-água (o/w - do inglês *oil/water*), sendo componentes essenciais para as propriedades emulsificantes da gema (MINE; ZHANG, 2013).

Figura 2 - Separação da gema do ovo em duas frações: amarelo claro (plasma) e amarelo escuro (grânulos)



Fonte: Adaptado de Mine (2015)

A clara, também denominada de albúmen, envolve a gema mantendo-a centralizada e protegendo-a contra impactos mecânicos (ARAÚJO et al., 2015). A clara é a maior fração constituinte de ovo sendo formada em sua maioria por água (86 a 88 %) e proteínas (9,7 a 11 %) e apresentando baixos teores de minerais e lipídeos. Os carboidratos, cujo teor está em torno de 1 % podem estar presentes na forma livre (98 % glicose) ou associados às proteínas (ANTON, 2007; KOVACS-NOLAN; PHILLIPS; MINE, 2005; LI-CHAN; KIM, 2008; MINE, 1995; MINE, 2015; MINE; ZHANG, 2013; POWRIE; NAKAI, 1986; WALSH, 2014).

A clara é constituída por camadas distintas que apresentam viscosidades diferentes: a) camada fina, ligada à membrana interior da casca; b) camada exterior viscosa ou espessa; c) camada interior fina; d) membrana da calaza (MINE; ZHANG, 2013). Pode ser considerada como uma solução aquosa composta por cerca de 40 proteínas de natureza globular e uma glicoproteína sulfatada fibrilar, a ovomucina. A diferença das concentrações de ovomucina nas camadas que constituem a clara é responsável pela diferença de viscosidade que estas camadas

apresentam (KIOSSEOGLOU; PARASKEVOPOULOU, 2006; MINE; ZHANG, 2013; POWRIE; NAKAI, 1986).

2.1.1 Produção e de consumo de ovos

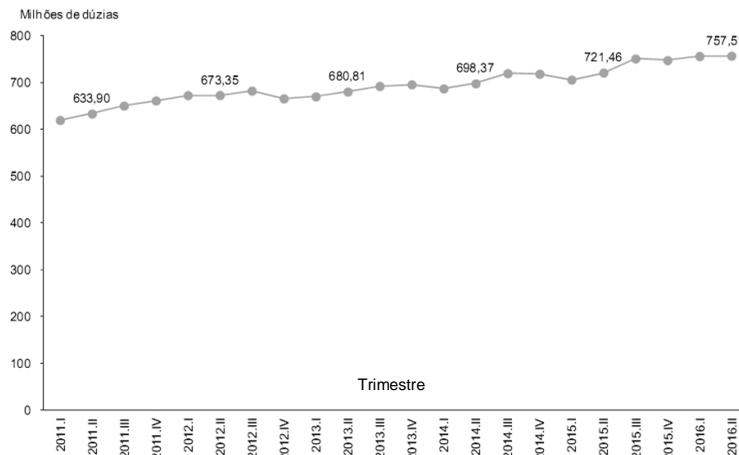
Dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) apontam que o Brasil vem apresentado um crescente aumento na produção de ovos de galinha, passando de 1,6 em 2004 para mais de 2,2 milhões de toneladas/ano em 2014 (FAOSTAT, 2017).

Com relação à produção mundial, o total de ovos produzidos em 2014 somou 69,8 milhões de toneladas, sendo o continente asiático o maior produtor de ovos, responsável por 58,6 % da produção mundial total, seguido pelo continente americano (20,9 %) e o continente europeu (14,7 %). Nesse ano, o Brasil foi o 5^a maior produtor de ovos no mundo, ficando atrás apenas para a China, Estados Unidos, Índia e México (FAOSTAT, 2017).

No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) aponta que a produção de ovos de galinha alcançou no segundo trimestre de 2016 o valor recorde de 757 milhões de dúzias das quais 76 % foi destinada para o consumo e o restante para incubação. Entre o primeiro trimestre de 2011 e o segundo trimestre de 2016 a produção apresentou aumentos consecutivos, conforme ilustrado na Figura 3. Dentro das unidades da federação, São Paulo lidera o *ranking* de maior produtor com 29,6 % da produção nacional, seguido por Minas Gerais e Paraná. O estado de Santa Catarina ocupa a nona posição (IBGE, 2016).

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) apenas 1 % da produção total de ovos no Brasil é destinada para a exportação. Desse total, cerca de 89,5 % é relativo a ovos *in natura* e apenas 10,5 % são de ovos industrializados. Embora pequena, a exportação de ovos vem apresentando queda desde 2008, reduzindo de 36,0 mil toneladas exportados nesse ano para 12,2 mil toneladas em 2014 (ABPA, 2015).

Figura 3 - Evolução da produção de ovos de galinha no Brasil por trimestre no período de 2011 a 2016



Fonte: IBGE (2016)

Com relação ao consumo da população brasileira, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada no período entre 2008-2009 aponta que a média de consumo *per capita* anual de ovos de galinha é de 3,2 kg, com destaque para a região sul que apresenta o maior consumo (4,2 kg), estando acima da média nacional. O estudo ainda evidencia que a área rural consome mais ovos do que a área urbana e que o consumo tendeu a aumentar com o incremento da renda familiar, sendo de 3,7 kg de ovo *per capita*/ano em famílias com renda superior a R\$ 6.225,00 (maior renda apresentada) (IBGE, 2010). Segundo o levantamento feito pela ABPA, o consumo *per capita*/ano de ovos *in natura* no Brasil vem aumentando. Um levantamento feito no período de 2010 a 2014 aponta o crescimento no consumo, de 148 para 182 unidades de ovos *per capita*/ano, respectivamente (ABPA, 2015).

Neste contexto de produção, a indústria de ovos representa um expressivo segmento do mercado de alimentos devido ao valor nutricional e ao baixo custo do produto, além de ofertar derivados, tais como ovos desidratados, congelados e líquidos (ORDÓÑEZ, 2005), que embora em expansão no mercado internacional, ainda é pouco significativo no Brasil (AMARAL et al., 2015).

De acordo com dados da FAO, o comércio mundial de ovoprodutos (ovos desidratados e ovos pasteurizados líquidos) tem crescido em ritmo acelerado (FAO, 2015).

A exportação de ovos desidratados no mundo mais que dobrou entre o período de 2003 e 2013. Entre os cinco países maiores exportadores em 2013 estão os Estados Unidos da América (EUA), Índia, França, Países Baixos e Espanha. O Brasil vem perdendo mercado, indo na contra mão do crescimento mundial, uma vez que reduziu a exportação de 823 toneladas (2003) para 5 toneladas (2013). A importação também vem acompanhando o crescimento da produção, de 40,2 mil toneladas em 2003 para 67,7 mil toneladas em 2013. Entre os países com maior importação em 2013 estão a Alemanha, Reino Unido, Japão, México e Espanha (FAOSTAT, 2017).

Assim como nos ovos desidratados, observa-se um crescente aumento na exportação e importação de ovos líquidos (pasteurizados) no período de 2003 a 2013. Entre os maiores exportadores em 2013 estão os Países Baixos e os EUA e os importadores Alemanha e Reino Unido. O Brasil apresentou queda na exportação nesse período e não apresentou valores significativos de importação desse produto (FAOSTAT, 2017).

As exportações de ovos no Brasil não são maiores em razão, principalmente, de barreiras tarifárias, a falta de reconhecimento do *status* sanitário e do controle de resíduos nos alimentos do Brasil (AMARAL et al., 2015).

A procura por ovoprodutos nos países varia, tendendo a ser maior nos países desenvolvidos. O consumo de ovoprodutos em relação ao total de ovos, entre os maiores consumidores mundiais, oscila muito: cerca de 1 % do total na China, 25 % na União Europeia (EU), 30 % nos EUA e 49 % no Japão (2012). Quanto ao consumo de ovoprodutos em relação ao total de ovos no Brasil, as estimativas do setor apontam que seja de, pelo menos, 5 %. Esse percentual indica que ainda há muito potencial de crescimento para esses produtos no país (AMARAL et al., 2015).

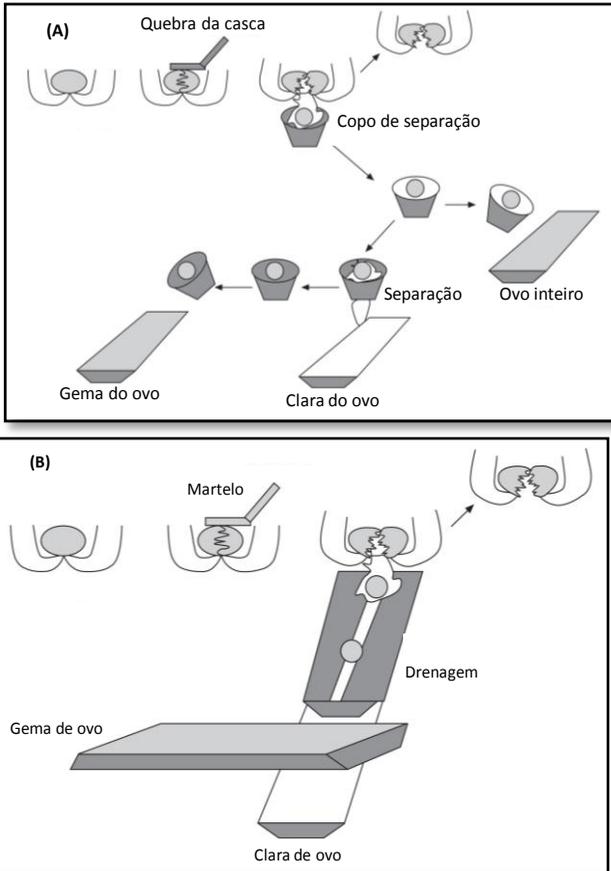
2.2 PRODUTOS DE OVOS (OVOPRODUTOS)

O termo "ovoproduto" refere-se a ovos que são removidos de suas cascas e processados. Podem ser derivados de ovos inteiros, da clara e da gema separadamente, sendo usados líquidos, congelados e/ou desidratados. Em função do produto, durante o processamento dos ovos ocorrem as etapas de classificação, ovoscopia, lavagem, quebra, filtração, homogeneização, estabilização, pasteurização, resfriamento ou congelamento ou secagem e embalagem do produto final (BRASIL, 1990; CLARK; JUNG; LAMSAL, 2014; ORDÓÑEZ, 2005).

Os ovoprodutos podem ser adicionados de outros ingredientes, aditivos ou ambos. Podem ser líquidos, concentrados, secos, cristalizados, congelados, ultracongelados, coagulados ou outras formas de apresentação aprovadas pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1991).

Para a produção de claras pasteurizadas líquidas e claras desidratadas, os ovos depois de selecionados, lavados mecanicamente e clareados com uma solução hipoclorada, são quebrados e as claras separadas das cascas e gemas (ORDÓÑEZ, 2005). O processo adequado de separação das claras e gemas é fundamental uma vez que traços de gema presentes na clara podem prejudicar a formação de espuma da clara e ainda, reduzir a eficiência do processo de pasteurização (LECHEVALIER et al., 2011). Industrialmente são reportadas duas maneiras de separação dos componentes dos ovos: quebra por pratos (A) e por tubos de drenagem (B), conforme ilustração esquemática apresentada na Figura 4.

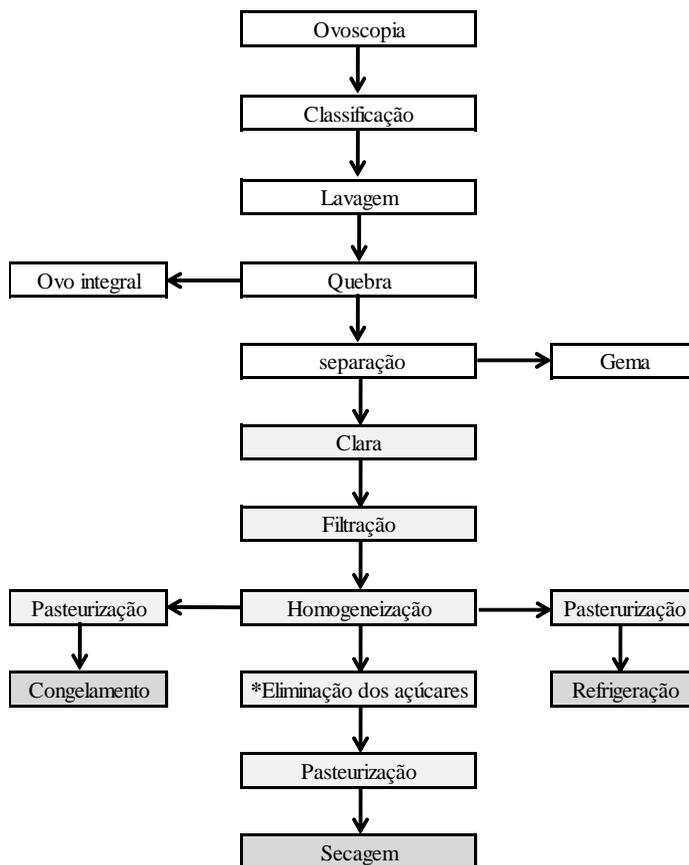
Figura 4 - Diagrama esquemático da separação de clara e gema de ovo por pratos (A) e por drenagem (B).



Fonte: Adaptado de Lechevalier et al. (2011).

Após a separação das claras, estas são submetidas a uma série de etapas para a obtenção da clara pasteurizada líquida, clara desidratada e os demais ovoprodutos a partir dessas claras, conforme pode ser observado no fluxograma apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da produção de ovoprodutos para obtenção de clara pasteurizada líquida e clara desidratada.



Fonte: Adaptado de Ordóñez (2005)

2.2.1 Clara de ovo pasteurizada líquida

Entende-se por pasteurização aplicada em ovos, como o “emprego conveniente do calor com o fim de destruir micro-organismos patogênicos sem alteração sensível da constituição física do ovo ou partes do ovo” (BRASIL, 1990).

O processo de pasteurização é um pré-requisito para a indústria de alimentos, uma vez que a clara pode apresentar contaminação por *Salmonella*. No Brasil a pasteurização é obrigatória para ovoprodutos

conforme a portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). As condições e requisitos de pasteurização são uma combinação de tempo/temperatura, onde são recomendados dois binômios: 56,7 °C por 3,5 minutos ou 55,5 °C por 6 minutos (BRASIL, 1990).

A pasteurização tem por objetivo reduzir a carga microbiana e, eliminar agentes patogênicos, especialmente a *Salmonella*. Isso permite que as claras líquidas possam ser armazenadas por algumas semanas em temperatura de refrigeração, prolongando também a vida útil das claras que serão posteriormente desidratadas (LECHEVALIER et al., 2011). No entanto, as claras são muito sensíveis ao tratamento térmico, resultando em danos às proteínas, podendo comprometer sua funcionalidade (CLARK; JUNG; LAMSAL, 2014). De acordo com Mine e Zhang (2013) a temperatura empregada na pasteurização pode causar a desnaturação da ovotransferrina e rompimento da rede ovomícina-lisozima, causando mudanças na viscosidade e reduzindo a capacidade espumante da clara. Portanto, no processo de pasteurização o controle do binômio tempo/temperatura é muito importante, tanto para garantir a eliminação dos micro-organismos patógenos, como para evitar a desnaturação proteica (VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2007).

Dentre os diversos métodos de pasteurização para claras, o sistema que consiste na pasteurização rápida ou alta temperatura por curto tempo (do inglês: *high temperatur and short time*) (HTST) tem sido empregado (FRONING, 2008). O processamento HTST é um método contínuo que pode processar grandes volumes de clara em um curto espaço de tempo, podendo ser realizados em trocadores de calor de placas ou tubulares. Após a pasteurização, os produtos líquidos são resfriados e embalados (CLARK; JUNG; LAMSAL, 2014; LECHEVALIER et al., 2011).

2.2.2 Clara de ovo desidratada

As modificações químicas e biológicas que ocorrem em proteínas quando se encontram na forma de soluções podem ter um impacto negativo na estabilidade das mesmas. Desta forma, a remoção da água (solvente) pode representar um aumento na estabilidade de várias proteínas, principalmente durante a armazenagem (WALSH, 2014).

A produção industrial de ovos desidratados iniciou-se um pouco antes da segunda guerra mundial, tornando-se um excelente método de

conservação (LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013). Esse processo permitiu considerável aumento da sua estabilidade devido à redução da atividade de água e, conseqüente inibição do crescimento microbiano e retardamento de reações químicas e bioquímicas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Nesse sentido, o processo de desidratação permitiu conservar os ovos e manter seu alto valor nutricional, sendo considerado um grande avanço tecnológico por promover o aumento significativo da vida útil deste produto (KAPOOR; ROY; JUNEJA, 2010). Contudo, durante muito tempo o processo de secagem dos ovos foi conduzido sem os conhecimentos teóricos básicos desta operação unitária. Por conseguinte, diversos problemas quanto à estabilidade, propriedades físico-químicas, microbiológicas e aspectos de qualidade geral foram enfrentados durante sua evolução. No entanto, devido a muitas pesquisas ao longo dos anos, atualmente muitos desses problemas foram contornados, permitindo a aceitabilidade da indústria e consumidores por esses produtos (CORRÊA et al., 2002).

Ovo desidratado é o produto resultante da desidratação parcial ou total do ovo. Dentro dessa classificação estão: a) clara de ovo desidratada; b) gema de ovo desidratada; c) ovo integral desidratado (clara e gema), que são designados de "clara desidratada", "gema desidratada" ou "ovo integral desidratado" (RIISPOA, 1952).

A clara desidratada ou clara em pó é uma matéria prima amplamente utilizada na indústria de alimentos, especialmente como um ingrediente na composição de outros produtos. Seu processamento inclui vantagens como maior vida útil, melhor uso do espaço de estocagem, estocagem em temperatura ambiente, padronização, segurança microbiológica, praticidade no manuseio e possibilidade de elaboração de formulações com dosagens precisas, juntamente com água. Além disso, oferece facilidade de incorporação em diversos produtos alimentícios processados como: maionese, molho de salada, massas, sorvetes, produtos cárneos, produtos de padaria e confeitaria, além de apresentar menor custo de transporte e armazenagem quando comparadas aos ovos líquidos (HAMMERSHØJ et al., 2006; KAPOOR; ROY; JUNEJA, 2010; LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013; STRIXNER; KULOZIK, 2011).

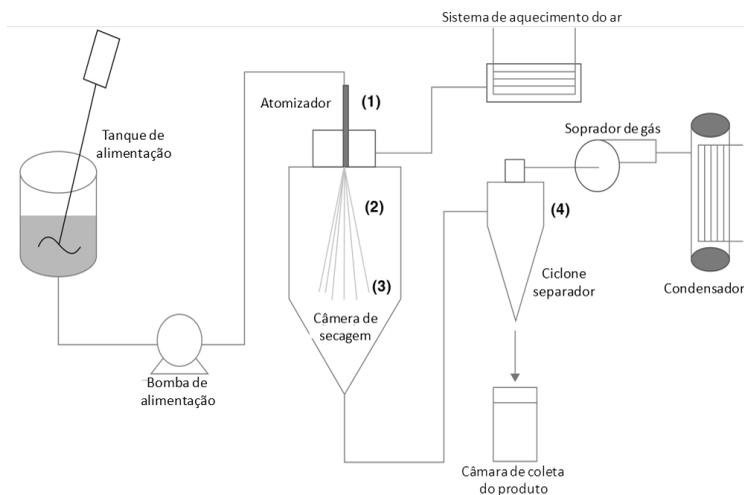
A clara desidratada é um importante ingrediente na indústria de processamento de alimentos devido à sua ampla aplicação associada as suas propriedades de formação de gel, capacidade de retenção de água, capacidade espumante e emulsificante, bem como, agente de aroma e sabor (ORDÓÑEZ, 2005).

Os processos de desidratação de claras utilizados na indústria incluem secagem à vácuo, liofilização e secagem por atomização (*spray dryin*), sendo este último o processo mais amplamente empregado (KAPOOR; ROY; JUNEJA, 2010; LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013; STRIXNER; KULOZIK, 2011).

O processo de secagem das claras por *spray drying* envolve basicamente quatro etapas: (1) dispersão do fluido em gotículas; (2) contato das gotículas com uma corrente de ar aquecido; (3) formação das partículas e (4) coleta, conforme pode ser observado na Figura 6. Inicialmente, o fluido é atomizado na câmara de secagem na forma de gotas com o objetivo de produzir grande área superficial, que cria uma grande área da interface entre as gotículas de ar e de produto, aumentando a taxa de evaporação da água, posteriormente as gotas entram em contato com o ar de secagem pré aquecido provocando a evaporação do solvente dando origem a partículas sólidas com umidade em torno de 6 %. Por fim, o produto seco é separado do ar de secagem e posteriormente coletado (ciclone) e embalado. Geralmente as temperaturas do ar de entrada não costumam ultrapassar 180 °C para clara de ovo e o tempo de permanência do produto com o ar de secagem é curto, variando de 5 a 100 s, em função das condições de processo e do equipamento utilizado (AZEREDO, 2012; LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013).

Outros processos de secagem podem ser aplicados às claras, como *pan drying* para obtenção de claras com maior umidade (14 %) e liofilização (*Freeze drying*) que é um processo mais adequado para produtos sensíveis ao calor, porém limitado devido ao seu alto custo (LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013; STRIXNER; KULOZIK, 2011).

Figura 6 - Representação ilustrativa do processo de atomização (*spray drying*).



Fonte: Adaptado de Anandharamkrishnan e Padma Ishwarya (2015)

A clara de ovo quando desidratada apresenta expressiva redução de volume, cerca de três vezes o volume inicial, o que favorece um menor custo de transporte e armazenamento para esse produto quando comparado às claras líquidas (LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013).

Entretanto, as várias etapas de processamento podem ocasionar alterações nas proteínas e, conseqüentemente, em sua funcionalidade (HAMMERSHØJ et al., 2006). Temperaturas de secagem mais elevadas reduzem a solubilidade das proteínas da clara, comprometendo sua capacidade de formar espumas e dificultado sua redispersão em água (PETROVA et al., 1986 *input* AYADI et al., 2008). Desta forma, o controle das condições de secagem é muito importante, uma vez que deve buscar preservar as características originais das proteínas da clara, incluindo sua capacidade de formar gel com calor e a produção de espumas estáveis (STRIXNER; KULOZIK, 2011).

Embora as claras sejam especialmente suscetíveis ao calor, a qualidade da clara em pó depende de diversos fatores, que vão deste a qualidade do ovo antes da quebra, sua manipulação, condições de saneamento, processamento durante a pasteurização e secagem, bem como a conservação (LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013). Nesse sentido, outro fator que interfere na qualidade das claras desidratadas é a

presença natural da glicose que pode provocar reações de escurecimento não enzimático (Reação de Maillard) durante a sua desidratação e armazenamento, além de diminuir sua solubilidade (STADELMAN; COTERRIL, 1986). Para evitar estes efeitos, muitos processos de secagem de claras possuem uma etapa de remoção dos açúcares antes do processo de pasteurização, como uma maneira de inibir a reação de Maillard, sendo considerada uma etapa importante na manutenção da qualidade das claras em pó (LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013).

2.3 PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO

Proteínas são macromoléculas ou polímeros de aminoácidos unidos covalentemente por ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos, bem como a sua exata sequência na cadeia polipeptídica é a responsável pela conformação tridimensional, sendo única para cada proteína (WALSH, 2014). O comprimento da cadeia, bem como, a exata sequência de aminoácidos definirão as propriedades físico-químicas, estruturais e biológicas das proteínas. (CAMPBELL; FERRELL, 2011; DAMODARAN, 2010).

As proteínas podem ser fibrosas ou globulares dependendo de sua estrutura tridimensional. As proteínas fibrosas consistem de cadeias polipeptídicas dispostas lado a lado em longos filamentos o que faz com que proteínas com esta estrutura sejam mais resistentes à temperatura e insolúveis em água. As proteínas globulares são estruturas compactas, quase esféricas que, em geral, apresentam boa solubilidade em água (MCMURRY, 2008).

Outro aspecto importante das proteínas alimentares, está associado às suas propriedades funcionais que interferem na textura, cor e sabor dos alimentos. Desta forma são extraídas de uma variedade de fontes (cereais, legumes, oleaginosas, ovos e carnes), modificadas e incorporadas em alimentos processados para conferir propriedades específicas, afetando positivamente as características sensoriais (USTUNOL, 2015 a).

O elevado teor de proteína altamente biodisponível nos ovos é de grande benefício para a nutrição humana. O conjunto de proteínas contidas na clara é considerado de elevado valor biológico, pois contém todos os aminoácidos essenciais em quantidades superiores às requeridas para o crescimento e demais funções biológicas aos seres humanos (SGARBIERI, 1996). Estas características nutricionais fazem com que as proteínas do ovo sejam usadas como padrão para medir a

qualidade de outras proteínas alimentares de maneira que, na escala de avaliação mais comum para a qualidade da proteína, o ovo é definido como o valor mais alto '100' (LOPÉZ-FANDIÑO, 2007).

Em geral as proteínas que compõem a clara do ovo são naturalmente globulares com estrutura molecular rígida. Dentre as diversas proteínas, a ovalbumina (~54 %) se destaca por estar em maior concentração, seguida da ovotransferrina (~12 %) e da ovomucóide (~11 %) (KIOSSEOGLU; PARASKEVOPOULOU, 2006). Embora, como mencionado anteriormente, estas proteínas apresentem alto valor biológico, em seu estado nativo, algumas delas apresentam comportamento antinutricional, sendo necessária a desnaturação térmica prévia ao consumo. Dentro dessa categoria proteica podem-se citar as inibidoras de enzimas digestivas (ovomucóide e ovoinibidor); quelantes de ferro (ovotransferrina) e complexantes de biotina (avidina) (SGARBIERI, 1996). As proteínas com maior representatividade na clara, e suas características físico-químicas são apresentadas na Tabela 2

Tabela 2 - Características físico-químicas das proteínas presentes na clara de ovo.

Proteínas	% (m/m)	MM (kDa)	pI	T_d (°C)	SH	S-S
Ovalbumina	52 - 54	45	4,5 - 4,9	75-84	4	2
Ovotransferrina (conalbumina)	12-13	76 - 78	6,0 - 7,2	61-65	0	15
Ovomucóide	11	28	4,0 - 4,3	70 -77	0	9
Lisozima	3,4 - 3,5	14,3 - 14,6	10,7	69-77	-	4
Ovomucina	1,5 - 3,5	α : 150-254 β : 400-743	4,5 - 5,0	ND	-	-
Ovoglobulina G2	1,0 - 4,0	30 - 45 47 - 49	4,0 - 5,5	92,5	0	0
Ovoglobulina G3	1,0 - 4,0	49 - 58	4,8 - 5,8	ND	0	0
Ovoinibidor	1,5	49	5,1	-	-	-
Ovoglicoproteína	1,0	24,4	3,9	-	-	-
Ovoflavoproteína	0,8	32 - 35 80	4,0	-	-	-
Ovostatina	0,5	760 - 900	4,5 - 4,7	-	-	2
Cistatina	0,05	12 - 12,7	5,1	-	-	-
Avidina	0,05	55 - 68,3	10	ND	-	1

Fonte: Adaptado de Kovacs-Nolan, Phillips e Mine (2005); Li-Chan e Kim (2008); Mine e Zhang (2013); Mine (1995); Powrie e Nakai (1986); Strixner e Kulozik (2011); Watanabe et al. (2004); Walsh (2014).

*Notas:

% (m/m) – Percentagem de proteína massa/massa na clara; MM (kDa) – Valor da massa molar; pI – Ponto isoelétrico; T_d (°C) – Temperatura de desnaturação em graus Célsius; -SH – Sulfidrilas; -S-S – Ligação dissulfeto.

2.3.1 Ovalbumina

A ovalbumina é a proteína predominante da clara e acredita-se que foi a primeira proteína da clara a ser isolada em estudo conduzido por Franz Hofmeister em 1889 (HUNTINGTON; STEIN, 2001).

Em 1978, McReynolds e colaboradores realizaram estudos visando a caracterização da ovalbumina e determinaram, com auxílio do mRNA (RNA mensageiro), que esta proteína apresenta estrutura globular com uma sequência de 385 resíduos de aminoácidos, sendo um monômero globular. Além disso, observaram que a cadeia polipeptídica possui quatro cisteínas, que são responsáveis pela presença de quatro grupos sulfidrilas (-SH) na molécula (McREINOLDS et al., 1978). A presença de cisteínas ao longo da cadeia desempenha um papel importante na estabilidade de espumas, uma vez que são capazes de desdobra-se na interface ar-água formando ligações dissulfeto (-S-S) com cisteínas de moléculas vizinhas (KIOSSEOGLOU; PARASKEVOPOULOU, 2006). A ovalbumina também contém dois resíduos de serina-fosfato e um carboidrato ligado ao resíduo de asparagina, o que torna a ovalbumina uma fosfoglicoproteína (McREINOLDS et al., 1978; LECHEVALIER et al., 2007a).

Cerca da metade da ovalbumina possui resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e um terço é carregado negativamente, conferindo a molécula o ponto isoelétrico de 4,5 (LECHEVALIER et al., 2007a; MINE; ZHANG, 2013). Quando purificada, podem-se obter três subclasses diferentes: A₁; A₂ e A₃, que se diferenciam pela concentração de grupos fosfatos na molécula, contendo 2, 1 e nenhum, respectivamente em uma proporção de 85:12:3 (MINE, 1995).

Smith e Back (1962 e 1965) demonstraram que durante a estocagem, a ovalbumina é gradativamente convertida irreversivelmente em outra forma mais estável, denominada S-ovalbumina. Donovan e Mapes (1976) utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), determinaram a temperatura de desnaturação (em pH 8,8) da ovalbumina (84,5 °C) e da S-ovalbumina (92,5 °C) e observaram a presença de uma forma intermediária que desnaturava a 88,5 °C, comprovando a maior estabilidade da S-ovalbumina quando comparada a sua forma nativa. A S-ovalbumina apresenta massa molar ligeiramente

menor que a ovalbumina e sua concentração no ovo aumenta com o tempo de armazenagem (LECHEVALIER et al., 2007a; MINE, 2015). Em ovos frescos, a concentração de S-ovalbumina é de 5 %, podendo atingir 50 % até chegar no local de comercialização e, eventualmente ao consumidor, podendo alcançar a concentração de 81 % após seis meses de estocagem em baixa temperatura (ALLEONI; CARRARO, 2006; LECHEVALIER et al., 2007b). Maiores taxas de conversão da ovalbumina em S-ovalbumina foram observadas quando o ovo foi exposto a temperaturas de armazenagem mais elevadas (superiores a 50 ° C) e maiores valores de pH (MINE, 2015).

Quando submetida ao aquecimento, uma solução de ovalbumina sofre um processo de desnaturação e coagulação. O gel formado é estabilizado por interações intermoleculares hidrofóbicas que geram impactos na textura e na capacidade de retenção de água do ovo, bem como, em alimentos onde a ovalbumina é introduzida como ingrediente. Além disso, a S-ovalbumina contribui para a capacidade de formação de espuma da clara, uma vez que, quando submetida ao batimento ocorre a agregação das moléculas de proteína na interface ar-água (WALSH, 2014).

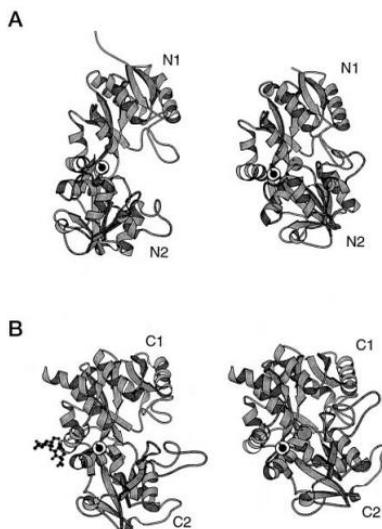
2.3.2 Ovotransferrina

A ovotransferrina (OTf), também conhecida como conalbumina, é uma transferrina que pertence a um grupo de proteínas conhecidas como metaloproteínas, possuindo uma elevada afinidade pelo ferro (SUPERTI et al., 2007). É composta por 686 resíduos de aminoácidos, com massa molar em torno de 76 kDa (WILLIAMS et al., 1982). É uma glicoproteína que contém na molécula quinze ligações dissulfeto e dois monossacarídeos ligados ao resíduo de asparagina (Asp⁴⁷³) (KUROKAWA et al., 1999).

Conforme Desert et al. (2001), a ovotransferrina possui três isoformas que se diferenciam por conter nenhum, um e dois átomos de ferro ligados a cada cadeia proteica, denominadas aférrica, monoférrica e diférrica, respectivamente. Cada isoforma apresenta um ponto isoelétrico (pI) de 7,2 (aférrica), 6,6 (monoférrica) e 6,2 (diférrica). Devido a afinidade em ligar-se a íons ferro, a ovotransferrina tem habilidade de sequestrar o Fe³⁺ do meio, conferindo a essa proteína atividade antimicrobiana, pois inibe o crescimento bacteriano através da privação de ferro, fornecendo desta forma, um mecanismo de defesa ao ovo (SUPERTI et al., 2007; WU; ACERO-LOPEZ, 2012).

Como toda transferrina, a ovotransferrina é uma proteína de dois lóbulos, N e C, que são subdivididos em dois domínios cada, N1 e N2; C1 e C2, respectivamente, que se ligam formando uma fenda, onde fica contido o local de ligação do ferro (Figura 7). Quando o átomo de ferro se une à proteína, ocorre uma mudança conformacional nos domínios, que passam de uma posição mais aberta para uma posição mais fechada (KUROKAWA et al., 1999). A ovotransferrina é capaz de se ligar reversivelmente a dois Fe^{3+} por molécula, juntamente a íons carbonato CO_3^{2-} ou bicarbonato (HCO_3^-) (SUPERTI et al., 2007). Além disso, a ovostransferrina é encontrada em duas formas: APO (sem ferro) e HOLO (com ferro) (ABEYRATHNE; LEE; AHN, 2013). A forma APO é incolor, apresenta uma conformação aberta e é sensível a tratamentos físicos e químicos. A forma HOLO apresenta cor salmão roseada, possui a conformação fechada e é resistente à hidrólise proteolítica e à desnaturação térmica (KO; AHN, 2008).

Figura 7 - Domínio do lóbulo N - (A) e domínio do lóbulo C (B) da ovotransferrina



Fonte: adaptado de Kurokawa et al. (1999)

*Domínio N e C (esquerda) forma APO; Domínio N e C (direita) forma HOLO.

2.3.3 Ovomucóide

A ovomucóide representa 11 % das proteínas que compõem a clara do ovo (MINE, 2015). É composta por 186 resíduos de aminoácidos com massa molar de 28 kDa, ponto isoelétrico em torno de 4,1 e é dividida em três domínios (I, II, III) reticulados através de ligações dissulfeto intradomínios (KATO et al., 1987; MINE; ZHANG, 2013; MINE, 2015).

Em torno de nove ligações dissulfeto foram identificadas na cadeia polipeptídica a qual possui seis sítios de glicosilação, dos quais cinco carboidratos se encontram ligados à cadeia através de resíduos de asparagina (Asn^{34, 77, 93, 99, 199}) caracterizando, desta forma, a ovomucóide como uma glicoproteína (MINE, 2015; UNIPROT, 2015 a; MINE; ZHANG, 2013).

A ovomucóide possui um sítio ativo no domínio II que confere à proteína alta estabilidade contra enzimas digestivas e atividade inibitória às tripsinas (LIN-CHAN; KIM, 2008; MINE; ZHANG, 2013). Outra característica importante dessa proteína se refere a sua estabilidade à altas temperaturas, sendo resistente à coagulação induzida pelo calor (MINE, 2015). Desta forma, pode ser submetida ao aquecimento a 100 °C em condições ácidas por longos períodos sem sofrer alterações significativas nas suas propriedades físicas ou químicas (STRIXNER; KULOZIK, 2011). No entanto, sua estabilidade ao calor é reduzida quando este tratamento é realizado em pH 7,6 e na presença de outros constituintes da clara do ovo (LI-CHAN; KIM, 2008).

2.3.4 Lisozima

A proteína lisozima (EC 3.2.1.17), anteriormente conhecida como globulina G₁, é uma enzima peptidoglicano N-acetilmurâmico hidrolase (do inglês: *N-acetylmuramoyl hydrolase*), globular e compacta. Sua atividade catalítica se dá através da clivagem de ligações glicosídicas β (1-4) entre os resíduos de ácido N-acetilmurâmico e N-Acetil-D-glicosamina em um peptidioglicano (MINE, 2015). Essa atividade torna esta proteína capaz de promover a lise de bactérias que contenham esses polissacarídeos na parede celular, especialmente das Gram-positivas, tornando-a uma enzima de autodefesa do ovo (MINE; MA; LAURIAU, 2004; THAMMASIRIRAK et al., 2006). Em bactérias Gram-negativas sua atividade é menor devido a sua inabilidade de penetrar na parede celular destas bactérias (LI-CHAN; KIM, 2008).

estendendo a vida útil de produtos alimentícios (LESNIEROWSK; KIJOWSKI, 2007; MINE, 2015). Esta característica faz com que a lisozima seja um ingrediente seguro para aplicação em alimentos, sendo considerada nos Estados Unidos como *Generally Recognized a Safe* (GRAS) (geralmente reconhecido como seguro em tradução livre). Pode ser obtida em escala comercial, onde a maior fonte de obtenção é a clara do ovo (ROLLER; BORARD, 2003; ANTON, 2007).

2.3.5 Ovomucina

A ovomucina é uma glicoproteína sulfatada (glicosulfoproteína) de alta massa molar que contém em sua molécula oligossacarídeos (MINE; ZANG, 2013; MINE, 2015). Difere das demais proteínas da clara por apresentar estrutura fibrilar, sendo constituída por subunidades α - (MUC5B) e β -ovomucina (MUC6) unidas por ligação dissulfeto, formando uma estrutura polimérica linear. As subunidades α - (MUC5B) e β -ovomucina (MUC6) diferem entre si pelo teor de carboidratos, 15 e 60 %, respectivamente (HIIDENHOVI, 2007; MINE, 2015; OFFENGENDEN; FENTABIL; WU, 2011; UNIPROT, 2015 b).

Através de estudos com eletroforese Itoh et al. (1987) observaram que a ovomucina é composta de três subunidades: α_1 , α_2 e β -ovomucina. As subunidades da ovomucina podem estar presentes na forma solúvel e insolúvel na clara do ovo, em diferentes proporções. A forma solúvel é encontrada no albúmen espesso e no fino, enquanto que a forma insolúvel está presente apenas no albúmen espesso (HIIDENHOVI, 2007; MINE, 2015). Desta forma, a ovomucina insolúvel é considerada fundamental na formação da estrutura gelatinosa da clara espessa, sendo a maior responsável pela sua viscosidade (MINE; ZANG, 2013). A viscosidade também é influenciada pela associação entre ovomucina-lisozima e diminui com o aumento do pH (SGARBIERI, 1996). A alta viscosidade atua como um mecanismo de proteção contra a penetração de patógenos e outros micro-organismos, dificultando sua mobilidade para o interior do ovo (STRIXNER; KULOZIK, 2011). A redução ou perda da viscosidade é uma importante mudança na clara do ovo que ocorre durante o armazenamento, que é geralmente atribuída a degradação do complexo da ovomucina (HIIDENHOVI, 2007).

De acordo com estudos de Watanabe et al. (2004), α -ovomucina é constituída de 2.087 resíduos de aminoácidos, com massa molar entre 230-254 kDa, sendo composta por 91 % de proteínas e 9 % de carboidratos. Entretanto, estudos posteriormente realizados

determinaram a massa molar das diferentes formas de ovomucina e encontraram valores variando entre 200 a 220 kDa e 150 a 220 kDa para α_1 -ovomucina e α_2 - ovomucina, respectivamente (OMANA; WANG; WU, 2010).

Conforme Mine (2015) e Hiidenhovi (2007) a β -ovomucina é composta de 872 resíduos de aminoácidos, enquanto a UniProt (2015 b) indica um total de 1.185 resíduos. A massa molar da β -ovomucina foi determinada por Itoh et al. (1987) que relatam valores de 400 kDa, mas outros estudos apontam valores de 700 e 743 kDa (OMANA; WANG; WU, 2010), indicando que tanto a sequência de aminoácidos da ovomucina, bem como, a sua massa molar ainda não estão claramente definidas.

A ovomucina tem um papel importante na formação e estabilidade de espumas, especialmente quando a clara do ovo é adicionada na forma de ingrediente em alimentos processados (MINE, 2015). A capacidade da ovomucina de formar espumas, bem como, sua estabilidade está associada a sua massa molar e a viscosidade intrínseca desta proteína. Além disso, a capacidade de se associar com a lisozima e com globulinas, bem como, a presença de carboidratos na cadeia lateral da proteína, podem contribuir para esta característica (OMANA; WANG; WU, 2010).

2.3.6 Proteínas em menor concentração

As ovoglobulinas G2 e G3 representam cerca de 4 % do total das proteínas contidas na clara. Possuem peso molecular de 36 e 42 KDa, respectivamente e pI de 4,8 (G2) e 5,8 (G3), dependendo da quantidade de carboidratos ligados a elas. As proteínas G2 e G3 assemelham-se à ovalbumina pelo fato de serem desnaturadas pelo calor e serem solúveis em soluções salinas suaves. Além disso, há alguns relatos de que essas globulinas tem papel importante nas propriedades de formação e estabilidade de espumas de clara. Apesar disso, poucos estudos têm sido realizados para caracterizar completamente as proteínas G2 e G3, contrastando com a globulina G1, identificada como lisozima (STRIXNER; KULOZIK, 2011; USTNOL, 2015 b).

Algumas das proteínas da clara do ovo menos conhecidas incluem a avidina, cistatina, ovoflavoproteína e ovoinibidor. A avidina é uma glicoproteína básica constituída por quatro subunidades idênticas, que se ligam fortemente à biotina (vitamina do complexo B), sofre desnaturação térmica e age como um inibidor de tripsina. A cistatina

consiste em uma cadeia peptídica com um cerca de 120 resíduos de aminoácidos, apresentando dois isômeros que diferem em seu pI (5,6 e 6,5) e suas propriedades imunológicas. É capaz de inibir endopeptidases tais como cinina e papaína. A ovoalbumina é formada por uma apoproteína ligada à riboflavina, enquanto a ovoinibidor é capaz de inibir tripsina, quimotripsina e enzimas microbianas (ARAÚJO et al., 2015; BELITZ; GROSCHE; SCHIEBER, 2009; ORDÓÑEZ, 2005; USTNOL, 2015 b).

Acredita-se que a clara é composta por cerca de 40 proteínas, com uma ampla gama de massas molares. Apesar dos esforços para desenvolver procedimentos eficientes de separação e purificação, a caracterização das proteínas da clara ainda é incompleta, especialmente quanto se trata das proteínas que estão em menor concentração (USTNOL, 2015 b).

2.4 EFEITOS DO PROCESSAMENTO E DO TEMPO DE ESTOCAGEM NAS PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO

Os ovos têm sido amplamente aplicados na indústria de processamento de alimentos devido às funcionalidades, que estão especialmente ligadas a sua rica concentração de lipídeos e proteínas. Além disso, a tecnologia de processamento de ovos foi aperfeiçoada para desenvolver ovoprodutos de maior qualidade, mais estáveis e com maior vida útil para atender a crescente demanda (MINE; ZHANG, 2013).

Os ovos inteiros, clara ou gema podem ser conservados por pasteurização, secagem comum, atomização ou liofilização. Os três primeiros processos envolvem calor, portanto, o próprio processamento pode levar a alterações químicas e físicas nos componentes do ovo (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Em certas condições de pH e temperatura, as proteínas assumem uma conformação específica classificada como estado nativo. Por ser uma estrutura considerada termodinamicamente metaestável, qualquer alteração no meio em que a proteína está inserida causa mudanças no seu estado termodinâmico, ocasionando alterações em sua conformação tridimensional deixando-a em um arranjo mais desordenado. Essas alterações, em geral, não envolvem mudanças químicas, mas ocorrem nos níveis de estrutura 2^a, 3^a e 4^a das proteínas e são conhecidas como desnaturação (MINE; ZANG, 2013).

A desnaturação pode ser induzida por uma variedade de agentes físico-químicos, incluindo calor, pH, força iônica, efeitos de superfície e, pode resultar em mudanças na solubilidade e perda de algumas propriedades funcionais das proteínas. No entanto, vale lembrar que durante o processamento de proteínas alimentares nem sempre a desnaturação é indesejável. Durante o processo de formação de espumas, por exemplo, as proteínas da clara devem ser capazes de desnaturar parcialmente na interface ar-água (DAMODARAN, 2010).

2.4.1 Efeito da temperatura de processamento

O calor é muito aplicado no processamento dos alimentos e atua como um agente desnaturante de proteínas. O conhecimento dos efeitos da temperatura sobre as proteínas é imprescindível durante o processo de pasteurização e secagem das claras, uma vez que a ocorrência da desnaturação pode afetar suas propriedades funcionais.

Quando as proteínas são submetidas ao aquecimento, temperaturas amenas (~ 40 °C) podem promover uma melhora na sua solubilidade, entretanto, temperaturas mais elevadas podem promover desdobramento das cadeias proteicas, causando a redução da solubilidade. Isso ocorre, pois o aumento da temperatura desestabiliza as interações não covalentes (ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas) que são exotérmicas, enquanto estabiliza as interações hidrofóbicas, que são endotérmicas, favorecendo a entropia conformacional (DAMODARAN, 2010).

A solubilidade é um atributo importante das proteínas da clara, especialmente na formação de espumas, uma vez que esta funcionalidade é comprometida se houver redução da solubilidade (GOMES; PELEGRINE, 2012).

A clara de ovo é uma mistura complexa de proteínas com intervalos diferentes de temperatura de desnaturação, de modo que tratamentos térmicos podem afetar de maneiras diferentes cada uma delas (DONOVAN et al., 1975).

O processo de pasteurização pode levar à mudanças estruturais nas proteínas da clara comprometendo sua propriedade funcional de formar espumas. Belitz, Grosch e Schieberle (2009) e De Souza e Fernández (2013) apontam que a faixa de temperatura recomendada para a pasteurização pode causar desdobramento de proteínas da clara e subsequente formação de agregados insolúveis, afetando as propriedades funcionais das mesmas. De acordo com Mine e Zhang (2013) a

temperatura de pasteurização pode causar a desnaturação da ovotransferrina e a destruição da interação ovomucina-lisozima, reduzindo a capacidade espumante da clara.

Quando as claras são desidratadas por atomização, este processo pode causar alterações semelhantes ou ainda mais severas do que a pasteurização, uma vez que a temperatura empregada é maior, mesmo que por um curto período de tempo (BOBBIO; BOBBIO, 1992). Apesar das vantagens obtidas com a desidratação das claras, seu processamento inclui várias etapas que podem ocasionar alterações nas proteínas (HAMMERSHØJ et al., 2006). De acordo com Ayadi e colaboradores (2008) as proteínas da clara são sensíveis à temperatura de entrada do ar do *spray dryer*, bem como, ao tempo de residência no secador.

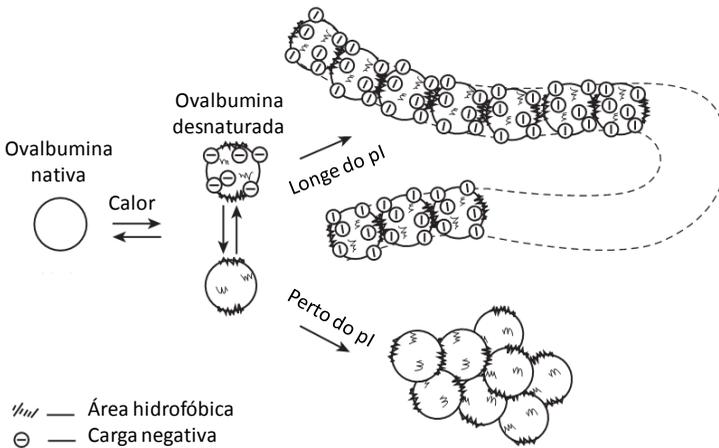
No Brasil, a portaria n° 1, de 21 de fevereiro de 1990, torna obrigatória a pasteurização em ovoprodutos (BRASIL, 1990). Para Froning et al. ([s.d.]), a pasteurização pode afetar negativamente as propriedades funcionais de ovoprodutos dependendo do tempo e da temperatura ao qual são submetidos, uma vez que as proteínas são particularmente susceptíveis a danos causados pelo calor, principalmente na faixa entre 54 a 60 °C. Desta forma, estudar os efeitos causados pelos tratamentos térmicos em clara de ovos é de grande importância, uma vez que afetam as propriedades funcionais, como a formação de espuma. Sendo assim, diversos trabalhos vêm utilizando a calorimetria exploratória diferencial (do inglês: *differential scanning calorimetry* – DSC) como ferramenta para observar os efeitos da temperatura sobre as proteínas da clara de ovo, determinar sua temperatura de desnaturação (T_d) e alterações na entalpia em função de transições envolvendo proteínas. Segundo Ma e Harwalkar (1991) a utilização de DSC para estudar a conformação de proteínas e a influência do processamento é uma ferramenta que permite elucidar os mecanismos de desnaturação, agregação e gelificação, fornecendo informações que podem ser correlacionadas com sua funcionalidade para aplicações específicas. Neste sentido, alguns autores tem aplicado a técnica de DSC para estudar a desnaturação térmica e determinar a temperatura e entalpia de desnaturação das claras e de suas frações proteicas (DONOVAN; MAPES, 1976; DONOVAN et al., 1975; FERREIRA; HOFER; RAEMY, 1997; WOOTTON; HONG; THI, 1981).

Foi verificado que a desnaturação induzida pelo calor das proteínas da clara pode ocorrer entre 60 e 100 °C. Dentre as principais proteínas analisadas, a ovotransferrina foi a mais termolábil com $T_d \sim$

60 °C, a S-ovalbumina foi a mais termotolerante com $T_d \sim 85$ °C e a ovalbumina e a lisozima apresentam T_d intermediárias, ~ 80 e 70 °C, respectivamente (ABBASNEZHAD et al., 2014; DE SOUZA; FERNÁNDEZ, 2013; DONOVAN et al., 1975; FERREIRA; HOFER; RAEMY, 1997).

A desnaturação das proteínas da clara induzida pelo calor é representada pela agregação, resultante da transformação da proteína de um estado nativo para um estado desnaturado. As interações hidrofóbicas nas proteínas da clara são favorecidas pela aplicação de calor, e são as principais responsáveis pela coagulação da ovalbumina de ovo, já que essas interações aumentam com a temperatura (MINE; ZHANG, 2013). O efeito da desnaturação da ovalbumina induzida pelo calor pode ser observado como uma ilustração esquemática apresentada na Figura 9.

Figura 9 - Diagrama esquemático do processo de desnaturação induzido pelo calor e formação de agregados de ovalbumina.



Fonte: Adaptado de Mine e Zhang (2013).

Outro efeito do tratamento térmico está associado a que o mesmo também pode favorecer o escurecimento das claras. A presença de glicose na clara, caso não seja removida antes da etapa térmica, pode causar reações de escurecimento não enzimático (reação de Maillard), que por sua vez causa alterações de cor no pó e na solubilidade das proteínas envolvidas (BOBBIO; BOBBIO, 1995).

O escurecimento pode ser mais intenso para clara desidratada do que na clara pasteurizada, devido às temperaturas empregadas durante a secagem, uma vez que a reação de Maillard é catalisada pela temperatura. Temperaturas mais severas aumentam a reatividade entre açúcar e a componente amina intensificando, por conseguinte, o escurecimento (SILVA et al., 2015). Handa e Kuroda (1999) apontam que o aquecimento induz a reação de Maillard e a formação de complexos proteína-glicose em clara de ovos com a presença de carboidrato, sendo a reação favorecida em pH alcalino.

2.4.2 Efeito do pH e do cisalhamento

As proteínas são sensíveis a modificações no pH em função das suas características ácido-base. O pH tem efeito na dissociação de grupos funcionais das proteínas, alterando suas cargas e, portanto, atuando na magnitude das forças de atração e de repulsão entre proteína-proteína e proteína-soluto (DAMODARAN, 2010). Desta forma, em geral, as proteínas são mais solúveis em valores de pH baixos (ácidos) ou altos (alcalinos), devido ao excesso de cargas, que produz repulsão entre as moléculas (MACHADO et al., 2007).

Machado et al. (2007) sugere que espumas formadas por proteínas são mais estáveis em pH próximo ao isoeletrico, desde que se mantenham solúveis. Proteínas insolúveis não são adsorvidas na interface gás-líquido, o que reduz a formação de espumas, entretanto, podem contribuir para a estabilidade da espuma depois de formada.

O pH e a solubilidade são atributos importantes nas claras, pois afetam suas propriedades funcionais, especialmente a de formação de espuma. Essas alterações do pH podem causar redução da solubilidade das proteínas da clara, afetando sua funcionalidade. Gomes e Plegrine (2012) avaliaram a solubilidade de claras desidratadas em diferentes pHs e relatam que as proteínas das claras em pH 9,0 apresentam menor solubilidade quando comparadas as claras em pH 7,5.

O cisalhamento também afeta a estabilidade das proteínas, uma vez que muitas proteínas podem desnaturar e/ou precipitar quando submetidas a condições específicas de agitação, embora este processo seja importante para a formação de espumas a partir de clara de ovo. O excesso de cisalhamento mecânico gerado por agitação, batimento, amassamento etc, pode causar a desnaturação das proteínas reduzindo sua capacidade de formar espumas (DAMODARAN, 2010).

2.4.3 Efeito das condições e do tempo de estocagem

As claras apresentam alterações físico-químicas durante o período de estocagem, especialmente quando estocadas em condições de temperatura e umidade relativa inapropriadas.

Imediatamente após a postura dos ovos, inicia-se uma série de mudanças físico-químicas que dependerão da temperatura de armazenamento e seguem cinéticas diferentes dependendo das reações envolvidas. No ovo, a fração de clara é a que passa pelas principais alterações durante o armazenamento (LUCISANO et al., 1996).

Dentre as alterações observadas ocorre o aumento do pH da clara, principalmente devido a perda de dióxido de carbono (CO_2) e água do ovo para a atmosfera através da casca. Essa perda de água também promove mudanças na viscosidade da clara por liquefação, o que favorece a migração da água da clara para a gema, causando a redução da altura e diminuição do percentual da clara no ovo (FIGUEIREDO et al., 2011; FREITAS et al., 2011; SIEBEL et al., 2005). As condições de armazenagem (temperatura, UR %) e o tempo de comercialização após a postura, podem potencializar a elevação do pH, podendo assumir valores próximos a 9,7 (PISSINATI et al., 2014). De acordo com Figueiredo et al. (2011) o pH de clara aumenta no decorrer do armazenamento independentemente da temperatura de estocagem, sendo menos intenso quando os ovos são mantidos em temperatura de refrigeração.

A clara é uma solução de proteínas em água com a presença de sais. Dentre esses sais estão presentes o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e carbonato de sódio (Na_2CO_3) que atuam como um sistema tampão juntamente com o CO_2 dissolvido (BOBBIO; BOBBIO, 1995). Desta forma a elevação do pH da clara ocorre devido a um aumento no teor de NaHCO_3 em decorrência da dissociação do ácido carbônico (H_2CO_3) que libera CO_2 e H_2O (FIGUEIREDO et al., 2011).

Durante o período de armazenamento ocorre a dissociação do complexo ovomucina-lisozima na clara com a consequente destruição do gel de ovomucina. Essas transformações afetam negativamente a viscosidade da clara causando sua liquefação, favorecem a perda de água através dos poros e alteram as propriedades espumantes (SIEBEL et al., 2005). A viscosidade está relacionada com as propriedades funcionais da clara e, conseqüentemente, pode ser considerada como um dos fatores chave para descrever a qualidade tecnológica desses produtos (DE SOUZA; FERNÁNDEZ, 2013). A viscosidade das claras

é um atributo de qualidade importante e está relacionada às propriedades espumantes e gelificantes das mesmas (SPADA et al., 2012).

A modificação da ovalbumina é significativamente aumentada com o tempo de armazenamento, tanto em ovos, quanto nos seu produtos, e sua conversão em S-ovalbumina pode chegar a 81 % após 6 meses de estocagem em baixa temperatura (MINE, 2015; MINE; ZHANG, 2013). Além disso, a conversão da ovalbumina em S-ovalbumina é favorecida pelas condições de armazenagem e processamento, sendo intensificada em temperaturas acima das de refrigeração (ALLEONI CARRARO, 2006; LECHEVALIER et al., 2007a). Desta forma, a concentração de S-ovalbumina é um parâmetro de qualidade nesses produtos, uma vez que as condições de armazenagem e tempo de postura influenciam na sua concentração (MINE, 2015). Conforme Mine e Zhang (2013), a conversão de ovalbumina em S-ovalbumina resulta em um filme coesivo que se forma na interface ar-água, reduzindo assim a estabilidade da espuma.

2.5 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

Embora as proteínas sejam importantes e imprescindíveis em diversos processos biológicos, na indústria elas detêm um papel fundamental como ingredientes e aditivos alimentares. Em geral, isso se deve principalmente às suas propriedades funcionais que afetam o comportamento dos sistemas alimentares durante o processamento, estocagem, preparo e consumo (PHILLIPIS; WILLIAMS, 2011).

A funcionalidade das proteínas é controlada por suas propriedades físico-químicas como tamanho, forma, composição e sequência de aminoácidos, carga líquida e distribuição das cargas, razão de hidrofobicidade/hidrofobicidade, estruturas primárias, secundária e terciária, flexibilidade, entre outras. As propriedades funcionais influenciam o desempenho das proteínas em sistemas alimentares, de forma a apresentarem diversas funções tais como, solubilidade, capacidade de retenção de água, emulsificação, gelificação, viscoelasticidade, coesão, adesão, fixação de lipídeos e aromas e formação de espumas. Além disso, interações da proteína com outros componentes dentro de um sistema alimentar como lipídeos, açúcares, sais, polissacarídeos e outros, promovem mudanças na sua funcionalidade. Nesse contexto, as proteínas têm grande influência sobre os atributos sensoriais e, portanto, na qualidade sensorial dos alimentos (DAMODARAN, 2010; USTNOL, 2015 b).

A clara do ovo, por ser uma mistura de diversas proteínas é um ingrediente multifuncional capaz de gelificar, formar espuma, ligar-se com a água e coagular quando submetida ao calor, o que a torna um ingrediente importante para a indústria de alimentos (DAMODARAN, 2010). Dentre suas propriedades funcionais as mais importantes são gelificação, formação de espumas e emulsificação (MINE, 2015). Mas apresentam outras tais como capacidade de retenção de água, coesão, adesão e fixação de lipídeos e aromas. Essas propriedades são frequentemente responsáveis ou afetam a aparência, estrutura / textura, sensação de sabor e retenção de sabor dos alimentos (WALSH, 2014).

Dentre as suas multifuncionalidades, a capacidade de incorporar ar e formar espuma é muito importante, em especial em produtos de baixa densidade e elevada expansibilidade (SGARBIERI, 1996). Esta capacidade é particularmente importante na indústria de panificação e confeitaria, com implicações na estrutura e textura de produtos como pães, bolos, biscoitos, merengues e diversos outros produtos como sorvetes, uma vez que esses produtos dependem da incorporação de ar para manter seus atributos (ALLEONI CARRARO, 2006).

2.6 ESPUMAS

Espumas são sistemas coloidais altamente complexos, que requerem conhecimentos químicos, bioquímicos, físicos entre outros, apresentado uma gama de propriedades que interferem tanto na sua formação quanto na sua manutenção. As espumas são sistemas únicos que podem ser adaptados a diversas aplicações, tanto na vida diária como em inúmeros processos industriais.

Os sistemas coloidais são aqueles que apresentam duas fases: uma contínua e outra dispersa (descontínua). Em alimentos, eles podem ser categorizados em quatro grupos conforme o estado das matérias que constituem as duas fases, sendo eles: sol, gel, emulsão e espuma (SAHIN; SUMNU, 2006).

A espuma pode ser definida como uma dispersão coloidal de gás em líquido, onde a fase contínua é o líquido que circunda a fase dispersa que é o gás (geralmente o ar), ou seja, é um sistema que consiste em uma massa de bolhas de ar dispersas em um líquido, separados por uma fina película (SCHRAMM, 2014; USTUNOL, 2015 a). As espumas podem ser classificadas como líquidas ou sólidas. Espumas sólidas são materiais plásticos ou elásticos onde se tem o ar disperso na fase sólida enquanto que espumas líquidas, apesar de serem mais difíceis de

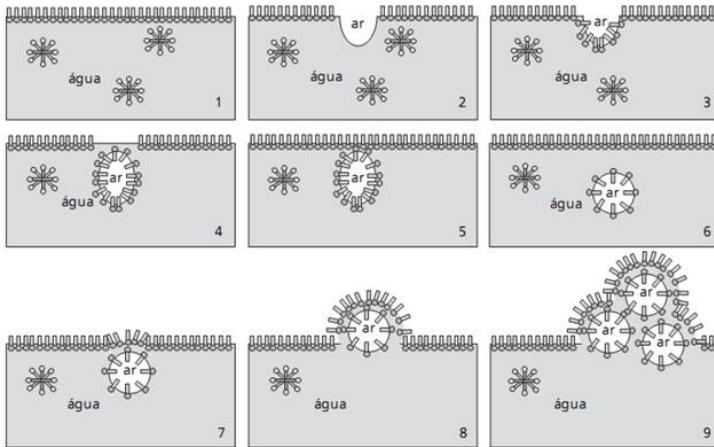
classificar, geralmente consistem da fase ar dispersa em uma fase líquida (FOEGEDING; LUCK; DAVIS, 2006).

A incorporação de ar em uma fase contínua (líquida) pode ser realizada de diversas formas, dentre elas: através de agitação mecânica vigorosa ou por incorporação de gás direto na fase líquida (borbulhamento). Outros casos como liberação de gás de uma solução saturada após agitação suave (cerveja ou bebidas gaseificadas) ou ainda liberação de gás de micro-organismos sendo aprisionado em um alimento como o queijo, também são formas para a obtenção de espumas. Todavia, a forma mais comum é submeter a fase contínua a uma agitação vigorosa, onde a agitação favorece a incorporação de ar dentro do volume da fase líquida e submete as bolhas recém-formadas a elevadas taxas de cisalhamento, promovendo a quebra dessas bolhas em tamanhos menores (RITZOULIS, 2013).

Durante a agitação ocorre a deformação da superfície do líquido dando origem a concavidades na superfície que inicialmente são livres de surfactante. Após algum tempo, moléculas do surfactante migram a partir da solução e adsorvem na superfície cobrindo a interfase com uma monocamada que protege as bolhas contra a coalescência (LANGEVIN, 2000). As monocamadas são filmes monomoleculares de substâncias de caráter anfífilico que se dispõem em interfaces. Essa formação ocorre quando moléculas de uma solução entram em contato com outra fase e acumulam (WALSTRA; VLIET, 2010).

A presença de monocamada e as deformações da superfície para a formação destas novas áreas (concavidades), bem como o processo de formação de espuma, podem ser observadas no diagrama apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Sequência da formação de espuma a partir de solução aquosa com tensoativo aniônico.



Fonte: Daltin (2011)

Na Figura 10 a presença de tensoativos (ou proteínas) mostra a formação de uma monocamada que recobre toda a superfície do líquido. Da etapa 1 a 5, durante a agitação da fase contínua, o ar é incorporado, gerando novas superfícies ar-líquido. O tensoativo se desloca para a nova superfície formada, recobrando-a, expondo sua fase hidrofóbica para o centro da bolha e a fase hidrofílica para a fase contínua. Devido à diferença de densidade, a bolha se dirige para a parte superior da solução. Nas etapas 5 e 6 é possível observar que quando a bolha chega próximo a superfície recoberta com tensoativo, ocorre uma repulsão devido a presença das cargas iguais. Em função dessa repelência, ocorre a formação de um filme líquido, com a presença de duas superfícies, uma voltada para a atmosfera e a outra voltada para o centro da bolha, conforme mostra as etapas 7 a 9. A força de repelência entre as duas camadas tem forte influência na espessura do filme líquido. Ou seja, quanto maior a repelência maior será a espessura do filme líquido formado (DALTIM, 2011).

Devido a variedade de aminoácidos, uma série de interações intermoleculares são possíveis na interface, incluindo ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos, eletrostáticos, ligações de dissulfeto e formação de interações de Wan der Waals (FOEGEDING; LUCK; DAVIS, 2006). Essas características tornam as proteínas moléculas

capazes de agir como surfactantes devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (LOMAKINA; MÍKOVÁ, 2006).

Uma vez que as proteínas atuam como surfactantes nestes sistemas, sua capacidade de formar e de estabilizar espumas são influenciadas por fatores ambientais e características moleculares. Dentre os fatores ambientais estão o pH, presença de sais, açúcares, lipídeos e a própria concentração proteica. Dentre as características moleculares associadas às proteínas se encontram: flexibilidade molecular, densidade, distribuição de cargas e hidrofobicidade (DAMODARAN, 2010).

2.6.1 Atividade de superfície das proteínas e formação de espuma

Para a formação de espumas proteicas, as proteínas devem apresentar atividade de superfície, isto é, devem ter a capacidade de entrar em contato com a superfície da fase contínua (líquido) e acumularem, formando uma monocamada (WALSTRA; VLIET, 2010). Para tanto, necessitam ter a capacidade de adsorver rapidamente na interface, desdobrar-se e orienta-se expondo seus grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na interface ar-líquido e reduzir a tensão interfacial (USTUNOL, 2015a). Além disso, devem ser capazes de formar filmes coesos, viscoelásticos, finos e resistentes na interface ar-líquido por meio de interações intermoleculares de modo a incorporar e estabilizar grandes quantidades de bolhas de gás (DAMODARAN, 2010).

Dentre as proteínas, algumas proteínas globulares apresentam capacidade de desdobrar-se na interface expondo seus grupos de aminoácidos hidrofóbicos, o que facilita o processo de adsorção, sendo considerado como um dos fatores chave na formação da interface (PHILLIPS; WILLIAMS, 2011). De acordo com Shaw (1975) a adsorção e orientação das cargas da proteína na interface são energeticamente mais favoráveis do que a dissolução em qualquer das duas fases. Entretanto, proteínas globulares que são altamente compactas tem a adsorção prejudicada e, conseqüentemente, promovem baixa redução da tensão interfacial, indicando a importância da flexibilidade proteica na capacidade de formação de espumas (DAMODARAN, 2010).

De acordo com Foegeding, Luck e Davis (2006) a capacidade da proteína, contida na solução, de adsorver na interface ar-líquido é um dos fatores mais importantes para formação de espumas a partir de

soluções proteicas. As propriedades moleculares das proteínas e as suas propriedades de formação e estabilização de espumas estão ligadas à cinética de adsorção e às propriedades interfaciais (WIERENGA; GRUPPEN, 2010).

Talansier et al. (2009) propuseram um processo de adsorção ou cinética de adsorção de proteínas na interface ar-líquido para formação de espumas. Segundo os autores este processo ocorre em quatro etapas sucessivas: 1) período de latência, que é o período necessário para que haja a redução da tensão superficial pela adsorção na interface; 2) difusão da proteína a partir do centro do fluido para a interface; 3) adsorção e desdobramento interfacial e 4) rearranjo dentro da camada de interface, formação de camadas múltiplas e gelificação interfacial.

Embora, conforme discutido, o processo de adsorção das proteínas seja fundamental na formação de espumas, as propriedades dos filmes líquidos finos formados entre bolhas de ar vizinhas também devem ser considerados (WIERENGA; GRUPPEN, 2010)

Na indústria de alimentos as espumas são importantes por sua contribuição no volume e textura de produtos alimentares, onde a incorporação de ar reduz a densidade do produto e aumenta seu volume. Sorvete, chantilly, massa de bolo e merengue são alguns exemplos onde espumas proteicas tem um papel importante nas características do produto (SAHIN; SUMNU, 2006). Muitas das espumas comestíveis são sólidas, obtidas por solidificação de uma espuma líquida por refrigeração (mousse de chocolate) ou cozimento (pão) (CANTANT et al., 2013).

Dentre as proteínas com atividade de superfície consideradas bons agentes espumantes estão as proteínas da clara do ovo, cuja composição é majoritariamente de proteínas globulares (USTUNOL, 2015 a; MINE, 2015). Elas têm sido utilizadas pela indústria de alimentos e nas artes culinárias, especialmente, em função das suas excelentes propriedades de formação de espuma (YANG; FOEGEDING, 2011).

As proteínas da clara são comumente usadas para estabilizar espumas pela capacidade de atuarem na interface ar-líquido e por serem mais estáveis quando comparadas a muitos surfactantes, devido à formação de uma película altamente viscoelástica (DAMODARAN, 2010; PHILLIPS; WILLIAMS, 2011). As diferenças nas características físico-químicas, como flexibilidade conformacional, hidrofobicidade/hidrofilidade, bem como, propriedades de superfície das

proteínas, são determinantes na atividade de superfície das proteínas da clara (DAMODARAN; ANAND; RAZUMOVSKY, 1998).

As propriedades espumantes da clara dependem das características químicas individuais, como massa molecular, pI, teor sulfrídila/dissulfeto (e outros) e de uma gama de proteínas que interagem na formação de espuma (RAIKOS; CAMPBELL; EUSTON, 2007).

A ovalbumina, ovomucina, ovomucóide e lisozima são as proteínas da clara que mais interferem nas propriedades de formação e estabilização de espumas, atuando como emulsificantes anfifílicos entre a fase gasosa e a fase líquida (MLEKO et al., 2007; VAN DEN BERG; JARA; PILOSO, 2015). Conforme Lau e Dickinson (2006) as globulinas contribuem para espumabilidade, a ovomucóide e globulinas retardam a drenagem da espuma e a lisozima forma complexos com a ovomucóide, resultando em uma maior resistência da película formada. Entretanto, dentre as proteínas da clara, a ovalbumina é a que possui maior influência nas propriedades de formação de espuma. Isso se deve a habilidade de adsorver-se rapidamente na interface durante o batimento, devido ao seu desdobramento parcial e agregação das moléculas de proteína na interface ar-líquido. Esse desdobramento expõe grupos sulfrídilas que são facilmente oxidados, formando ligações dissulfeto intermoleculares, que ajudam a estabilizar a espuma, formando um filme coeso e viscoelástico (LOMAKINA; MÍKOVÁ, 2006; WALSH, 2014).

Devido ao seu pH mais alcalino, as proteínas da clara tendem a atuar como tensoativos aniônicos, com maior concentração de cargas na parte polar (COO⁻). Essas cargas favorecem a interação das proteínas com a água presente na lamela, deixando a espuma mais estável (DALVIN, 2011).

A funcionalidade da proteína para a formação de espuma depende da hidrofobicidade e interações eletrostáticas e a atividade de superfície está relacionada ao tamanho molecular e a conformação dessas proteínas, uma vez que a composição de aminoácidos controla as características anfifílicas das proteínas, bem como sua habilidade de adsorver em interfaces (PHILLIPS; WILLIAMS, 2011). Desta forma, quando as proteínas da clara são desdobradas parcialmente, ficam mais flexíveis realçando suas propriedades anfifílicas, que por sua vez, facilitam a formação de espumas (ŽMUDZIŃSKI et al., 2014). Todavia, essa funcionalidade não é completamente compreendida, uma vez que a clara é composta por cerca de 40 diferentes proteínas e suas interações

afetam a formação da espuma (VAN DEN BERG; JARA; PILOSOF, 2015).

Quando se submete uma solução proteica ao batimento para formação de espuma é importante determinar a sua capacidade de formação de espuma (*overrun*) e, uma vez formada, determinar a fração relativa da fase líquida e de ar (fração fase gasosa), sua estabilidade e até mesmo observar a dinâmica destes processos através de técnicas de microscopia. No entanto, tais medidas podem ser difíceis de serem realizadas, uma vez que o processo de formação da espuma pode ocorrer simultaneamente com processos de desestabilização, fornecendo a este processo um caráter altamente dinâmico (FOEGEDING; LUCK; DAVIS, 2006).

2.6.2 Capacidade espumante (*Overrun*) e fração da fase gasosa (ϕ)

A capacidade espumante é um atributo em proteínas alimentares com importante aplicação na indústria alimentícia.

A capacidade de formação de espuma ou espumabilidade de uma solução é uma medida qualitativa da sua capacidade de produzir uma espuma quando é batida, agitada ou aerada (CANTANT et al., 2013). É uma propriedade funcional dependente de diversos fatores como: a natureza da proteína, sua solubilidade, estado de desnaturação, concentração e suas propriedades de interface (SGARBIERI, 1996).

A quantidade de ar incorporado em um dado volume de líquido define a capacidade desse sistema em formar espumas e pode ser descrito pelo *overrun*, que é definido como o aumento do volume (%) na matriz em relação ao volume inicial, atribuído à incorporação de ar para um dado volume de líquido (SAHIN; SUMNU, 2006). Para soluções proteicas, o *overrun* refere-se a expansão de volume da dispersão ou a área interfacial que pode ser criada devido a incorporação de ar (DAMODARAN, 2010; WALSTRA; VAN VLIET, 2010). O *overrun* é determinado como:

$$Overrun = \frac{Volume\ da\ espuma}{Volume\ de\ líquido\ inicial} \times 100$$

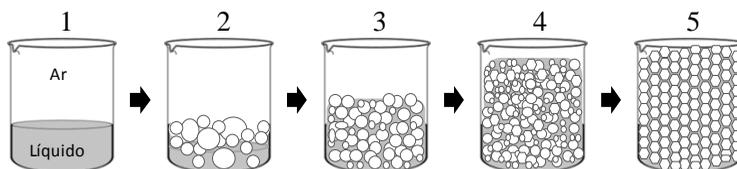
A capacidade espumante de uma solução proteica depende da concentração de proteína, das condições mecânicas em que ocorre o batimento, como a quantidade de energia fornecida. A quantidade de

energia necessária está relacionada à redução da tensão superficial, que limita a quantidade de área superficial criada e, portanto, o número de bolhas formadas (DALTIM, 2011). A tensão superficial é um parâmetro físico-químico de grande influência na formação de espumas que interfere no *overrun*. Para a formação de espumas mais estáveis, os líquidos devem possuir baixa tensão superficial, para que possam ser espalhados mais facilmente na interface ar-líquido (SAHIN; SUMNU, 2006).

A tensão superficial é a energia livre da superfície de um líquido ou a força que atua nela para se opor ao aumento da superfície, gerando uma tendência à retração, que como resultado tem-se a formação de uma membrana na superfície do líquido. A tensão superficial pode ser medida pela energia (mJ.m^{-2}) necessária para aumentar a área superficial ou a força (mN.m^{-1}) para romper a membrana criada na superfície do líquido (PASHLEYR; KARAMAN, 2004).

A capacidade espumante de uma solução proteica influencia na fração da fase gasosa (ou fração do volume de gás incorporado) (ϕ), que afeta a espessura do filme, distribuição e geometria das bolhas e, por conseguinte, a estabilidade da espuma. Conforme Walstra (1989), no início do batimento as bolhas formadas costumam ser de maior tamanho, mas, devido às forças de cisalhamento que agem sobre as bolhas em função do elevado gradiente de velocidade formado no líquido, as bolhas tendem a ser rompidas em bolhas menores. A formação de espuma em função da capacidade espumante pode ser observada no diagrama apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Ilustração sugerindo as etapas da formação de espuma em função da capacidade espumante.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017), com base em Mason (1999) e Langevin (2017)

Durante as etapas de formação de espuma (Figura 11), no início do processo tem-se a solução proteica (1), cuja fração gasosa é próxima de zero. Com o início do batimento ocorre a incorporação gradativa de

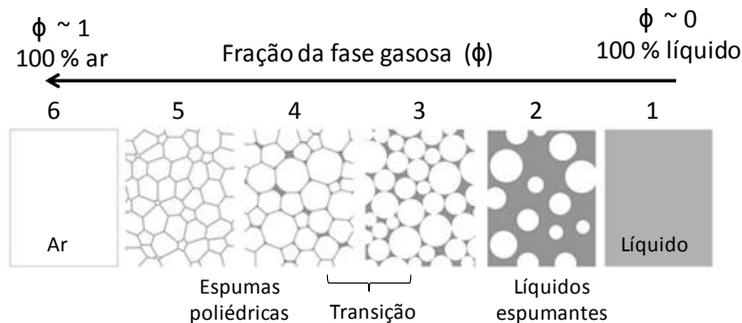
ar e a formação de bolhas de diâmetro maior e de geometria esférica, que migram para a parte superior do sistema devido a diferença de densidade (2). Em função da capacidade espumante e o efeito do cisalhamento, mais áreas superficiais são criadas, com o consequente aumento do número de bolhas e a redução do seu diâmetro (3 e 4). Finalmente, ocorre uma distribuição mais homogênea da fase contínua pela massa de bolhas e, quando o sistema atinge uma determinada incorporação de ar (fração gasosa), modifica-se a geometria das bolhas, que passam a ser mais poliédricas, apresentando filmes lamelares mais finos (5).

Embora o batimento permita a formação da espuma, o excesso pode provocar desnaturação extensa, agregação e precipitação das proteínas levando a redução do *overrun* (DAMODARAN, 2010). A teoria "Overbeating" sugere a ocorrência da coagulação excessiva das proteínas globulares na interface ar-líquido levando à formação de agregados insolúveis em função do batimento prolongado. Essa redução da capacidade de retenção de água das proteínas é responsável pelo colapso da espuma, que pode ser observado através do declínio do *overrun* (RAIKOS; CAMPBELL; EUSTON, 2007). De acordo com Lau e Dickinson (2005), em um sistema com batimento mais elevado há mais afinamento do filme líquido, maior deformação mecânica e mais ruptura de parede de bolha, o que contribui para o declínio do *overrun*.

A formação e morfologia das espumas também estão correlacionadas com fração de fase gasosa (ϕ) da espuma. A fração de fase gasosa (ϕ) define o quanto de ar está presente na espuma em um volume fixo através de uma medida adimensional, cujos valores variam de $0 \leq \phi \leq 1$.

Durante a formação de espuma, inicialmente tem-se um baixo valor de ϕ , mas, devido ao cisalhamento e incorporação de ar, ocorre o aumento da ϕ tendo valores próximos a 0,64. Valores acima de 0,64 e, quanto mais próximo de 1, estão associados a espumas com bolhas mais comprimidas, menos úmidas e com morfologia mais poliédrica (MASON, 1999). A correlação entre ϕ e a morfologia das espumas podem ser observadas na ilustração apresentada na Figura 12.

Figura 12 - Ilustração esquemática da geometria das espumas em função da fração da fase gasosa (ϕ)

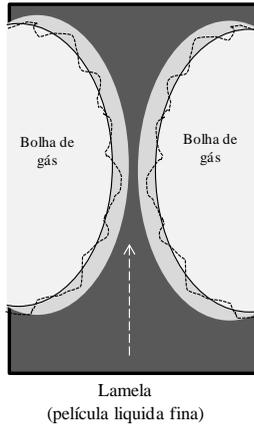


Fonte: Adaptado de Langevin (2017).

Observa-se que tanto a concentração quanto a geometria das bolhas estão relacionadas com a ϕ (Figura 12). Quando a ϕ ainda é baixa (2 e 3), têm-se espumas com bolhas mais esféricas de maior diâmetro e menos concentradas. Conforme ocorre o aumento da ϕ maior é o número de bolhas e menor seu diâmetro (4) e, devido a compressão entre as bolhas vizinhas, sua geometria passa a ser poliédrica (5).

Durante a formação de espuma tem-se a formação das regiões lamelares, onde se tem a fase contínua permeando as bolhas formadas (Figura 13). Quando a geometria da bolha é poliédrica as lamelas assumem um formato plano.

Figura 13 – Ilustração indicando a presença da lamela permeando as bolhas da espuma

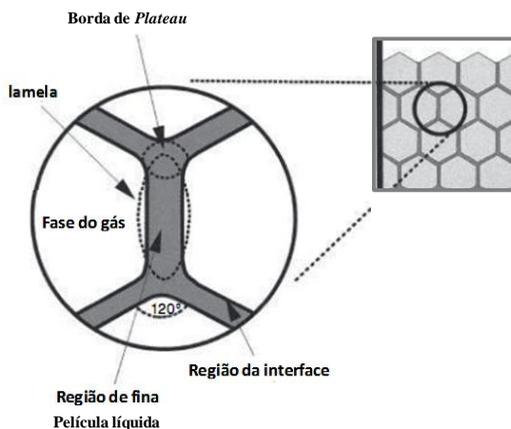


Fonte: Elaborado pelo autor (2017) com base em Damodaran (2005) e Schramm (2014)

Na Figura 13 é possível observar a região da espuma onde se tem a presença de duas bolhas rodeadas pela fase contínua. A seta aponta a presença da lamela, que se forma entre a interface de duas bolhas vizinhas muito próximas.

Espumas em que a fração da fase gasosa é baixa possuem uma maior quantidade de líquido retido entre as bolhas o que lhes confere uma forma mais esférica, em função de uma grande área côncava na fase contínua. No entanto, se a fração gasosa for elevada, a lamela se torna cada vez mais fina e plana, as bolhas podem deformar e assumir um formato poliédrico, ocorrendo a formação das bordas de *Plateau* (SCHRAMM, 2014; WILSON, 1989). As bordas de *Plateau* são canais líquidos resultantes do encontro do filme de três bolhas adjacentes, cujo formato lembra um prisma (DALVIN, 2011; LOUVET; ROUYER; PITOIS, 2009). A borda de *Plateau* pode ser observada na ilustração esquemática apresentada na Figura 14.

Figura 14 - Ilustração generalizada da região de união entre três filmes adjacentes de bolhas com formato poliédrico, indicando a formação das bordas de *Plateau*.



Fonte: Adaptado de Schramm (2014).

Aparentemente, a capacidade espumante e a estabilidade da espuma são influenciadas por propriedades moleculares diferentes que podem atuar de forma antagônica. Enquanto a qualidade da espuma depende, principalmente, da conformação assumida na superfície interfacial (flexibilidade) a estabilidade depende, especialmente, da ativação dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que compõem as proteínas e das propriedades reológicas do sistema (DAMODARAN, 2010; ŽMUDZINSKI et al., 2014).

2.6.3 Pressão de Laplace

Conforme a lei de Young-Laplace, se uma interface não for plana, a tensão superficial induz forças normais que são compensadas, em equilíbrio, pelas pressões de cada lado. Essa força é uma relação entre as pressões, a tensão e a forma da interface (CANTAT et al., 2013).

A pressão de Laplace é a diferença de pressões observada entre a face interna e externa de interfaces curvas e pode ser obtida a partir da equação de Young-Laplace (WALSTRA; VLIET, 2010):

$$P_1 - P_2 = \Delta P = \frac{2\gamma}{R}$$

Sendo:

P1 = Pressão lado côncavo (Pa)

P2 = Pressão do lado convexo (Pa)

γ = Tensão superficial ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

R = Raio (m)

A pressão de Laplace determina que a pressão na face côncava (interna) de uma interface curva (esferas, bolhas, gotas) é maior do que a pressão na parte convexa (exterior). Desta forma, quanto menor for o raio da esfera, maior será sua pressão interna e maior será a diferença de pressão entre as fases. Como consequência dessa pressão, as bolhas tendem a serem esféricas, o que dificulta sua deformação, sendo necessária a aplicação de uma força externa para que isso ocorra. Outra consequência dessa diferença de pressão é o aumento da solubilidade no líquido do gás contido em uma bolha (WALSTRA; VLIET, 2010).

Devido a essa diferença de pressão entre bolhas com diâmetros diferentes, o gás tende a difundir das bolhas menores para as bolhas maiores. Ou seja, qualquer processo que aumente o raio da bolha será espontâneo, pois reduzirá a pressão. Como consequência, ocorrem processos de desestabilização nas espumas, como a coalescência, maturação de Ostwald e o *coarsening* (DALTIM, 2011).

Quando o surfactante reduz a tensão superficial, a pressão de Laplace diminui e a interface pode ser deformada com mais facilidade. Quando as bolhas em uma espuma são deformadas ocorre a formação de regiões de filmes (lamelas) planos entre duas bolhas vizinhas e formação das bordas de *Plateau*. Isso causa um aumento na diferença de pressão entre a lamela e as bordas de *Plateau* (WALSTRA; VLIET, 2010). Essa diferença de pressão ocorre devido à presença de uma região convexa nas bordas de *Plateau* que, conforme a equação de Laplace, é uma região de baixa pressão. Como consequência, a fase contínua tende a fluir das lamelas para as bordas de *Plateau*, gerando um gradiente de pressão capilar uma vez que o líquido flui de uma região de alta pressão para uma região de baixa pressão. Em decorrência dessa diferença ocorre uma redução na estabilidade da espuma, podendo ocasionar afinamento do filme e sua consequente ruptura (DALTIM, 2011; SHAW, 1975).

2.6.4 Estabilidade

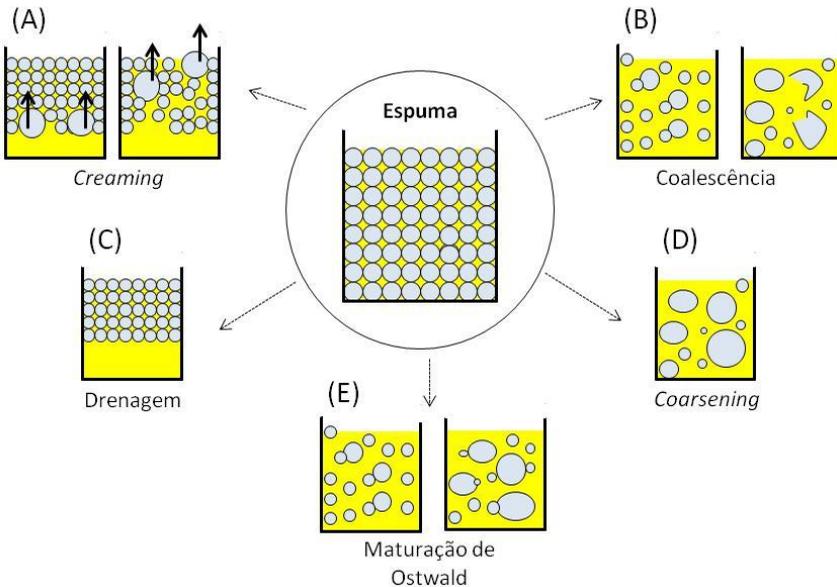
A estabilidade das espumas pode ser determinada pela quantidade de líquido drenado no tempo ou pela taxa de redução do volume da espuma, causado pela remoção do líquido do espaço entre as bolhas (NICORESCU et al., 2011; RITZOULIS, 2013).

Após sua formação, a espuma evolui por mecanismos interdependentes, destacando-se: a) drenagem do líquido; b) aumento de coesão entre as bolhas, devido às diferenças de pressão capilar e c) coalescência. A progressão desses processos determina o tempo de vida de uma espuma (LOUVET; ROUYER; PITOIS, 2009).

Alguns fatores afetam a estabilidade de espumas formadas, como a diferença de pressão, as características viscoelásticas dos tensoativos (proteínas) e a tensão interfacial (DAMODARAN, 2005). Outros fatores como a taxa de drenagem, que é afetada pela forma e tamanho da borda de *Plateau* e as propriedades da superfície ar-líquido, que são alteradas pela adsorção de moléculas que atuam como tensoativos, também podem afetar a estabilidade de uma espuma (KRUGLYAKOV et al., 2008).

De acordo com Figueredo, Ribeiro e Sabadini, (1999) o colapso das bolhas é um processo termodinamicamente favorável, uma vez que reduz a elevada área superficial da espuma e a expansão do gás contido nas bolhas que, como consequência, diminui a energia livre do sistema. De maneira ilustrativa, na Figura 15 é apresentado um diagrama com os mecanismos de desestabilização das espumas.

Figura 15 - Mecanismos de desestabilização das espumas



Fonte: Adaptado de Valderrama (2006)

2.6.4.1 Drenagem

A drenagem consiste no escoamento do líquido que ocupa o espaço entre duas bolhas de ar, produzindo o estreitamento das lamelas que separam-nas (Figura 15 - C) (DALTIM, 2011). Esse fenômeno ocorre pelo efeito da gravidade, diferença de pressão e de densidade entre as fases, pela viscosidade da fase contínua e pela estrutura ar-líquido em cada face das bolhas (ROSEN; KUNJAPPU, 2012 ; SHAW, 1975). Conforme Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2007) e Yang e Foegeding (2011), a taxa de drenagem pode ser retardada com o aumento da viscosidade da fase contínua, deixando o escoamento mais lento, bem como, limitando a difusão do gás da fase dispersa para o líquido.

Em espumas recém-formadas ou espumas mais cremosas, ocorre a presença de lamelas mais espessas, cuja drenagem é favorecida pela força da gravidade (ROSEN; KUNJAPPU, 2012). Após a drenagem inicial, com o afinamento do filme, ela passa a ser governada pelas forças interfaciais tensoativo-água e pelas forças de repulsão entre as

duas interfaces muito próximas (SHAW, 1975). Nessa etapa da drenagem, o processo tem maior influência da diferença de pressão, que favorece a sucção capilar do líquido intramolecular pelas lamelas (ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

A geometria das bolhas e distribuição de tamanhos pode influenciar a geometria da rede de espuma e no processo de drenagem (YANG; FOEGEDING, 2011). Nas espumas poliédricas a região da borda de *Plateau* possui uma menor pressão devido à curvatura da superfície, fazendo com que o líquido lamelar seja succionado em direção a esses canais para compensar a diferença de pressão (FIGUEREDO; RIBEIRO; SABADINI, 1999; LANGEVIN, 2000). Essa sucção favorece o aumento da concentração do líquido no fundo da espuma (LAU; DICKINSON, 2005). Durante a drenagem, o fenômeno de coalescência é favorecido, devido à desidratação da espuma o que ocasiona afinamento dos filmes e conseqüente ruptura, fazendo com que a espuma entre em colapso (LANGEVIN, 2017; SADAHIRA et al., 2016).

2.6.4.2 *Coarsening*

O *coarsening* é um fenômeno que ocorre como resultado da diferença de pressão que favorece a difusão de gás através da fase líquida de uma bolha para outra. Esse processo causa o desaparecimento das bolhas pequenas e aumento no tamanho das bolhas grandes (Figura 15 – D) (CANTAT, 2013).

Devido a maior pressão das bolhas de raio menor, elas tendem a perder mais gás para a fase contínua do que ganhar, tendendo a desaparecer. Por outro lado, as bolhas maiores recebem mais gás do líquido do que perdem, aumentando seu tamanho. Sendo assim, as bolhas pequenas tendem a desaparecer e as bolhas grandes a aumentar. Esse processo ocorre quando as espumas são mais cremosas. Em espumas mais secas, a difusão de gás se dá diretamente entre bolhas, causando a maturação de Ostwald (CANTAT, 2013).

O aumento do volume da bolha está associado á difusividade do gás através dos filmes, que depende da viscosidade da solução, da solubilidade do gás na fase contínua, da tensão interfacial e da geometria da rede de espuma, que é expressa em função da fração da fase gasosa (YANG; FOEGEDING, 2011).

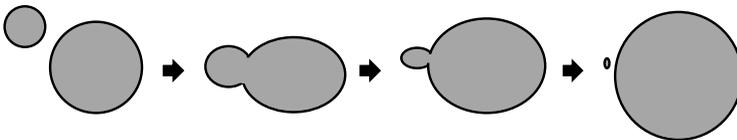
2.6.4.3 *Maturação de Ostwald*

Maturação de Ostwald, também conhecida como desproporção, é um fenômeno governado pela pressão de Laplace. É um fenômeno de desestabilização que ocorre devido à diferença de pressão entre as bolhas e entre a atmosfera, favorecendo a difusão do gás entre elas. Devido ao raio de curvatura a transferência de gás ocorre das bolhas de diâmetro menor (maior pressão) para as bolhas vizinhas de diâmetro maior (menor pressão) (WALSTRA; VLIET, 2010; WIERENGA; GRUPPEN, 2010).

O resultado destes processos é uma mudança na distribuição de tamanho de bolhas e diminuição no volume de ar que é retido no sistema, com o tempo. As forças motrizes para que estes processos ocorram são a diferença de pressão capilar entre bolhas de tamanhos diferentes (para a maturação de Ostwald) e apenas a pressão capilar em uma bolha (para difusão para a atmosfera) (DUTTA et al., 2004).

O fenômeno da maturação de Ostwald resulta em uma espuma com bolhas maiores, em um processo de crescimento as custas das bolhas menores (LAU; DICKINSON, 2005). Além disso, durante a difusão do gás entre as bolhas ocorre a mudança dos seus respectivos raios. Desta forma, as bolhas menores, quando próximas de bolhas maiores, encolherão cada vez mais rapidamente conforme se tornam menores (WALSTRA, VLIET, 2010) (Figura 15– E e Figura 16).

Figura 16 – Ilustração sugerindo o processo de difusão de gás entre bolhas vizinhas com raios diferentes, conhecido como maturação de Ostwald



Fonte: Elaborado pelo autor (2017) com base em: Lau e Dickinson (2005); Walstra e Vliet (2010) e Wierenga e Gruppen (2010)

De acordo com Laplace, as bolhas possuem maior pressão no seu interior e a difusão de gás também ocorre para a atmosfera (menor pressão), especialmente aquelas bolhas mais próximas da superfície (DALTIM, 2011).

A maturação de Ostwald pode ser considerada um processo espontâneo, pois quando duas bolhas ar colidem há uma vantagem termodinâmica na fusão entre elas para formar uma bolha única. O

processo de fusão das bolhas resulta na redução da área interfacial e, portanto, na redução da energia interfacial, razão pela qual é termodinamicamente espontânea (PASHLEY; KARAMAN, 2004).

2.6.4.4 *Creaming*

Creaming é um processo de separação entre a fase contínua e a fase dispersa em função da diferença de densidade entre elas (SADAHIRA et al., 2016). Nesse processo, o tamanho das bolhas é um fator importante uma vez que quanto maior for o raio das bolhas maior será força de flutuabilidade e mais rápida será a separação (YANG; BERRY; FOEGEDING, 2009). A velocidade de ascensão das bolhas é diretamente proporcional à diferença de densidade, pois quanto maior for essa diferença, maior será a força de empuxo resultante da bolha (DALVIN, 2011). O efeito do processo de *creaming* nas espumas pode ser observado na Figura 15 – A. Essa separação não tende a destruir as espumas, mas produz uma camada concentrada de espuma claramente separada da fase contínua. Isso causa a desidratação das bolhas o que favorece a ocorrência do processo de coalescência. Esse efeito pode ser reduzido em soluções mais viscosas (RITZOULIS, 2013).

2.6.4.5 *Coalescência*

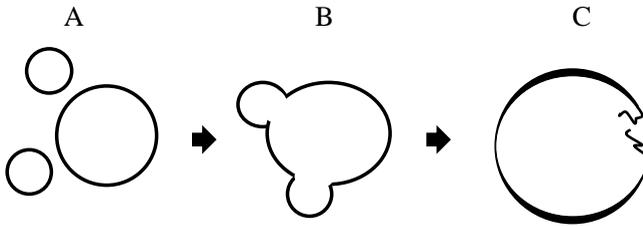
Qualquer processo que induz a ruptura do filme entre duas bolhas promove o colapso da espuma. Como a espessura do filme é pequena em relação à área de superfície, o filme entre duas bolhas é frágil e, facilmente rompido. Esse processo se chama de coalescência (Figura 15 – B) (WALSTRA; VLIET, 2010).

O resultado da coalescência é a redução do número total de bolhas em função da fusão entre elas. A ruptura do filme faz com que a espuma perca gás e o seu volume diminua até desaparecer completamente (CANTAT, 2013).

O diagrama ilustrativo do fenômeno de coalescência (Figura 17), sugere as etapas do processo de coalescência, onde inicialmente (A) observa-se uma região com a presença de bolhas de diâmetros diferentes e, portanto, com pressões também diferentes. Este gradiente de pressão entre as bolhas faz com que ocorra a difusão do gás contido nas menores para as de maior diâmetro (B) resultando em bolhas de diâmetro ainda maior. Este processo de aumento da bolha é

acompanhado por um afinamento da película e consequente rompimento (C).

Figura 17 – Diagrama ilustrativo sugerindo o fenômeno de coalescência em bolhas que compõem a espuma



Fonte: Elaborado pelo autor, (2017) com base em Walstra e Vliet (2010); Cantat (2013); Langevin (2017).

O escoamento da fase líquida através da borda de *Plateau* acelera o efeito da coalescência das bolhas devido à ocorrência do aumento da pressão capilar, promovendo a formação de fendas no corpo da espuma. Além disso, a espuma e a película líquida tornam-se seca e fina, respectivamente, levando a espuma ao colapso (KRUGLYAKOV et al., 2008; LANGEVIN, 2017).

O fenômeno de coalescência é influenciado pelas características viscoelásticas dos filmes, bem como, sua espessura. Se o filmes forem espessos e a interação coloidal entre as duas superfícies for desprezível o filme romperá se a concentração proteica for baixa. Em filmes finos, se a interação coloidal entre as superfícies não for suficiente para causar repulsão entre eles, o filme romperá facilmente (DALVIN, 2011).

Uma ferramenta importante para auxiliar a observação dos fenômenos de desestabilização, bem como a geometria em função da capacidade espumante é a microscopia. Através de ensaios de microscopia é possível observar os processos dinâmicos ocorridos em espumas após sua formação permitindo, através das análises de imagens, investigar as características geométricas e dinâmicas das bolhas que compõem uma espuma. Essas análises muitas vezes envolvem medidas do tamanho, geometria, movimento e crescimento das bolhas, bem como, seu comportamento individual (LAU; DICKINSON, 2005; RAIKOS; CAMPBELL; EUSTON, 2007; SADAHIRA et al., 2016).

2.6.5 Estudos que buscam melhorar a capacidade espumante e a estabilidade de espumas a partir de clara de ovo.

Embora as espumas sejam muito utilizadas no cotidiano e em processos industriais, tanto o processo de formação quanto a estabilização são complexos e afetados por diversos fatores intrínsecos ao sistema, bem como, pelos processos aplicados durante o processamento.

Tendo em vista a importância das espumas da clara de ovo para a indústria de alimentos, alguns estudos já foram conduzidos com o objetivo de se obter as melhores condições para capacidade espumante, bem como, em busca de uma melhor estabilidade da espuma após formada. Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2007) avaliaram os efeitos das propriedades espumantes de proteínas de clara de ovos frescos não tratadas, tratadas termicamente e com alta pressão separadamente. Os autores observaram que as claras tratadas apresentaram bolhas de tamanhos menores com menor sensibilidade à coalescência. Quando modificações no pH resultaram em maior solubilidade, as soluções apresentaram melhor capacidade de formação de espuma, quando comparadas às claras não tratadas. Song e colaboradores (2009), investigaram a aplicação de irradiação UV na clara do ovo fresco e na clara de ovo em pó e observaram que este tratamento resultou em um aumento na capacidade espumante, melhorando o volume, textura, cor e qualidade sensorial de pão de ló (*angel cake*) (produto em que foi incorporado a espuma).

As propriedades reológicas de espumas do albúmen desidratado após ser submetido ao tratamento com diferentes pH foram avaliadas por Mleko et al., (2007). Os autores observaram que as proteínas que foram submetidas ao tratamento ácido proporcionaram espumas mais firmes e com maior elasticidade quando comparadas às espumas não tratadas.

Arzeni, Pérez e Pilosof (2012) avaliaram a funcionalidade das proteínas de clara de ovo depois de serem submetidas ao ultrassom de alta intensidade. Os resultados obtidos apontaram uma forte redução do *overrun* da espuma tratada com ultrassom, bem como, uma maior drenagem durante todo o tempo de medição em comparação a espuma não tratada, o que leva a crer que a sonicação causou alterações nas proteínas afetando negativamente a formação e estabilidade das espumas. Os resultados sugerem ainda que a redução da viscosidade

aparente pode ter sido o fator determinante para esses efeitos prejudiciais, uma vez que a capacidade espumante e a estabilidade reduziram com a redução da viscosidade.

Raikos, Campbell e Euston, (2007) avaliaram os efeitos da sacarose e do cloreto de sódio nas propriedades espumantes da clara de ovo tratadas termicamente e concluíram que tiveram um impacto significativo nessa funcionalidade. O aumento da concentração de sal e do batimento melhorou a adsorção da proteína na interface ar-água e a presença do açúcar atrasou a formação de espuma, porém contribuiu para a estabilidade do sistema aerado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Para esse estudo foram utilizadas as claras: Fresca (clara obtida após abertura do ovo e separação da gema), clara pasteurizada líquida refrigerada e clara pasteurizada desidratada. As claras frescas foram adquiridas do comércio local, a partir de ovos classificados como Tipo Grande e Vermelho. A clara pasteurizada da marca Fleisheggs, contida em embalagens de 1 litro, foi adquirida no comércio local. A clara desidratada tipo *standart* (sem remoção ou adição de componentes) foi gentilmente doada pela empresa Sohovos em embalagens de 1 Kg.

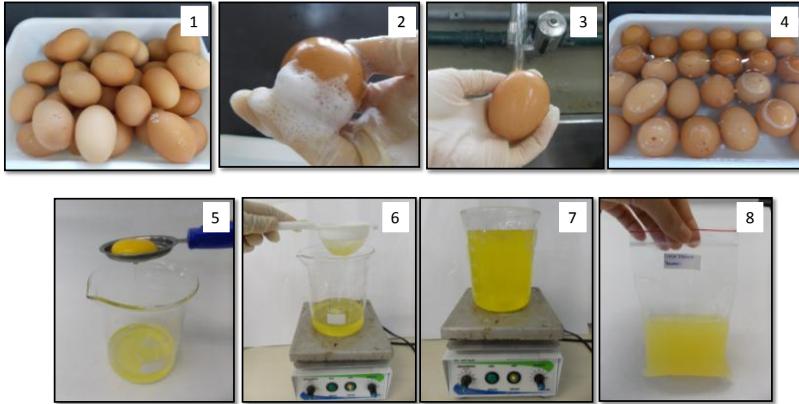
Neste estudo, será utilizada a designação de ovos e de clara de ovos para referir-se à ovos de galinha, conforme preconizado pela legislação brasileira: *“Pela simples designação "ovos" entendem-se o ovo de galinha em casca, sendo os demais acompanhados de indicação da espécie de que procedam”* (BRASIL, 1990).

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Clara Fresca

Foram preparadas ao longo dos ensaios três mixes de ovos, totalizando cerca de 205 ovos. Os ovos foram submetidos ao processo de higienização, onde foram lavados com auxílio de detergente neutro, enxaguados com água corrente e deixados submersos por 15 minutos, em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm). As claras foram separadas das gemas e transferidas para um copo béquer onde ficaram sob agitação por 1h em agitador magnético Dist (modelo DI-03). Posteriormente as claras foram filtradas com auxílio de peneira doméstica e mantidas sob agitação por mais 2 h. Depois de homogeneizadas o pH foi medido e as claras foram fracionadas em volumes de 150 mL, sendo depositadas em sacos de polietileno com fecho hermético. Os sacos contendo as claras foram mantidos em temperatura de refrigeração por no máximo 48 h. A ilustração do preparo pode ser observado na Figura 18.

Figura 18 - Preparo das amostras de clara fresca



Fonte: Próprio autor (2017)

1- Seleção dos ovos; 2 - lavagem com detergente; 3 - enxague em água corrente; 4 - desinfecção com hipoclorito; 5 - separação da clara e gema; 6 - peneiramento; 7 - homogeneização; 8 - fracionamento.

3.2.2 Clara pasteurizada líquida refrigerada

As claras pasteurizadas líquidas refrigerada foram mantidas em embalagem original e mantidas em temperatura de refrigeração, respeitando o prazo de validade. Ao longo do trabalho ela será designada de clara pasteurizada.

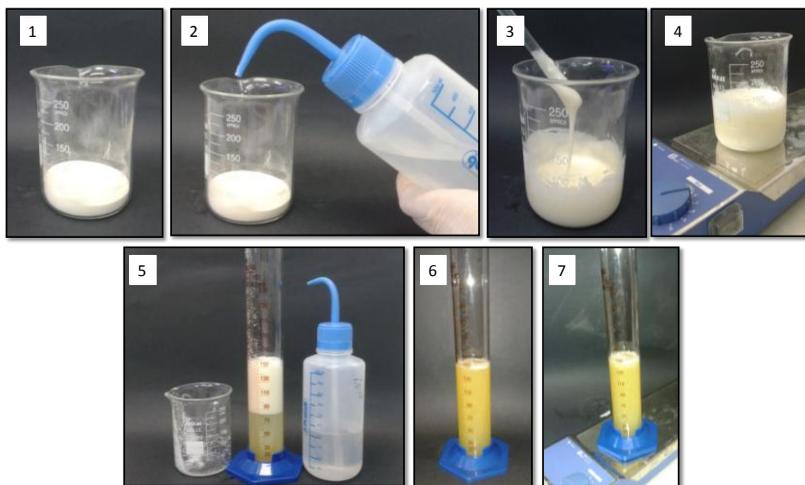
3.2.3 Clara desidratada (reconstituída)

As claras desidratadas foram mantidas na embalagem original em refrigeração, respeitando o prazo de validade.

A amostra foi reconstituída conforme metodologia descrita por Phillips, Haque e Kinsella (1987), com modificações. Foi preparada uma solução 10 % proteína (w/w), onde a clara foi pesada em um copo béquer de 200 mL. Em seguida foi adicionada uma pequena quantidade de água destilada e, com auxílio de um bastão de vidro, agitou-se até a obtenção de uma massa homogênea e viscosa. Após a massa formada e homogeneizada, aos poucos, foi adicionado cerca de 100 mL de água, sempre mexendo a suspensão com o bastão de vidro. O béquer foi colocado sobre um agitador magnético da marca Ika (modelo RO5) e a suspensão permaneceu em constante agitação por 15 minutos. Em seguida, a suspensão foi transferida para uma proveta de 250 mL e o

volume foi completado para 150 mL e permaneceu sob agitação por mais 30 minutos e, posteriormente, foi verificado o pH. A reconstituição da clara desidratada pode ser observada na Figura 19.

Figura 19 - Reconstituição da clara desidratada



Fonte: próprio autor (2017)

1 – Clara desidratada; 2 – Adição de fração de água destilada; 3 – Homogeneização até formação de massa viscosa; 4 – Agitação; 5 e 6 – ajuste para o volume de 150 mL; 7 – Agitação final.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS CLARAS

As claras fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída foram caracterizadas quanto ao pH, umidade, proteínas, açúcares redutores, cor, autofluorescência, viscosidade, tensão superficial e comportamento térmico.

3.3.1 Medida do pH

O pH foi medido logo após o preparo das amostras de clara fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída, seguindo a metodologia descrita por IAL (2008) (método 01/IV). Todas as medidas foram conduzidas com as amostras na temperatura de 25 ± 2 °C. A determinação foi feita com auxílio de potenciômetro PHTEK (modelo PHS-3B) previamente calibrado com tampão de ácido bórico (pH 10,0 \pm

0,05) e tampão fosfato (pH $7,0 \pm 0,05$) ambos da Lefan Química Fina LTDA.

3.3.2 Teor de umidade

A determinação de umidade foi feita por gravimetria, conforme a metodologia AOAC (1996), (método 926.12). As amostras, em triplicata, foram levadas para a estufa a vácuo 12 l Marconi (modelo MA030/12) a 70 °C por 6 h. O teor de umidade foi expresso em g.100g^{-1} (grama de água por cem gramas de clara) em base úmida (b.u.) e em base seca (b.s.)

3.3.3 Determinação da fração proteica

O teor de nitrogênio total foi determinado aplicando-se o método Kjeldahl modificado, seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1996), (método 991.20), aplicando-se o fator de correção de nitrogênio em proteínas de 6,25. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e teor de proteína foi expresso em g.100g^{-1} (grama de proteína por cem gramas de clara) em b.u. e em b.s.

3.3.4 Determinação do teor de açúcares redutores pelo método do ácido dinitro 3,5-salicílico (ADNS)

A análise do açúcar redutor foi conduzida pelo método do ácido dinitro 3,5-salicílico descrito por Miller (1959). Para construção da curva padrão foram utilizadas concentrações de 25, 125, 250, 375 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de D (+) glucose anidra P.A. Vetec

A clara desidratada foi reconstituída conforme descrito no **item 3.2.3** e para a leitura de absorbância, uma alíquota de 2 mL de cada clara, previamente diluída foi transferida para tubos de ensaio e adicionado 1 mL de ADNS. Posteriormente, os tubos foram mantidos em banho-maria em ebulição por 5 minutos e, pós resfriar, transferidos para cubeta onde foram lidos em espectrofotometro Hitachi (modelo U-1800) no comprimento de onda de 540 nm. Toda as medidas foram realizadas em triplicata.

3.3.5 Análise colorimétrica (cor)

Para a determinação da cor, 100 mL de amostra de cada clara (fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída) foram transferidas para um copo béquer de 250 mL separadamente onde permaneceram em agitação por 1 h com auxílio de agitador magnético Ika (modelo RO5). Após homogeneização, uma alíquota de 12 mL foi transferida para cubeta de vidro e foi realizada a determinação da cor utilizando colorímetro Konica Minolta Chroma Meter (modelo CR-400) (Osaka, Japão), ajustado para operar com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°, previamente calibrado. A cor de cada amostra foi determinada em triplicata e para cada medida foram feitas quatro leituras (doze leituras por amostra).

A escala de cor CIELab foi utilizada para calcular os parâmetros L^* , a^* e b^* . Onde o parâmetro L^* apresenta variação entre 0 a 100, indicando a variação de cor de preto para branco; o eixo a^* mostra a variação de vermelho ($+a^*$) para verde ($-a^*$), enquanto que o eixo b^* mostra a variação de amarelo ($+b^*$) para azul ($-b^*$). A partir dos valores de L^* , a^* e b^* foram determinados o índice de escurecimento (IE) conforme Palou et al. (1999), descrito na Equação 1 e a diferença total de cor (ΔE^*) conforme Okpala, Piggott e Schaschke (2010), descrita na Equação 2.

$$IE = \frac{100(x-0,31)}{0,172} \quad \text{Sendo: } x = \frac{a+1,75L}{5,645L+(a-3,012b)} \quad (1)$$

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

3.3.6 Autofluorescência

Para avaliar a autofluorescência da clara foi utilizada a clara desidratada reconstituída que, para obter uma melhor visualização, foi analisada em forma de espuma. Cerca de 30 mL de clara desidratada reconstituída foram transferidos para copo béquer e batida com auxílio de um batedor de arame adaptado ao mixer Philips Walita (modelo Linha Vida) por um tempo de 3 minutos. Em seguida foi transferida uma pequena quantidade de espuma para lâmina e levada para o microscópio. A autofluorescência foi avaliada em microscópio Olympus

BX 41 com sistema de epifluorescência. Durante a medida foram usados os filtros azul, verde e vermelho, cujos comprimentos de onda de excitação e emissão são apresentados na Tabela 3. A captura das imagens foi feita em câmera digital colorida com 3.3 mpixel e com programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1, ambos da Q-imaging.

Tabela 3 - Comprimento de onda de excitação e emissão dos filtros para imagem de fluorescência das espumas da clara

Filtro	Excitação (nm)	Emissão (nm)
Azul (U-MWU2)	330 à 385	420
Verde (U-MWB2)	460 à 490	520
Vermelho (U-MGW2)	510 à 550	590

Fonte: Lameb (2017).

3.3.7 Viscosidade aparente (η_a)

Para a determinação da viscosidade, cerca de 20 mL das amostras de clara fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída foram transferidos para frasco âmbar e mantidas em agitação com auxílio de agitador magnético Ika (modelo RO5) por 24 h, em temperatura de refrigeração. O volume de 1,5 mL de cada amostra foi transferido para Eppendorf de 2 mL e centrifugado por 25 minutos em centrífuga MiniStar. Uma alíquota de 0,5 mL, retirada do centro do eppendorf, foi usada para a análise em reômetro Brookfield (modelo DV-II), ligado ao banho termostático Quimis (modelo MQBTC 99-20). A análise seguiu a metodologia descrita por Arzeni, Pérez e Pilosof (2012), com modificações. As condições usadas foram: temperatura a 25 °C; taxa de cisalhamento de 90 a 450 s⁻¹; cone CP-40 com ângulo de 0,8° e GAP entre o cone e a placa de 0,013 mm. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Os parâmetros foram ajustados pelo modelo matemático Ostwald-deWaele (Lei da Potência) conforme Equação 3 e a viscosidade aparente (η_a) foi determinada através do modelo Newtoniano conforme Equação 4. O critério estatístico aplicado para discriminar a qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi R² (coeficiente de determinação).

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

Sendo:

τ = Tensão de cisalhamento (Pa);

K = Índice de consistência do fluido (Pa.sⁿ);

γ = Taxa de deformação (s⁻¹);

n = Índice de comportamento do fluido (adimensional)

$$\tau = \eta_a \gamma' \quad (4)$$

Sendo:

τ = Tensão de cisalhamento (Pa)

γ' = Taxa de deformação (s⁻¹)

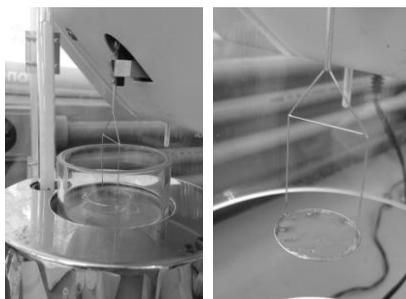
η_a = Viscosidade aparente do fluido (Pa.s)

3.3.8 Determinação da tensão superficial

A medida de tensão superficial foi realizada pelo método do Anel Du Noüy, que permite determinar a força (mN.m⁻¹) requerida para retirar um anel metálico de área conhecida da superfície do líquido.

Para a determinação da tensão superficial (Figura 20) cerca de 20 mL das amostras de clara fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída foram transferidos para frasco de vidro e acoplados no tensiometro de anel Du Noüy marca Krüss (Alemanha), previamente calibrado com água, acoplado em um sistema termostaticado com temperatura constante de 25 °C. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Figura 20 - Tensão superficial pelo método do anel Du Noüy



Fonte: Próprio autor (2017).

3.3.9 Análise termogravimétrica (TGA)

Devido à grande quantidade de massa de água nas claras fresca e pasteurizada, anteriormente às medidas de TGA, foi necessário realizar uma etapa de liofilização. Cerca de 50 mL de clara fresca e de clara pasteurizada foram transferidos para balão de 250 mL e foram rapidamente congeladas com nitrogênio líquido. Posteriormente, foram liofilizados em *Freeze Dryer* Edwards (modelo Micro Modulyo 1,5 L) (Inglaterra). Após a liofilização, as amostras foram transferidas para sacos de polietileno, fechadas hermeticamente e mantidas em temperatura de refrigeração até a realização das análises.

Após a etapa de liofilização, as claras fresca e pasteurizada, juntamente com a clara desidratada foram mantidas em dessecador com sílica gel por 20 dias em temperatura ambiente. Posteriormente, foram encaminhadas para análise em TGA onde 6 ± 2 mg de amostra foram transferidas para panela de alumínio e adaptada à termobalança do TGA Shimadzu (Japão). As condições de análise foram: taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em um intervalo de temperatura de 20 a $800 \text{ }^\circ\text{C}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $70 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

3.3.10 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Cerca de 20 mL das amostras de clara fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída foram transferidas para um copo béquer de 50 mL e mantidas sob agitação por 1 h com auxílio de agitador magnético Ika (modelo RO5). A análise seguiu as metodologias descritas por Arzeni, Pérez e Pilosof (2012) e Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2006), com modificações. Alíquotas de 12 ± 2 mg foram transferidas para capsula de alumínio, pesadas em balança analítica Bioprecisa (modelo FA2104N), fechadas e analisadas em calorímetro Shimadzu DSC-50 (Japão). As condições de análise foram: taxa de aquecimento de $2 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ num intervalo de temperatura de 0 a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Todas as medidas foram feitas em duplicata. A entalpia de desnaturação (ΔH_d) foi calculada a partir do pico da área do termograma entre as temperaturas de 45 e $98 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPUMAS

As espumas obtidas a partir das claras fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída foram caracterizadas quanto a capacidade espumante através dos ensaios de *overrun* (%), fração da fase gasosa e densidade; quanto a estabilidade através de ensaios de drenado (% DR), pelo tempo de meia vida e por análise morfológica com auxílio de microscopia óptica de fluorescência.

3.4.1 Capacidade espumante

3.4.1.1 *Overrun*

A medida de *overrun* (%) foi baseada na metodologia descrita por Phillips, Haque e Kinsella (1987), com modificações. Para essa medida 140 mL de clara foram transferidas para um copo béquer de 250 mL e a temperatura foi ajustada para 25 °C. Em seguida, o volume foi pesado em balança analítica Mettler Toledo (modelo AE100) e transferido para planetária Arno 4 L (modelo Deluxe) onde foi batido por três minutos em velocidade 7. Posteriormente, uma parcela da espuma foi transferida para um recipiente com volume calibrado de 140 mL, foram aplicados duas leves batidas na base do recipiente, a superfície da espuma foi nivelada com auxílio de uma espátula e o recipiente foi pesado. A espuma retornou para a batedeira onde foi batida repetindo esse procedimento em intervalos de três minutos até três medidas após as espumas atingiram seu *overrun* máximo. Para cada medida tomou-se o cuidado para não haver formação de bolhas de ar no recipiente e o tempo de medida entre transferir a espuma para o recipiente e retorná-la para a planetária foi de no máximo três minutos. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os valores de *overrun* foram determinados conforme Equação 5. A partir destes resultados foram construídas as curvas de *overrun* (%) em função do tempo de bateção.

Para observar o efeito da capacidade espumante das claras analisadas em relação ao aumento do volume da espuma, a análise de *overrun* foi registrada por imagem com auxílio de câmera digital Nikon (modelo Coolpix L320)

$$\% \textit{overrun} (t) = \frac{\text{wt.140 mL de clara} - \text{wt.140 mL de espuma}}{\text{wt.140 mL de espuma}} \times 100 \quad (5)$$

Sendo:

% *Overrun* (t) = Percentagem de *overrun* no tempo

Wt. = Massa (g) num volume de 140 mL

3.4.1.2 *Fração da fase gasosa*

Através dos ensaios de *overrun* podem-se obter os valores da fração da fase gasosa (ϕ) das espumas, que corresponde à medida de quanto de ar está presente na espuma dentro de um volume fixo. A fração da fase gasosa segue a tendência da capacidade espumante, ou seja, quanto maior for o *overrun*, maior será a fração da fase gasosa.

A fração da fase gasosa (ϕ) das espumas de clara fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída foram determinadas conforme descrito por Davis e Foegeding (2007) (Equação 6), sendo determinadas a partir dos valores de *overrun*, conforme descrito no **item 3.4.1.1**.

$$(\phi) = \frac{\% \textit{overrun}}{\% \textit{overrun} (+100)} \quad (6)$$

Sendo:

ϕ = Fração da fase gasosa (%)

% *overrun* = Capacidade espumante (%)

3.4.1.3 *Densidade*

A densidade das espumas foi calculada usando-se como base as massas das claras e das respectivas espumas obtidas durante as análises de *overrun* (**item 3.4.1.1**), sendo determinada conforme Equação 7.

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (7)$$

Sendo:

ρ = Densidade (g.cm^{-3})

m = Massa (g)

v = Volume (mL)

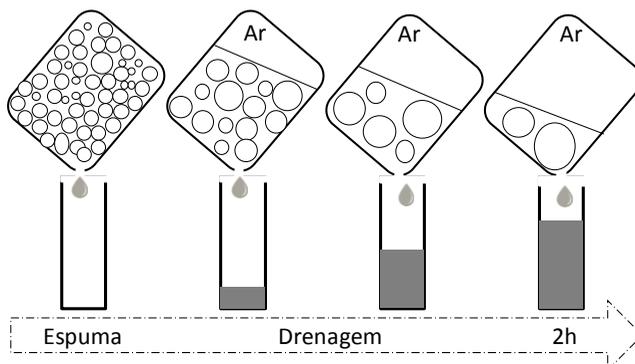
3.4.2 Estabilidade das espumas

3.4.2.1 *Percentagem de drenado*

A estabilidade da espuma pode ser determinada medindo a taxa de drenagem líquida ou a taxa de diminuição no volume de espuma com o tempo (RAIKOS; CAMPBELL; EUSTON, 2007). Para esse estudo, preferiu-se medir a estabilidade das espumas de clara F, P e S, pela massa (g) da drenagem líquida da espuma, convertida em % de drenado (% DR).

As medidas de percentagem de drenado (% DR) das espumas das claras fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída foram realizadas conforme metodologia descrita por Phillips, Haque e Kinsella (1987) com modificações. Uma massa de 145 g de clara foi transferida para a planetária onde foi batida durante o tempo necessário para atingir o *overrun* máximo de cada clara, definido previamente nos ensaios do **item 3.4.1.1**. Em seguida, a espuma foi cuidadosamente transferida para um recipiente com volume de 2 L contendo um orifício de 4 mm de diâmetro. O recipiente foi fechado e suspenso de modo que uma proveta de 100 mL recebesse o drenado. Em intervalos de 10 minutos, durante um período de 2 h, a proveta contendo o drenado foi pesada em balança analítica Mettler Toledo (modelo AE100) e a razão de drenagem (% DR) em função do tempo foi determinada conforme Equação 8. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O processo de drenagem pode ser observado na Figura 21.

Figura 21 - Sequência esquemática da drenagem da espuma durante um período de repouso



Fonte: Próprio autor, (2017).

Durante a análise de % DR o volume do drenado, bem como, a espuma recém-formada e a espuma após o fim da drenagem (120 minutos) foram registrados com auxílio de câmera digital Nikon (modelo Coolpix L320).

$$\% DR = \frac{Md(t)}{Ms} \times 100 \quad (8)$$

Sendo:

% DR = Razão de drenagem

Ms = Massa (g) da solução proteica inicial (clara)

Md (t) = Massa (g) do drenado no tempo

3.4.2.2 *Tempo de meia vida*

O tempo de meia vida foi definido como o tempo necessário para que metade do fluido inicial fosse drenado das espumas das claras fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída, conforme descrito por Yang, Berry e Foegeding (2009). As espumas foram preparadas conforme descrito no **item 3.4.2.1**, onde o tempo foi acompanhado através do drenado da espuma sendo recebido por uma proveta de 100 mL.

3.4.3 **Análise microestrutural por microscopia óptica de fluorescência**

Neste estudo, as imagens das espumas de claras fresca, pasteurizada e desidratada reconstituída, foram dinamicamente observadas utilizando microscopia óptica de fluorescência, sendo também analisadas quantitativamente. Desta forma, objetivou-se estabelecer relações entre as características morfológicas das espumas e as propriedades físico-químicas das claras.

3.4.3.1 *Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de overrun*

Para avaliar a morfologia e o comportamento das espumas durante os ensaios de *overrun*, 140 mL de clara fresca, pasteurizada ou desidratada reconstituída foram transferidos para o recipiente da planetária, foi adicionado Eritrosina e submetidas ao batimento conforme descrito no **item 3.4.1.1**. Pequenas porções de espumas após três minutos de batimento, no tempo de batimento do *overrun* máximo e no final de batimento, para as respectivas claras, foram analisadas em microscópio Olympus BX 41 com sistema de epifluorescência. Para a

análise, foi usado o filtro verde cujos comprimentos de onda de excitação e emissão são apresentados na Tabela 3, descrita no **item 3.3.6**. A captura das imagens foi feita em câmera digital colorida com 3.3 mpxel e em programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1, ambos da Q-imaging. Todas as os ensaios foram feitos em duplicata.

Para determinar a distribuição de bolhas, foram selecionadas seis imagens para cada tempo de batimento estabelecido e valores foram apresentados como média e desvios padrão.

Para determinar a espessura do filme, foram escolhidas quatro imagens para cada tempo de medida e os valores foram apresentados como média e desvios padrão.

3.4.3.2 *Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de estabilidade: avaliação das mudanças estruturais dinâmicas*

Para esse ensaio, 145 g de clara fresca, pasteurizada ou desidratada reconstituída foram transferidos para planetária e adicionado Eritrosina. Em seguida, as claras foram batidas no tempo de *overrun* máximo definido nos ensaios de *overrun* para cada clara (**item 3.4.1.1**). Em seguida uma porção de espuma foi transferida para uma placa e acoplada ao microscópio invertido Olympus IX83. As medidas foram realizadas com filtro verde, durante o período de 120 minutos. As imagens foram obtidas com a objetiva de 4x e capturadas com câmera digital colorida com 17 mpxel da Olympus DP73 e o programa de captura de imagens CellSens Dimension 1.12.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos valores médios das medidas, quando cabíveis, foram efetuadas pelo teste de Tukey, com diferença significativa de 5 % entre os valores após a análise de variância (ANOVA), utilizando o *software* Statistica[®] versão Ultimate Academic.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS CLARAS

4.1.1 Umidade, pH, proteína e açúcares redutores

Os resultados em termos de umidade, teor proteico e pH das amostras de claras frescas (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teores de umidade, proteína e pH para claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).

	Amostras de clara ($\bar{X} \pm S$) (g.100g ⁻¹)		
	F	P	S
Umidade (b.u.)	87,9 ± 0,1	87,4 ± 0,2	6,7 ± 0,1
Proteína (b.u.)	10,0 ± 0,1	11,1 ± 0,2	77,9 ± 0,7
Proteína (b.s.)	83,2 ± 0,5	88,0 ± 1,2	83,4 ± 0,8
pH (25°C)	9,4	9,1	9,5
Açúcares redutores (%)	0,55 ± 0,01 ^a	0,32 ± 0,00 ^b	0,20 ± 0,03 ^c

$\bar{X} \pm S$ – média e desvio padrão

As claras F apresentaram teores de 88 % de umidade e 10 % de proteína em base úmida (b.u) (Tabela 4). A composição físico-química da clara é bem documentada e os estudos relatam teores entre 86 e 88 % para umidade e entre 9,7 e 11 % para proteínas (POWRIE; NAKAI, 1986; WALSH, 2014; MINE, 2015). Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os reportados para clara fresca por Aquino et al. (2014) que relatam valores de 88 % de umidade e 11 % (b.u) de proteína e com os valores descritos pela *United States Department of Agriculture*, USDA (2016), que apontam valores de 87,6 % de umidade e de 10,9 % (b.u) para proteína.

As claras P obtiveram resultados similares aos encontrados para as claras F, com teores de 87 % de umidade e de 11 % (b.u.) para proteínas. Este comportamento era esperado, uma vez que a amostra pasteurizada não é submetida a nenhum processo que modifique sua umidade e seu teor de nitrogênio que constitui a base do método de

determinação de proteínas. Entretanto, a clara desidratada S, devido ao processo de secagem, apresentou valores de umidade de 6,7 % e de proteína de 83 % (b.s). Esses resultados estão de acordo com o reportado por Belitz, Grosch e Schieber (2009) uma vez que afirmam que claras desidratadas possuem umidade máxima de 8 % e de proteína mínima de 80 % (b.s), enquanto que para claras pasteurizadas são 10,5 % de umidade e 88 % (b.s) de proteína. Esses resultados também estão de acordo com o reportado pela USDA (2016) que indicam valores de umidade de 88 % e 6 % e proteína de 10 % e 81 % para clara pasteurizada e clara desidratada, respectivamente. Em trabalho recente com clara desidratada, Gomes e Pelegrine (2012) reportam teores de umidade e proteína de 6 % e 75 %, respectivamente corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Por outro lado, os estudos conduzidos com clara em pó por Arzeni, Pérez e Pilosof (2012) e Davis e Foegeding (2007), reportam teores proteicos (b.s) de 89 % e 83 %, respectivamente, indicando que a origem e as condições de processo às quais as claras são submetidas podem ocasionar variações nos teores das proteínas que compõem esse ovoproduto.

Quando os resultados das proteínas são avaliados em base seca é possível observar que as amostras de claras F, P e S apresentaram concentrações de proteínas similares, variando entre 83 % e 88 %.

Os valores de pH foram similares entre as claras estudadas, variando entre 9,1 e 9,5. Isso pode indicar que os processos de pasteurização e secagem, aos quais essas claras foram submetidas, não causaram modificação nesse parâmetro. O pH é um parâmetro importante como indicador da qualidade dos ovos, interferindo inclusive, nas propriedades funcionais das claras. As claras apresentam pH em torno de 7,6 a 7,9 enquanto frescas e, devido às condições de armazenagem (temperatura, UR%) e o tempo de comercialização após a postura, o pH se eleva para valores próximos a 9,7 (BELITZ; GROSCH, SCHIEBER, 2009; PISSINATI et al., 2014), porém o pH na clara pode ser observado facilmente em uma faixa de 8,4 a 9,2 (STRIXNER, 2011). Em claras pasteurizadas líquidas o pH não difere da clara fresca, apresentado valor próximo a 9,1 (STRIXNER, 2011), estando de acordo com o encontrado neste trabalho.

Gomes e Pelegrine (2012) avaliaram o efeito do pH sobre a solubilidade das proteínas de clara de ovo desidratadas e reportam que as proteínas das claras em pH 9,0 apresentam menor solubilidade quando comparadas a claras em pH 7,5. Estas alterações na solubilidade

das proteínas pelas mudanças de pH altera as propriedades de formação de espumas uma vez que interferem na formação de filmes interfaciais (LOMAKINA; MÍKOVÁ, 2006).

Durante o período de armazenagem os ovos sofrem mudanças físico-químicas que aumentam o pH das claras, devido principalmente à perda de dióxido de carbono (CO₂) e água para a atmosfera. Essa perda de água promove mudanças na viscosidade da clara por liquefação, o que favorece a migração da água da clara para a gema em função da pressão osmótica, provocando a redução da altura e diminuição do percentual da clara no ovo (FIGUEIREDO et al., 2011; FREITAS et al., 2011; SIEBEL et al., 2005).

Os valores de açúcares redutores obtidos para as claras F, P e S foram de 0,55, 0,32 e 0,20 %, respectivamente (Tabela 4), ambos apresentando diferença estatística significativa entre si ($p \leq 0,05$).

É possível observar que conforme as claras foram submetidas aos tratamentos, os valores de açúcares redutores foram menores, quando comparados à clara F, em especial para clara S, que apresentou menor concentração de açúcares e a maior soma de processamentos (pasteurização e desidratação).

A clara possui cerca de 1 % de carboidratos, sendo de 0,4 - 0,5 % ligados a proteínas e o restante presente na forma livre, cujo 98 % compostos por glicose considerada como uns dos monossacarídeos mais reativos a Maillard (BELITZ; GROSCH; SCHIEBER, 2009). Os açúcares redutores são substratos para a reação de Maillard, que é favorecida em pH alcalino e se torna mais reativa com o aumento da temperatura (DAMODARAN, 2010).

Além da presença de açúcares redutores, a reação de Maillard é favorecida em pH entre 6 e 8, ocorrendo preferencialmente em pH alcalino (SHIBAO; BASTOS, 2011). Silva et al. (2015) observaram que em pH 9,0 ocorre uma maior velocidade de reação de Maillard em açúcares como glicose, uma vez que em pH alcalino o grupo amina (livres, de peptídeos e de proteínas), está desprotonado. A desprotonação é necessária para que ocorra o ataque nucleofílico ao grupo carbonila, o que a torna mais reativa. Handa e Kuroda (1999) apontam que o aquecimento induz a reação de Maillard e a formação de complexos proteína-glicose em clara de ovos com a presença de carboidrato, sendo a reação favorecida em pH alcalino. Desta forma, uma vez que as claras P e S apresentam cerca de 1 % de carboidratos, possuem pH acima de 9,0 e sofrem processamento térmico, a reação de

Maillard é favorecida, tendo como consequência a redução dos açúcares redutores e a ocorrência do escurecimento desses produtos.

Os menores valores de açúcar redutor observados para a clara S podem ser devido a soma dos processos térmicos onde, após a pasteurização e durante a secagem, pode ocorrer a intensificação da reação de Maillard uma vez que o aumento da temperatura aumenta a sua reatividade, diminuindo, desta forma, a concentração desses açúcares nessa clara (SILVA et al. 2015).

4.1.2 Cor das claras F, P e S

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios dos parâmetros de cor para as amostras F, P e S.

Tabela 5 - Análise colorimétrica das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).

Parâmetros	Amostras de clara ($\bar{X} \pm S$)		
	F	P	S
L*	53,69 ± 0,16 ^a	42,24 ± 0,10 ^b	38,95 ± 0,97 ^c
a*	-3,03 ± 0,03 ^a	-0,44 ± 0,02 ^b	-0,78 ± 0,06 ^c
b*	16,72 ± 0,28 ^a	15,10 ± 0,11 ^b	19,81 ± 1,15 ^c
ΔE^*	-	11,81 ± 0,25 ^a	15,22 ± 0,62 ^b
IE	31,49 ± 0,72 ^a	41,66 ± 0,32 ^b	65,48 ± 3,23 ^c

Valores seguidos da mesma letra na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

L* (luminosidade); a* (croma verde-vermelho); b* (croma azul-amarelo) ΔE^* (diferença total de cor); IE (índice de escurecimento).

Os parâmetros L* a* b* (Tabela 5) se mostraram estatisticamente diferentes para todas as claras ($p < 0,05$). Os parâmetros de a* e b* indicam que todas as claras possuem cor tendendo ao amarelo-esverdeado, sendo a clara F significativamente mais intensa com relação cor verde e a clara S mais intensa com relação a cor amarela ($p < 0,05$). As claras normalmente apresentam-se translúcidas, contudo, uma coloração amarelada ou esverdeada pode ser indicativo de maiores quantidades de riboflavina (vitamina B₂), uma vez que a clara é uma fonte natural dessa vitamina (ARAÚJO et al. 2015). A riboflavina é uma vitamina hidrossolúvel, cujo nome é atribuído a cor amarela do grupo

flavínico e a presença de ribose em sua estrutura e tem sido atribuído a cor amarelo-esverdeado em produtos lácteos derivados do soro de leite (VANNUCCHIO; HELIO; CUNHA, 2009).

Os valores do parâmetro L^* (Tabela 5) foram significativamente maiores para a clara F seguida pela clara P, sendo menor para a clara S. Isso indica que as claras F são mais luminosas, ou seja, possuem uma tonalidade de cor mais clara do que as demais amostras, o que pode estar associado ao efeito do processamento térmico sobre a cor das claras P e S devido à reação de Maillard. Esses resultados corroboram com os resultados do índice de escurecimento (IE) que revelaram um escurecimento das claras a medida que as mesmas foram processadas. A clara S mostrou ser mais escura (maiores valores de L^* e IE^*) seguida pela clara P. Além disso, na avaliação da diferença total de cor (ΔE^*), observou-se que as claras P e S apresentaram cor diferente em relação à clara F, sendo a clara S a que apresentou maior diferença. Estes resultados, no que se refere aos parâmetros L^* , IE e ΔE^* , da clara F em relação às claras P e S podem estar relacionados à reação de Maillard, favorecida pelos tratamentos térmicos aos quais as claras P e S foram submetidas, corroborando com os resultados de açúcares redutores discutidos a partir da Tabela 4.

A pasteurização em claras, mesmo sendo realizada em temperaturas amenas, pode desencadear a reação de Maillard, causando escurecimento nestes produtos, além de interferir na solubilidade e nas propriedades funcionais, bem como na estabilidade de espumas feitas a partir dessas claras (ARAÚJO et al., 2015; KATO et al., 1988).

O escurecimento também pode estar relacionado à reação de Maillard para a clara S, o qual pode ter sido favorecido pelos processamentos (pasteurização e desidratação) e durante a estocagem, uma vez que a temperatura e a atividade de água entre 0,4 e 0,7 favorecem essa reação (RANNOU et al., 2013; SHIBAO; BASTOS, 2011). Além disso, alguns trabalhos com ovalbumina-glucose liofilizadas demonstraram aumento da coloração marrom ou escurecimento durante o período de estocagem, sendo associados à formação de complexos ovalbumina-glucose na fase inicial da reação de Maillard (KATO; WATANABE; SATO, 1981; KATO et al., 1988).

O escurecimento pode ser mais intenso em claras desidratadas do que em claras que foram apenas pasteurizadas, uma vez que a temperatura empregada no processamento da primeira é maior, mesmo que por um curto período (BOBBIO; BOBBIO 1995). Essa intensificação da cor pode ocorrer na secagem, uma vez que Maillard é

dependente da temperatura e desta forma, quando a temperatura aumenta, há um acréscimo da reatividade aumentando, desta forma, o escurecimento (SILVA et al., 2015).

Uma vez que a mudança de cor das claras pode ocorrer durante a secagem e o período de estocagem (RANNOU et al., 2013), muitas indústrias processadoras de clara desidratada, buscando evitar essas alterações físico-químicas, realizam a etapa de remoção dos carboidratos antes da secagem. Esse procedimento geralmente é realizado após a pasteurização por processo fermentativo uma vez que, em geral, a secagem é realizada por meio *spray dryer* (BELITZ; GROSCH; SHIEBER, 2009; LECHEVALIER; NAU; JEANTET, 2013). Vale ressaltar que as amostras de clara desidratada utilizadas para os estudos nesse trabalho são do tipo *Standart*, ou seja, não foram submetidas a etapa de remoção dos seus açúcares. Desta forma, foi possível correlacionar os resultados das análises de açúcares redutores e de cor com o processamento térmico ao qual foram submetidas.

4.1.3 Autofluorescência

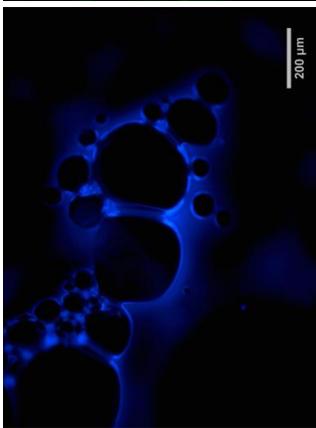
Análises prévias da clara do ovo com auxílio de microscopia óptica de fluorescência evidenciaram a autofluorescência de compostos presentes nessa solução proteica. Sendo assim, são apresentadas na Figura 22 as imagens de microscopia óptica de fluorescência das espumas de clara S com ampliação de 100 vezes, utilizando os filtros azul, verde e vermelho, cujos comprimentos de ondas de excitação e de emissão estão disponíveis na Tabela 3 do **item 3.3.6**.

A imagem ilustrativa na Figura 22 evidencia o fenômeno de fluorescência na clara quando as espumas foram submetidas aos filtros azul (A) e verde (B), cujos comprimentos de onda de emissão são 420 e 520 nm, respectivamente. Contudo, a fluorescência não foi observada quando as espumas da clara foram avaliadas com o filtro vermelho (C) (emissão a 590 nm), indicando que as moléculas presentes não fluorescem nesse comprimento de onda.

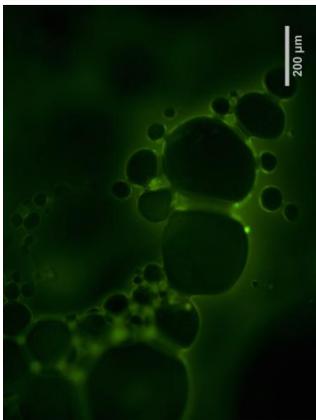
Embora as imagens tenham sido obtidas da espuma com o objetivo de uma melhor visualização, a autofluorescência está associada à composição química da clara, conforme será oportunamente discutido neste trabalho.

Figura 22 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência com ampliação de 100 vezes das espumas de clara desidratada reconstituída (S) para observação do fenômeno de autofluorescência.

(A) Filtro azul



(B) Filtro verde



(C) Filtro vermelho



A clara apresenta em sua composição diversas vitaminas hidrossolúveis, especialmente as do complexo B. Dentre elas, a riboflavina ou vitamina B₂, cuja concentração na clara é próxima a 300 µg/100g (LOPÉZ-FANDIÑO, 2007) e que pode ter sido responsável por conferir cor amarelo-esverdeado às claras, conforme discutido no **item 4.1.3.**

A riboflavina é uma molécula conhecida por apresentar elevada fluorescência (COMBS JR, 2008; GREGORY, 2010). Além disso, apresenta um espectro visível de 420 a 560 nm, com um amplo pico de emissão de fluorescência na região de 525 a 531 nm (BELITZ; GROSCH; SCHIEBER, 2009; SÁDECKÁ; TÓTHOVÁ, 2007). Esses valores estão dentro dos comprimentos de onda de emissão aplicados nesse trabalho. Desta forma, a presença da riboflavina pode ser uma das responsáveis por promover a fluorescência observada nas espumas da clara de ovo.

Embora não tenha sido encontrados estudos que associem a fluorescência em claras à riboflavina, este fenômeno tem sido reportado em leite e derivados. Karoui et al. (2007) estudando a caracterização do queijo macio por espectroscopia de fluorescência, relataram a presença de um pico de fluorescência em 522 nm, o qual associaram à presença de riboflavina e uma região de fluorescência de 444 a 479 nm, referentes ao lumicromo, um produto da decomposição da riboflavina.

A fluorescência observada na clara também pode estar associada à presença de compostos resultantes da reação de Maillard, uma vez que os mesmos apresentam fluorescência, cuja região de emissão se encontra entre 305 e 450 nm, com emissão máxima em 440 nm (KAROUI et al., 2006; SÁDECKÁ; TÓTHOVÁ, 2007).

Outros componentes como o triptofano e a vitamina A apresentam fluorescência (KAROUI et al. 2006). Todavia, a vitamina A por ser lipossolúvel, se encontra na gema e o triptofano apresenta emissão a 290 nm, estando abaixo do aplicado nesse trabalho, portanto possivelmente não estão associados à fluorescência observada na clara.

4.1.4 Viscosidade aparente

Durante a produção e transformação de alguns produtos incluindo bolos e molhos, a clara de ovo é submetida a processos tais como bombeamento, pasteurização, congelamento e secagem onde o conhecimento das propriedades reológicas é fundamental no controle e qualidade do processamento (ABBASNEZHAD; HAMDAMI;

KHODAEI, 2015), sendo assim na Tabela 6 são apresentados os parâmetros reológicos obtidos a partir dos ajustes dos modelos matemáticos Newtoniano e *Ostwald-de-Waele* aos dados experimentais de medida de viscosidade a 25 °C das amostras de clara F, P e S.

Tabela 6 - Parâmetros reológicos à temperatura de 25 °C das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) para os Modelos de Ostwald-of-Waele e Newtoniano.

Amostras	Modelo <i>Ostwald-de-Waele</i>			Modelo Newtoniano	
	K (mPa.s ⁿ)	n (adimensional)	R ²	η_a (mPa.s)*	R ²
F	8,9	0,857	0,999	3,67 ± 0,15 ^a	0,991
P	5,2	0,891	0,999	2,70 ± 0,25 ^b	0,995
S	6,0	0,900	0,998	2,65 ± 0,03 ^b	0,994

Valores seguidos de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*Viscosidade em função da Taxa de cisalhamento em 450 s⁻¹

K = Índice de consistência; n = índice do comportamento do fluxo; η_a = Viscosidade aparente.

Observa-se que os valores de viscosidade aparente (η_a) das claras P e S foram de 2,70 mPa.s e 2,65 mPa.s respectivamente, não apresentando diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$). A clara F apresentou valor de viscosidade de 3,67 mPa.s, sendo significativamente maior do que os valores encontrados para as claras P e S. A maior viscosidade observada na clara F, quando comparada com as claras que foram pasteurizadas e desidratadas, pode estar associada a dois efeitos de naturezas diferentes: o efeito dos tratamento térmico sobre as estruturas proteicas em função dos processos térmicos (pasteurização e secagem) e às modificações que ocorrem nas claras devido à estocagem antes do consumo ou processamento (PISSINATI et al., 2014; RANNOU et al., 2013).

É importante ressaltar que as condições de análise e preparo da amostra podem influenciar na medida de viscosidade. Para esse estudo as claras ficaram sob agitação *overnight* e, devido a sensibilidade do equipamento quanto a presença de partículas, as claras foram centrifugadas antes da análise. Tais condições podem ter influenciado nos resultados obtidos. Por essa razão, assim como em outros trabalhos

publicados, os valores obtidos são de difícil comparação em função das diferenças na taxa de deformação aplicadas, bem como, diferentes métodos de preparação das amostras.

Ohata e Viotto (2011) encontraram valores de viscosidade aproximados a este trabalho para claras desidratada (5 mPa.s) e clara pasteurizada (7 mPa.s). Apesar de a temperatura de análise e o pH das amostras serem similares, a taxa de deformação foi inferior ao aplicado nesse trabalho. Arzeni, Pérez e Pilosof (2012), em estudos com clara desidratada reconstituía, obtiveram valores de viscosidade de 2,8 mPa.s, corroborando com o obtido nesse trabalho. No entanto, Nicorescu e colaboradores (2011) apresentaram valores de viscosidade superiores (7,0 mPa.s) para a clara desidratada reconstituída. Lucisano e colaboradores (1996) obtiveram redução nos valores de viscosidade devido ao tempo e temperatura de armazenagem das claras. Para clara fresca mantida em temperatura de refrigeração (5 °C) a viscosidade reduziu de 19 para 6,9 mPa.s. Vale ressaltar que a temperatura de medida e as taxas empregadas foram inferiores a esse trabalho. O mesmo comportamento foi observado por Shenga, Singh e Yadav (2010) em claras fresca e pasteurizada e por Kemps e colaboradores (2010) em clara fresca.

Alguns estudos apontam que a viscosidade da clara é dependente da temperatura e é afetada por tratamentos térmicos, como o da pasteurização, que costumam causar aumento na viscosidade da clara devido ao efeito de desdobramento parcial das proteínas. Em trabalho com ovos líquidos, De Souza e Fernández (2013) observaram que a clara apresentou aumento na viscosidade após ser pasteurizada. Ressaltaram ainda que a clara, quando avaliada a 63 °C, apresenta maior viscosidade quando comparada a com a clara avaliada a 25 °C. Os autores sugerem que esses comportamentos ocorrem devido à formação de agregados proteicos causados pelo tratamento térmico e pela temperatura. Resultados similares foram apresentados por Lucisano e colaboradores (1996) que em estudos com clara fresca observaram aumento na viscosidade da clara submetida a temperatura de 62 °C, quando comparada com temperaturas inferiores a esse valor e por Shenga, Singh e Yadav (2010), que observaram aumento na viscosidade da clara após a pasteurização. Ambos os autores associam esse comportamento à formação de agregados proteicos durante a desnaturação em virtude da temperatura e do tratamento térmico, uma vez que a temperatura próxima a 60°C coincide com a temperatura de desnaturação da ovotransferrina.

Neste estudo, o aumento da viscosidade em função do processamento térmico das claras estudadas (P e S) não foi observado, conforme observado por outros autores. A menor viscosidade observada nas claras P e S quando comparadas à clara F pode ter sido influenciada por mudanças estruturais na clara, devido ao período e condições de armazenagem, bem como, na etapa de transporte através de tubulações durante os tratamentos, ou estar associada à alterações no pH com consequente liquefação do albúmen.

A redução da viscosidade da clara pode iniciar logo após a postura do ovo, devido a alterações químicas e bioquímicas como a perda de água e dióxido de carbono (CO₂) através da casca, com consequente aumento no pH e liquefação (LUCISANO et al., 1996; SPADA et al., 2012). O aumento do pH em claras durante a estocagem é influenciado pelo tempo e temperatura de armazenagem, aumentando rapidamente nos dias iniciais de estocagem (5 a 10 dias). A elevação do pH reduz a viscosidade por desestabilizar o complexo ovomucina-lisozima, considerados importante para a viscosidade da clara em ovos frescos.

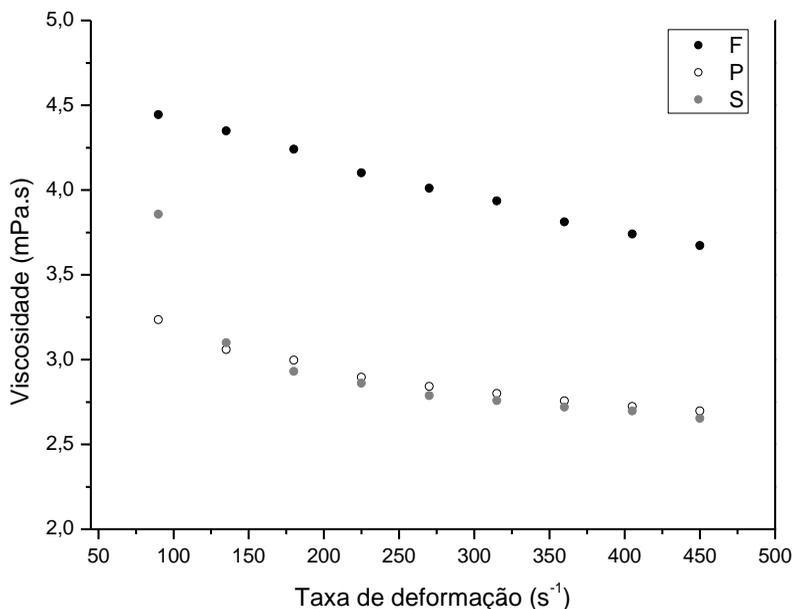
Shenga, Singh e Yadav (2010) avaliaram os efeitos da pasteurização e das condições de estocagem na qualidade de ovos intactos (dentro das respectivas cascas). Os autores observaram um leve aumento na viscosidade da clara fresca após pasteurização e sugerem que essa alteração se deva a desnaturação parcial das proteínas. Por outro lado, relatam que as condições de estocagem reduziram acentuadamente a viscosidade, tanto da clara fresca quanto da clara pasteurizada. Isso indica que as alterações físico-químicas, em especial, o aumento do pH, foram os fatores que influenciaram mais significativamente na liquefação do albúmen.

Além do aumento do pH, o processo de transporte das claras através das tubulações e a aspersão para secagem em *spray dryer* também podem causar mudanças nas propriedades reológicas das claras. Kemps e colaboradores (2010) avaliaram a viscosidade de claras com e sem homogeneização do albúmen fino e espesso e relatam que nas claras homogeneizadas os valores de viscosidade foram significativamente menores do que nas claras não homogeneizadas, indicando que ocorrem modificações nas propriedades de escoamento do albúmen quando submetido a agitação mecânica.

Para avaliar o comportamento do fluido e o efeito da taxa de deformação sobre a viscosidade da clara são apresentadas na Figura 23

as curvas de correlação entre a viscosidade aparente (mPa.s) e taxa de deformação (s^{-1}) para as claras F, P e S.

Figura 23 - Curvas da viscosidade (mPa.s) em função da taxa de deformação (s^{-1}) para as claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída(S).



Através das curvas (Figura 23) é possível observar que a viscosidade apresenta um declínio com o aumento da taxa de deformação para todas as claras avaliadas. Essa dependência da taxa de cisalhamento, com conseqüente decaimento da viscosidade, é um indicativo do comportamento de um fluido pseudoplástico, embora não haja consenso no que se refere o comportamento reológico das claras de ovos de galinha, sendo relatados tanto como fluidos newtonianos e como não newtonianos.

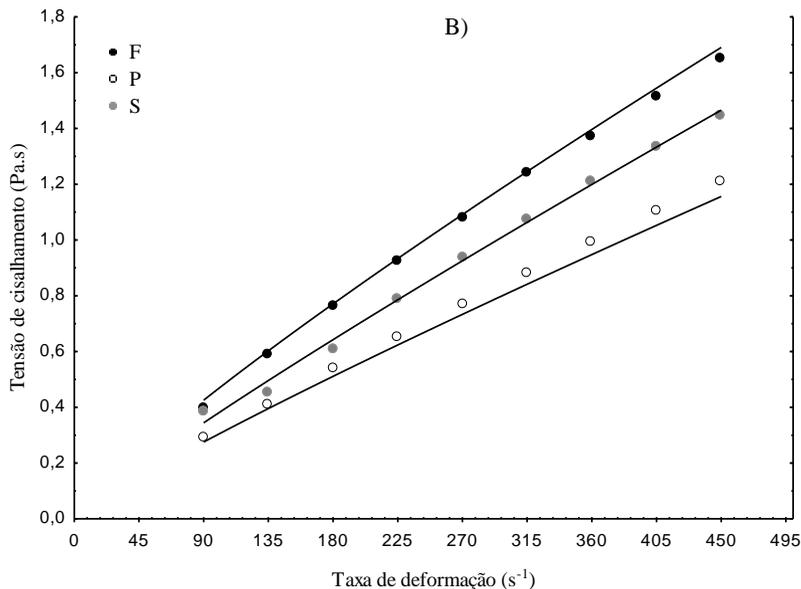
O comportamento da viscosidade de soluções proteicas é influenciado por fatores como tamanho, forma, flexibilidade molecular no estado hidratado e interações proteína-solvente. Segundo Damodaran (2010) soluções proteicas não apresentam comportamento newtoniano, devido à tendência destas moléculas de se orientarem em direção ao fluxo o que causa a redução da viscosidade com a taxa de cisalhamento, comportamento reológico esse chamado de pseudoplástico.

De Souza e Fernández (2013) e Kumbár e colaboradores (2015) classificam a clara como fluido pseudoplástico, corroborando com o observado neste estudo. Embora Kemps e colaboradores (2010) não tenham sugerido uma classificação reológica para a clara fresca, observaram que houve redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Em contra partida, Ohata e Viotto (2011) em estudos do comportamento reológico de constituintes do ovo, afirmam que as claras pasteurizada e desidratada reconstituída, apresentaram comportamento newtoniano. Assim como Nicorescu e colaboradores (2011), que classificaram a clara desidratada reconstituída como um fluido newtoniano.

Embora Lucisano e colaboradores (1996) tenham observado um índice de comportamento do fluxo de 0,64 para claras frescas (indicando um comportamento pseudoplástico), ressaltaram que com o envelhecimento dos ovos os valores de n aumentaram, sendo um indicativo de uma possível transição de fluido pseudoplástico para newtoniano. Isso poderia explicar porque é possível observar comportamento tanto newtoniano como não newtoniano nas claras.

A correlação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação também define o comportamento reológico de um fluido. Para a análise dos dados experimentais foram escolhidos os modelos reológicos comuns aplicados em clara de ovos, o modelo de *Ostwald-of-Waele* (conhecido como Lei da Potência) e o modelo Newtoniano. Os parâmetros dos ajustes para cada modelo são mostrados na Tabela 6, apresentada no início da discussão deste item. A curva com o ajuste matemático pelo modelo de *Ostwald-de-Waele* é apresentada na que correlaciona a tensão de cisalhamento com a taxa de deformação é apresentada Figura 24.

Figura 24 - Modelo matemático de Ostwal-of-Waele ajustado aos dados experimentais de tensão de cisalhamento (mPa.s) e taxa de deformação (s^{-1}) para as claras F, P e S.



O modelo Newtoniano e o modelo de *Ostwald-of-Waele* representaram um bom ajuste aos dados experimentais com valores de R^2 maiores que 0,991 para ambos os modelos (Tabela 6). Entretanto, o modelo de *Ostwald-de-Waele* resultou em um melhor ajuste, apresentando valores médios de R^2 igual ou superior a 0,998 ($p \leq 0,05$) em todas as amostras (Tabela 6), mostrando ser um modelo mais adequado para explicar o comportamento reológico das claras dentro das condições analisadas.

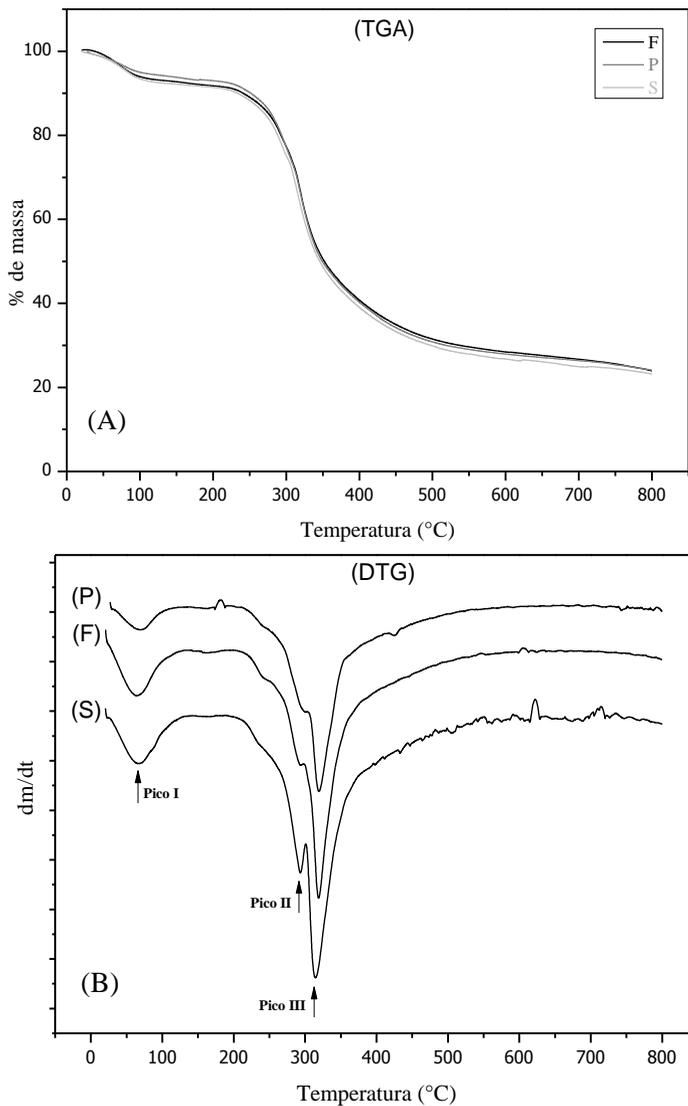
Os valores do índice de consistência (k) para o modelo de *Ostwald-de-Waele* foram de 8,9, 5,2 e 6,0 $mPa.s^n$ para as claras F, P e S, respectivamente. Por outro lado, os valores de viscosidade aparente obtidos na taxa de deformação de $450 s^{-1}$ foram de 3,67 $mPa.s$ (clara F), 2,70 $mPa.s$ (clara P) e 2,65 $mPa.s$ (clara S), valores esses menores do que os obtidos pelos valores de k (Tabela 6). Além disso, os valores de n para todas as claras foram menores que 1, indicando novamente um comportamento pseudoplástico das claras analisadas. Os produtos de ovo líquido são conhecidos por serem fluidos com índice de comportamento $0 < n < 1$, e a sua viscosidade aparente mostra uma

dependência da taxa de cisalhamento. Este comportamento pode ser atribuído a efeitos da quebra de ligações fracas entre as proteínas como resultado do cisalhamento o que leva a uma ruptura parcial da rede proteica. Como resultado, as moléculas são dispostas na direção do cisalhamento, diminuindo a resistência ao fluxo o que diminui sua viscosidade (DE SOUZA; FERNÁNDEZ, 2013).

4.1.5 Análise termogravimétrica (TGA)

Por meio de ensaios termogravimétricos (TGA) pode-se obter informações importantes da estabilidade térmica das claras. Sendo assim, na Figura 25 A são apresentadas as curvas dos termogramas TGA (% de massa em função da temperatura) e a Figura 25 B, a DTG (derivada da TGA em $\text{dm} \cdot \text{dt}^{-1}$) das amostras de claras F, P e S.

Figura 25 - Termogramas TGA (A) e DTG (B) das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada (S).



*Nota: As letras indicadas nas curvas de DTG: P, F e S referem-se as amostras de clara pasteurizada, fresca e desidratada, respectivamente.

É possível observar que todas as claras analisadas apresentaram o mesmo comportamento de degradação conforme apresentado nos termogramas de TGA (Figura 25 A). As claras apresentaram três estágios de perda de massa, indicando o processo de degradação térmica das mesmas, que ocorreu até a temperatura em torno de 500 °C. Essa temperatura de degradação máxima (500 °C) corrobora com valores de degradação para clara de ovo reportado por Gabal (2009) que relata, através de ensaios de TGA, degradação de clara em temperatura máxima de 500 °C

Os estágios de perda de massa podem ser melhores observados quando as curvas de TGA são derivadas, obtendo-se picos de degradação que correspondem à taxa máxima de degradação térmica da amostra conforme se observa nas curvas de DTG (Figura 25 B). Através das curvas de DTG fica evidente que ocorrem três estágios de degradação em temperaturas similares para todas as amostras de claras analisadas, indicados nessas curvas como picos I, II e III.

O primeiro estágio de perda de massa ocorreu na faixa de temperatura entre 25 a 130 °C, apresentando taxa máxima de degradação ~ 67 °C (pico I). O segundo estágio de degradação ocorreu em uma faixa de temperatura em torno de 205 a 300 °C, com taxa máxima de degradação ~ 292 °C (pico II). Por último, o terceiro estágio de degradação é observado em uma faixa entre 305 a 500 °C, com taxa máxima de degradação próxima a 315 °C (pico III).

A primeira etapa de perda da massa das amostras das claras F, P e S pode ser atribuída, principalmente, a desidratação dessas claras devido à evaporação da água remanescente contida nas amostras. Nessa faixa de temperatura também ocorrem mudanças estruturais das principais proteínas contidas nas claras, relacionadas com o processo de desnaturação. Essas mudanças serão melhores exploradas nos ensaios de DSC, que serão apresentados na sequência dessa análise.

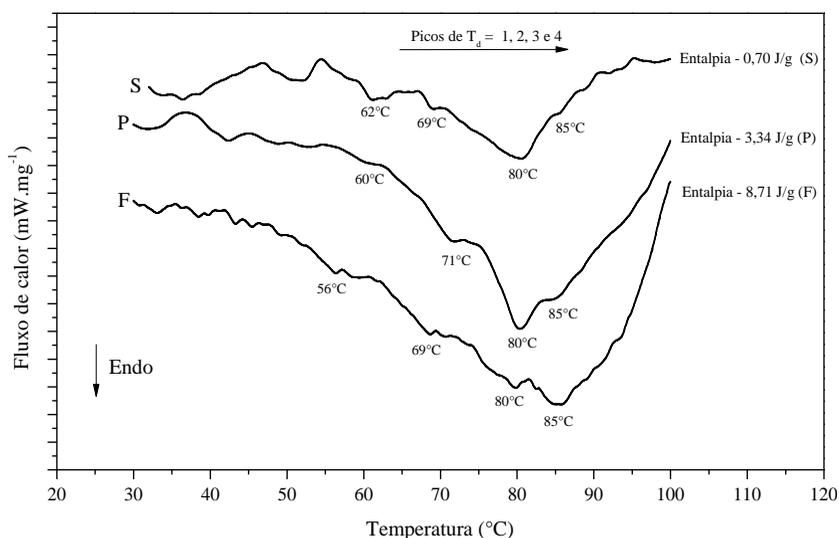
Devido à natureza de sólidos contidos na clara, majoritariamente, compostos por proteínas, a segunda etapa de perda de massa pode ser relacionada à degradação térmica de cadeias polipeptídicas, conforme sugerido por Duce e colaboradores (2012) em ensaios com ovalbumina. Conforme Damodaran (2010) as proteínas quando aquecidas acima de 200 °C sofrem processo de pirólise e decomposição. Nessa faixa de temperatura, referente ao pico II, poderia ainda ocorrer a saída de água fortemente ligada às proteínas, a qual necessita de maior energia para mudança de estado (DURMUS et al., 2009), e a degradação de proteínas como a lisozima (ELKORDY; FORBES; BARRY, 2002).

Na terceira etapa de perda de massa, tem-se a temperatura máxima de degradação dentro das condições analisadas, sendo a mesma para todas as claras avaliadas. Esse comportamento indica que os processamentos térmicos aos quais as claras P e S foram submetidas não afetaram a composição química e, portanto, a estabilidade térmica dessas claras nessa faixa de temperatura. Nessa etapa, ocorre o maior pico de perda de massa, que está relacionada principalmente com a degradação da ovalbumina, proteína essa em maior concentração na clara (~54 %). Esse resultado está de acordo com os resultados reportados por Durmos e colaboradores (2009) e por Sri Devi Kumari, Kannan e Prem Kumar (2009).

4.1.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na Figura 26 são apresentadas as curvas de DSC das claras F, P e S, indicadas nas curvas com essas mesmas letras.

Figura 26 - Curvas dos termogramas da análise em DSC das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).



*Nota: Picos 1, 2, 3 e 4 referem-se aos picos de temperatura de desnaturação apresentados da esquerda para a direita nas curvas de DSC de cada clara.

Todas as curvas apresentaram um fenômeno endotérmico com picos no sentido descendente, estando associados à desnaturação

proteica (FERREIRA; HOFER; RAEMY, 1997). Segundo Bruylants, Wouters e Mitchaux (2005) o processo endotérmico nas proteínas ocorre devido às mudanças de estado termodinâmico e, conseqüente, modificação da capacidade calorífica. A alteração da capacidade calorífica se deve ao calor necessário para modificar a temperatura do sistema que é diferente na proteína na forma desdobrada quando comparada à proteína na forma nativa.

As curvas dos termogramas F, P e S apresentaram quatro picos endotérmicos típicos das principais transições térmicas observadas em clara de ovos, em virtude da desnaturação proteica. Os picos observados estão na faixa de temperatura de 56 a 85 °C e são definidos como T_d das proteínas: ovotransferrina (conalbumina), lisozima, ovalbumina e S-ovalbumina, referentes aos picos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Observa-se que as temperaturas de desnaturação das frações proteicas da clara corroboram com os resultados reportados por outros autores, conforme disposto na Tabela 7. As variações observadas nas T_d das proteínas em ensaios de DSC podem estar relacionadas com diferentes taxas de aquecimento utilizadas na análise, pH ou tamanho da amostra (DONOVAN et al., 1975; FERREIRA; HOFER; RAEMY, 1997).

Tabela 7 - Valores de T_d e ΔH_d para claras frescas, pasteurizadas e desidratadas, reportados na literatura

Clara	Condições DSC	T_d (°C)	Proteínas	ΔH_d	Autores
Fresca	20-25uL 2,5 e 10 °C/min pH 7 e 9	60 – 69,5	Ovotransferrina	15,5 cal.g ⁻¹	(DONOVAN et al., 1975)
		74	Lisozima		
		80 – 85	Ovalbumina		
Fresca	400 mg 1 °C/min pH 7	60	Ovotransferrina	2,06 J.g ⁻¹	(FERREIRA; HOFER; RAEMY, 1997)
		67	Lisozima		
		78	Ovalbumina		
		82	S-Ovalbumina		
Fresca	25 uL 10 °C/min pH 9,5	59,5	Ovotransferrina	2,16 J.g ⁻¹	(DE SOUZA; FERNÁNDE Z, 2013)
		68,2	Lisozima		
		78,8	Ovalbumina		
		83,1	S-Ovalbumina		

Continua tabela...

Fresca	30-40 mg 5 °C / min -	63,5	Ovotransferrina	-	(ABBASNEZ HAD et al., 2014)
		66,0	Lisozima		
		79,0	Ovalbumina		
		82,0	S-Ovalbumina		
Pasteurizada	500 mg 1,5 °C/min pH 8,9	63	Ovotransferrina + Lisozima	1,4 J.g ⁻¹	(NEMETH et al., 2010)
		77	Ovalbumina + globulinas		
Pasteurizada	25 uL 10 °C/min pH 9,5	59,6	Ovotransferrina	1,63 J.g ⁻¹	(DE SOUZA; FERNÁNDE Z, 2013)
		68,3	Lisozima		
		78,9	Ovalbumina		
		83,1	S-Ovalbumina		
Desidratada	80 uL 0,5 °C/min pH 7,3-7,6 Reidratada	60	Ovotransferrina	12,3 J.g proteína ⁻¹	(TALANSIE R et al., 2009)
		80	Ovalbumina		
		*N/I	Lisozima		
Desidratada	1 mL 1,2 °C/min pH 7 reidratada	61	Ovotransferrina	-	(NICORESC U et al., 2011)
		65	Lisozima		
		77	Ovalbumina		
Desidratada	60 uL 10 °C/min pH 7 reidratada	65,6	Ovotransferrina	17,9 J.g proteína ⁻¹	(ARZENI; PÉREZ; PILOSOFF, 2012)
		81,5	Ovalbumina		

*N/I – Temperatura não informada

Os termogramas de todas as amostras apresentaram um pico de desnaturação próximo a 60 °C que pode estar associado à presença da ovotransferrina (KUROKAWA et al., 1999). A ovotransferrina é a segunda proteína em maior concentração presente na clara (12 a 13 %) e, portanto, sua desnaturação térmica pode alterar significativamente as propriedades funcionais da clara quando estas são submetidas a tratamentos térmicos. O maior número de ligações dissulfeto (S-S) na

ovotransferrina, em relação às demais proteínas da clara e a sua influência na desnaturação térmica, vem sendo discutida na literatura e ainda não é bem compreendida (BULAJ, 2005). Damodaran (2010) reporta que as ligações S-S são as únicas ligações cruzadas covalentes naturalmente presentes em proteínas e que auxiliam na estabilidade da estrutura dobrada. Por outro lado, Bulaj (2005), bem como, Campbell e Farrel (2011) reportam que as ligações S-S restringem os padrões de dobramento disponível para as cadeias polipeptídicas e melhoram a estabilidade termodinâmica. Este efeito das ligações dissulfeto sobre a termoestabilidade proteica também é discutido por outros autores que o atribuem a um aumento da rigidez da proteína com consequente diminuição da flexibilidade conformacional (DANSON; HOUGH, 1998; PTAK, 1998; YE, 2008).

O pico de T_d 1 das curvas de DSC, está associado à desnaturação da ovotransferrina e é claramente observado no termograma da clara F mas pouco evidente no termograma da clara P, uma vez que ocorre uma sobreposição deste ao pico T_d 2, associado a lisozima. Este comportamento corrobora com os resultados de outros autores que atribuem essa sobreposição dos picos à desnaturação proteica durante o tratamento térmico ao qual é submetida a clara P.

Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2006) estudaram os efeitos do tratamento térmico nas propriedades físico-químicas das proteínas da clara de ovo e observaram que claras com pH próximo a 9,0 tratadas em temperaturas de 25 °C por 20 minutos, apresentaram termogramas com os picos de T_d da ovotransferrina e lisozima sobrepostos. Relatam ainda que os termogramas de claras tratadas com temperaturas mais elevadas (60°C e 73 °C) não apresentaram os picos associados a ovotransferrina e lisozima, além de ocorrer uma redução da área do pico referente à ovalbumina. Comportamento similar em claras pasteurizadas e em claras desidratadas foi observado por Nemeth e colaboradores (2010), sugerindo que a sobreposição dos picos entre ovotransferrina e lisozima, observados nos termogramas, é decorrente do processamento térmico.

O pico de T_d 3, associado a desnaturação da ovalbumina (80 °C) e o pico de T_d 4, associado a S-ovalbumina (85 °C) estão presentes nos termogramas de todas as amostras. A desnaturação da ovalbumina induzida pelo calor pode estar associada à exposição e consequente redução dos grupos sulfidrilas (S-H), uma vez que essas proteínas apresentam quatro desses grupos na sua cadeia molecular. Em pH próximo a 9,0 essa perda pode ser mais intensa devido ao aumento da

reatividade do grupo tiol, podendo ocorrer oxidação e formação de S-S. (VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2006).

Entretanto, observa-se que o termograma da clara F apresentou o pico de T_d 3 referente a ovoalbumina mais estreito em relação às demais claras, sendo progressivamente alargado para as claras P e S, respectivamente. O oposto é observado para o pico T_d 4 da S-ovalbumina, que é menos pronunciado nas claras S. Esse comportamento pode estar associado ao efeito das temperaturas de acondicionamento e processamento sobre a conversão de ovalbumina em S-ovalbumina. Talansier e colaboradores (2009) avaliaram o comportamento térmico de claras desidratadas e relataram que o uso de temperaturas mais elevadas causa o alargamento e a redução dos picos endotérmicos nos termogramas, além de deslocar a temperatura de desnaturação para valores menores.

A S-ovalbumina é obtida pela conversão natural da ovalbumina, sendo termodinamicamente mais estável, uma vez que possui T_d superior ao da ovalbumina, como observado no termograma de todas as amostras. Estes resultados corroboram com os resultados de outros autores que avaliaram a T_d dessas proteínas (Tabela 7). Em claras frescas, o pico endotérmico da S-ovalbumina está relacionado com a qualidade dos ovos analisados uma vez que as condições de armazenagem e tempo de postura influenciam no processo de conversão da s-ovalbumina a partir da ovalbumina (MINE, 2015). Em claras frescas a concentração de S-ovalbumina é de 5 %, podendo alcançar a concentração de 81 % após 6 meses de estocagem em baixa temperatura. Em claras processadas termicamente, a qualidade dos ovos também influencia na concentração de S-ovalbumina. Além disso, a conversão da ovalbumina em S-ovalbumina é favorecida pelas condições de armazenagem e processamento, sendo intensificada em temperaturas acima das de refrigeração (ALLEONI CARRARO, 2006; LECHEVALIER et al., 2007b).

As proteínas da clara são, em sua maioria, proteínas globulares com estrutura molecular rígida que exigem elevada energia térmica para se desdobrarem e desnaturarem (CAMPBELL; RAIKOS; EUSTON, 2003, KIOSSEOGLOU; PARASKEVOPOULOU, 2006). Durante a desnaturação proteica, a energia gasta nesse processo pode ser determinada pela área do pico que corresponde a entalpia de desnaturação. Essa entalpia resulta da combinação de reações endotérmicas e exotérmicas associadas a mudanças de conformação da proteína e quebra de ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas

(ARNTFIELD; MURRAY, 1981; BRUYLANTS; WOUTERS, MICHAUX, 2005). Sendo assim, através dos ensaios de DSC é possível observar a energia gasta durante o processo de desnaturação, através dos valores de variação de entalpia de desnaturação (ΔH_d).

Os valores ΔH_d para as claras F, P e S foram de 5,95, 3,83 e 1,39 J.g⁻¹, respectivamente (Figura 26). As diferenças do ΔH_d obtidos nesse trabalho entre os observados em trabalhos publicados (Tabela 7) podem ser decorrentes das condições das amostras, diferenças nos processamentos térmicos ao qual foram submetidas, ou ainda, relacionadas com a sensibilidade do equipamento e/ou devido às diferenças na seleção da área de linha base (FERREIRA; HOFER; RAEMY, 1997).

Através do termograma, observa-se que a clara S apresentou o menor valor de entalpia, seguida pela clara P. Esse comportamento pode estar associado à perda parcial da estrutura conformacional das proteínas contidas nessas claras, devido aos processamentos térmicos aos quais foram submetidas. A entalpia de desnaturação está correlacionada com o conteúdo remanescente da estrutura secundária ordenada de uma proteína, sendo um valor líquido da combinação das reações endotérmicas e exotérmicas, como a formação de ligações de hidrogênio e a ocorrência de interações hidrofóbicas, respectivamente. Desta forma, a mudança na entalpia é uma indicação das modificações estruturais de uma proteína (VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2006).

Além disso, o menor valor de entalpia observado na clara S pode estar associado ao fato dessa clara, além de ser pasteurizada, ser submetida à temperaturas mais elevadas durante a etapa de secagem, mesmo que por curto período de tempo. A pasteurização somada à temperatura de secagem pode ter causado uma alteração na estrutura conformacional nativa das proteínas exigindo, portanto, menor calor para o seu evento endotérmico durante a medida de DSC.

Estes resultados são corroborados por Talansier e colaboradores (2009) que estudando os efeitos do tratamento térmico aplicados em claras em pó após o processo de secagem, observaram que nessas claras, apenas o processo de desidratação foi responsável por uma redução de 37 % na ΔH_d em relação à claras frescas, devido a desnaturação parcial das proteínas induzida pelo processo de atomização (*spray-drying*) e, quando a claras em pó foram submetidas a processamentos térmicos (60 a 80 °C), observaram que todas as temperaturas aplicadas causaram efeito redutor ainda maior na ΔH_d . Comportamento similar foi observado por

Nicorescu e colaboradores (2011) através de ensaios de DSC com clara desidratada após reidratação. Nesse estudo, os autores observaram que o aumento na temperatura e o tempo do tratamento térmico aumentaram a desnaturação das proteínas, chegando a 36 % quando comparadas as claras desidratadas padrão (sem tratamento). Isso indica que os processos térmicos, atomização ou pasteurização, bem como o tempo de tratamento, afetam a estrutura conformacional das proteínas da clara causando seu desdobramento.

Damodaran, Parkin e Fennema (2010) apontam que a principal força desestabilizadora da estrutura nativa de uma proteína é a entropia conformacional, que envolve os movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais, que são perdidos quando essa proteína está no seu estado nativo, ou seja, em uma conformação dobrada com menor gasto energético. Durante a desnaturação induzida pelo calor, a entropia tem um papel fundamental, uma vez que o aumento da temperatura no sistema aumenta a entropia, favorecendo o desdobramento da proteína. Ao mesmo tempo, o aumento da temperatura faz com que as interações de natureza exotérmica não covalentes e eletrostáticas, sejam desestabilizadas.

De Souza e Fernández (2013) observaram uma redução nos valores de ΔH_d de claras frescas após as mesmas serem submetidas a pasteurização. Esses autores sugerem que a redução na entalpia foi decorrente do processamento térmico que ocasionou um desdobramento parcial das proteínas, especialmente na ovotransferrina. Landfeld e colaboradores (2008) reportam que em um processo de pasteurização a temperatura empregada causa desnaturação e coagulação das proteínas, uma vez que estas apresentam sensibilidade ao calor. Van Der Plancken; Van Loey e Hendrickx (2006) observaram que o tratamento térmico aplicado em clara de ovos, quando acima de 50 °C reduziu a entalpia de desnaturação das proteínas e que temperaturas acima de 65 °C causaram redução ainda maior na entalpia. Os autores sugerem que a primeira redução é devido a desnaturação da ovotransferrina e a segundo devido ao início da desnaturação da lisozima e ovalbumina.

4.1.7 Tensão superficial

As claras F, P e S apresentaram valores de tensão superficial significativamente diferentes entre si, com valores variando de 53, 54 e 56 mN.m⁻¹ para as claras F, P e S, respectivamente. Observa-se que a clara F apresentou a menor tensão superficial quando comparadas às

demais amostras. A clara S apresentou o maior valor de tensão superficial o que significa que a força necessária pra romper o filme líquido é maior para clara S, em relação às demais claras. Em termos de energia, significa que a energia necessária para formação de uma superfície de 1m^2 de área é de 53 mJ na clara F enquanto que na clara S há a necessidade de uma energia de 56 mJ.

A tensão superficial é equivalente à energia superficial, que por sua vez, está diretamente ligada ao processo de coesão entre as moléculas, através de interações intermoleculares. Desta forma, a tensão superficial da água pura em temperatura ambiente é aproximadamente de $73\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (PTASZEK et al., 2015), soluções proteicas apresentam valores de tensão superficial próximas a $45\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (FOEGEDING; LUCK; DAVIS, 2006) enquanto proteínas puras geralmente não reduzem a tensão superficial da água abaixo de $50\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (DAMODARAN, 2005).

A tensão superficial da solução proteica de clara é menor do que a da água devido, em parte, a presença de aminoácidos hidrofóbicos que constituem aproximadamente metade dos aminoácidos presentes nessas claras. Além do efeito desses aminoácidos sobre a tensão superficial eles também participam ativamente na formação de espumas (PTASZEK et al., 2015). Nessas soluções, as proteínas atuam como tensoativos de duas maneiras: se orientam e ocupam a superfície do líquido ou são adsorvidas na superfície por processos que causam sua desnaturação e consequente orientação na superfície, como é o caso da agitação para formação de espumas. Essa tendência da proteína ocupar espontaneamente a superfície faz com que as moléculas de água equilibrem suas cargas no interior do líquido causando redução da tensão superficial desse líquido, quando comparado a tensão superficial da água pura (DALVIN, 2011).

Martin e colaboradores, (2002) estudando a adsorção de diversas proteínas na interface ar-líquido e sua relação com a formação e estabilidade das espumas, observaram que conforme houve a adsorção da proteína ovalbumina na interface, maior foi a redução da tensão superficial da solução proteica.

As moléculas na superfície do líquido possuem uma energia mais alta do que aquelas contida no centro do líquido, uma vez que estão parcialmente livres de ligação com moléculas vizinhas (PASHLEYR; KARAMAN, 2004). A presença das proteínas na superfície do líquido ocorre por fenômenos de adsorção formando uma monocamada com as regiões hidrofílicas da molécula voltadas para a água e as partes

hidrofóbicas em contato com o ar. A redução na tensão superficial de soluções proteicas, submetidas a uma perturbação (batimento) ocorre a desnaturação e orientação das proteínas para a superfície reduzindo a energia nesse local (LANGEVIN, 2000). Nesse caso, para que as moléculas de proteína contidas no interior do líquido (clara) sejam também transferidas para a superfície, é necessário fornecer mais energia através do processo de bateção, por exemplo (PASHLEYR; KARAMAN, 2004).

Na clara F, dois fatores principais podem ter influenciado em uma menor tensão superficial dessa clara quando comparada às claras P e S: a) sua maior velocidade de difusão, adsorção e orientação na superfície da solução e b) uma menor atração intermolecular entre as proteínas. Isso pode ser devido à permanência da estrutura nativa das proteínas contidas na clara F, uma vez que estas não sofreram nenhum tipo de tratamento térmico. Nas claras P e S, o processamento térmico causaram alterações na sua estrutura nativa o que foi verificado através dos menores valores de entalpia de desnaturação que estas claras apresentaram quando comparadas a clara F nos ensaios de DSC (**item 4.1.7**). Esse comportamento é corroborado por outros autores que relatam que os processos térmicos, secagem e mistura aplicados à claras, causam modificações na cinética de adsorção das proteínas, reduzindo tanto a difusão do centro do líquido para a superfície, bem como, sua penetração, desdobraimento e rearranjo na interface ar-líquido ou ainda por favorecer uma maior atração proteína-proteína no centro do líquido (TALANSIER et al., 2009; FOEGEDING; LUCK; DAVIS, 2006).

Estas alterações nas proteínas das claras P e S podem estar associadas à necessidade de maior energia para adsorverem e criarem novas superfícies, limitando a redução da tensão superficial quando comparada a clara F, uma vez que conforme Foegeding, Luck e Davis (2006), o maior resultado da adsorção da proteína na superfície se dá pela redução da tensão superficial. Além disso, Shawm (1975) sugere que quando a superfície de um fluido apresenta maior energia (maior tensão superficial), devido às interações entre as moléculas, significa que para criar ou aumentar a superfície, é necessário aplicar mais trabalho. Isso pode influenciar essas proteínas durante a formação de espumas.

Além disso, alguns estudos mostram que a hidrofobicidade das proteínas afeta a tensão superficial da solução proteica. Ptaszek e colaboradores (2015) sugerem que a redução significativa da hidrofobicidade de soluções proteicas é observada com o aumento da

tensão superficial. Wierenga e colaboradores (2003) em estudos de cinética de adsorção na interface ar-água com ovalbumina e ovalbumina modificada com ácido cáprico, afirmam que o grau de hidrofobicidade das proteínas afeta diretamente a velocidade de adsorção delas na superfície e, conseqüentemente, a redução da tensão superficial. A exposição de grupos hidrofóbicos, anteriormente contidos no interior, das proteínas é favorecida pelos tratamentos térmicos, devido ao processo de desnaturação, como apontado em trabalhos com clara de ovos e/ou suas proteínas isoladas (CROGUENNEC et al., 2007; MINE, 1997; TALANSIER et al., 2009; VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2006). Entretanto observa-se que a redução da tensão superficial devido à presença de proteínas não pode ser exclusivamente atribuída a hidrofobicidade das moléculas uma vez que a clara F apresentou os menores valores de tensão superficial.

Outros fatores que podem ter contribuído para este comportamento são a formação de agregados insolúveis, tamanho molecular da proteína e sua estrutura proteica. Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2006) sugerem que alterações na hidrofobicidade superficial de proteínas, facilitam as interações hidrofóbicas relacionadas com a formação de agregados insolúveis. Além disso, Martin e colaboradores (2002) sugerem que não apenas a hidrofobicidade, mas também o tamanho molecular da proteína e sua estrutura proteica parecem influenciar a taxa de adsorção das proteínas na interface ar-líquido. Vale ressaltar ainda que processos térmicos expõem e oxidam os grupos sulfidrilas (S-H) presentes na ovalbumina em dissulfetos (S-S) o que pode levar a um aumento da cadeia molecular de proteínas, interferindo na sua solubilidade, na difusão para a superfície e, conseqüentemente, na taxa de adsorção (DE JONGH et al., 2004; MINE, 1997; VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2006).

Yang, Berry e Foegeding (2009) estudaram os efeito nas propriedades espumantes do mix de solução de clara desidratada e soro do leite em pó e observaram que, embora a clara quando avaliada separadamente do soro apresentasse uma adsorção na superfície mais rápida, quando misturada ao soro de leite apresentava uma redução na adsorção devido a maior tensão superficial, indicando que nesse sistema as moléculas ativas interfaciais do soro parecem determinar a tensão. Nicorescu e colaboradores (2011) em estudos com clara desidratada reconstituída, obtiveram valores de tensão superficial de 49,1 mN/m (0,001 % proteína) e 65,0 mN/m (1 % proteína). Os autores não

observaram diferenças na tensão superficial quando as claras em pó foram tratadas termicamente a seco (70 e 80 °C) sugerindo que as proteínas de ambas as claras possuem mesma afinidade termodinâmica para interface ar-água.

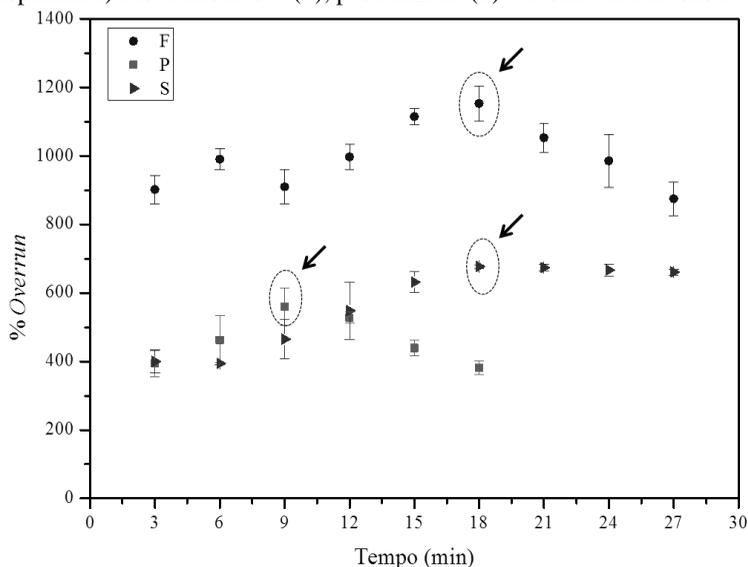
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPUMAS

4.2.1 *Overrun*, densidade e fração da fase gasosa

São apresentadas na Figura 27 as médias das curvas do *overrun* (%) para as claras F, P e S.

As claras F, P e S apresentaram curvas com comportamento similar, onde no início do batimento ocorreu gradativamente a incorporação de ar ao fluido aumentando seu *overrun* e, após alcançar seu *overrun* máximo, inicia-se um declínio da curva, sendo menos pronunciado para a clara S. O *overrun* máximo de cada clara está indicado no gráfico através de um círculo e uma seta. A clara F apresentou curva com valores de *overrun* superiores às demais claras durante todo o tempo da medida. Enquanto as claras P e S, com valores de *overrun* próximos, apresentaram curvas que quase se sobrepõem.

Figura 27 - Curvas das médias e desvio padrão do *overrun* (%) (capacidade espumante) das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).



A capacidade espumante de soluções proteicas está relacionada com a qualidade das proteínas, que é dependente da sua conformação quando na interface. Sendo assim, é essencial que as moléculas de proteínas apresentem boa flexibilidade para que sejam capazes de desdobrar na superfície, orientando e ativando seus grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (PTASZEK et al., 2015). Desta forma, o contato realizado entre a proteína e a interface permite a exposição dos seus grupos hidrofóbicos levando a uma desnaturação interfacial dessas moléculas (FOEGEDING; LUCK; DAVIS, 2006). Pernell e colaboradores (2002) sugerem que durante a formação de espuma, enquanto há o aumento do *overrun*, há a presença ampla de proteínas na fase contínua para a formação da nova interface e incorporação de ar.

Vale ressaltar que a clara é uma solução, basicamente, de água e uma mistura de diversas proteínas. Conforme Damodaran (2005) as propriedades funcionais de formação de espuma desse tipo de solução se deve à contribuição específica de cada componente dessa mistura. Desta forma, se alguns desses componentes sofrerem alterações, a propriedade funcional poderá ser afetada. Além disso, devido à complexidade da mistura de proteína na clara, muitas competições e interações entre proteínas na interface ar-líquido podem ocorrer, afetando a formação de espumas (LECHEVALIER et al., 2005).

Em estudos com clara desidratada e soro do leite desidratado, Pernell e colaboradores (2002) observaram, nas claras, comportamento da curva de *overrun* similar ao obtido nesse trabalho. Notaram que há um aumento do *overrun* com o tempo de batimento e, posteriormente, ocorre a estabilidade da curva para um valor assintótico. Raikos, Raikos, Campbell e Euston (2007) estudando os efeitos da temperatura de pasteurização e da adição de sal e açúcar nas propriedades espumantes de claras frescas, observaram, em alguns experimentos, um declive das curvas após a obtenção de um pico máximo do *overrun*. Lau e Dickinson (2006) avaliando a capacidade espumante de soluções de xarope de açúcar invertido e clara de ovo desidratado observaram curva de *overrun* similar, com aumento da capacidade após 5 minutos de batimento, ocorrendo uma diminuição do *overrun* após 10 minutos. Comportamento similar nas curvas de *overrun* para clara de ovo fresco com adição de sacarose foi observado por Raikos, Campbell e Euston (2007), obtendo um aumento da curva em até 13 minutos de batimento, com queda após esse tempo de batimento. Em clara fresca isolada observaram um aumento até os 15 minutos de batimento, não observando a queda, talvez porque essa clara não tenha atingido o seu

overrun máximo, como obtido em 18 minutos nesse trabalho (Figura 27).

Para melhor observação do *overrun*, as médias e o desvio padrão dos valores obtidos para cada tempo de batimento das claras F, P e S durante os ensaios de *overrun* são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Médias e desvio padrão dos valores do *overrun* (%) (capacidade espumante) das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) para cada tempo de batimento.

Tempo (min)	<i>Overrun</i> (%)		
	F	P	S
3	902 ± 41 ^a	393 ± 37 ^b	400 ± 34 ^b
6	990 ± 30 ^a	463 ± 73 ^b	394 ± 04 ^b
9	910 ± 50 ^a	560 ± 55 ^b	465 ± 57 ^b
12	996 ± 37 ^a	528 ± 16 ^b	548 ± 83 ^b
15	1115 ± 24 ^a	439 ± 23 ^b	631 ± 30 ^c
18	1153 ± 52 ^a	382 ± 20 ^b	677 ± 06 ^c
21	1053 ± 41 ^a	-	674 ± 10 ^c
24	986 ± 78 ^a	-	667 ± 17 ^c
27	874 ± 50 ^a	-	661 ± 08 ^c

*Notas: Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Todas as claras, conforme já observado na Figura 27, apresentaram valores de *overrun* crescentes até o tempo de batimento relativo ao *overrun* máximo, exibindo posteriormente declínio dos valores. A clara F apresentou, nos primeiros três minutos de batimento, um *overrun* de 902 %, obtendo seu *overrun* máximo (1.153 %) no tempo de 18 minutos, ocorrendo redução em 27 minutos para um *overrun* de 874 %. Valores de *overrun* similares foram observados por Raikos, Campbell e Euston (2007) em ensaios com clara de ovo fresca. Contudo, Kuropatwa, Tolkach e Kulozik (2009) reportaram valores de *overrun* de 391 % para clara fresca, abaixo do obtido nesse trabalho, que pode estar associado ao fato de a medida ter sido realizada apenas após 120 segundos de batimento.

As claras P e S, apresentaram o mesmo comportamento ao observado na clara F, com valores de *overrun* nos primeiros três minutos de 393 e 400 %, respectivamente, sem apresentar diferença estatística entre si. O valor de *overrun* máximo obtido para clara P foi de

560 % no tempo de 9 minutos e de 677 % em 18 minutos para a clara S. Assim como na clara F, as claras P e S apresentaram decréscimo após atingirem o *overrun* máximo. A clara P reduziu seu *overrun* para 382 % no tempo de 18 minutos enquanto a clara S reduziu para 661 % em 27 minutos de batimento.

Raikos, Campbell e Euston (2007), estudando os efeitos do tratamento térmico em clara de ovos frescos, obtiveram valores de *overrun* entre 550 a 750 %, sendo similares dos obtidos para a clara pasteurizada analisada nesse estudo. Em clara desidratada, os valores de *overrun* apresentados nesse trabalho são similares aos reportados na literatura para este tipo de amostra, variando entre 598 a 1.200 % (DAVIS; FOEGEDING, 2007; NICORESCU et al., 2011; PERNELL et al., 2002; TALANSIER et al., 2009; YANG; BERRY; FOEGEDING, 2009). Esta ampla faixa nos valores de *overrun* reportados, podem ser relativos à qualidade da amostra e condições de tratamento térmico, pH da solução, velocidade de batimento, tipo de incorporação de ar, tempo de batimento e, ainda para as claras desidratadas, condições de reconstituição.

A redução do *overrun*, após as claras atingirem seu *overrun* máximo, como pode ser observado na Figura 27 através do decréscimo da curva, tem sido associado ao colapso da espuma devido ao efeito do cisalhamento. O colapso, decorrente do excesso de batimento, ocasiona afinamento do filme líquido e maior deformação mecânica o que contribui para a ruptura de parede das bolhas com consequente redução do *overrun* (LAU; DICKINSON, 2005). Além disso, Damodaran (2010) afirma que o excesso de batimento pode causar a desnaturação extensa, agregação e precipitação das proteínas, reduzindo sua capacidade espumante. Raikos, Campbell e Euston (2007) propõem que a redução do *overrun* ocorre devido a um fenômeno denominado "*overbeating*". Eles sugerem que o batimento prolongado causa coagulação excessiva das proteínas globulares na interface ar-líquido com formação de agregados insolúveis que apresentam menor capacidade de retenção de água, o que leva ao colapso da espuma.

A clara F apresentou maior capacidade espumante em relação às claras P e S durante todo o tempo de batimento aplicado nesse estudo. Contudo, as claras P e S não apresentaram diferença estatística entre si ($p \leq 0,05$) até o tempo de 12 minutos, indicando um processo de adsorção similar das suas proteínas na interface durante esse tempo de batimento. A partir de 15 minutos, com o *overrun* da clara P em declínio (439 %) e a da clara S ainda em crescimento (631 %), observa-se a

diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre elas. As diferenças no *overrun* da clara F em relação às demais claras pode ser um indicativo de que as proteínas que compõem a clara F possuem maior velocidade e capacidade de adsorção e orientação na interface do que as claras P e S, o que favoreceu a formação de novas bolhas. Um dos fatores mais importantes para formação de espumas a partir de soluções proteicas é a capacidade da proteína, contida na solução, adsorver na interface ar-líquido. Esse fenômeno é termodinamicamente favorável devido à ocorrência simultânea da desidratação na interface hidrofóbica e nas porções hidrofóbicas das proteínas. A adsorção de proteínas na interface ar-líquido conduz à formação de uma rede interfacial que altera as propriedades físicas e mecânicas da interface. A geração da rede interfacial é necessária para formar e estabilizar as espumas a partir de soluções de proteínas mediante aeração (DICKINSON, 1986; WIERENGA et al., 2003).

Sendo assim, o comportamento observado nas claras F pode ser devido à conservação do estado nativo dessas proteínas, mantendo suas interações eletrostáticas e de solubilidade, favorecendo a formação da rede interfacial. Na literatura vários autores relatam que a solubilidade é um atributo importante para as propriedades funcionais das proteínas alimentares e que, para a formação de espumas, é desejável que elas sejam solúveis, razão pela qual, complexos insolúveis não são bons agentes espumantes (DAMODARAN; ANAND; RAZUMOVSKY, 1998; MINE, 1997).

Outro aspecto importante na análise do *overrun* se refere à análise da cinética, isto é, o tempo em que o mesmo foi atingido em cada clara. Observou-se que no tempo de três minutos cerca de 78 % da capacidade espumante da clara F já havia sido alcançada (Tabela 8). Na clara P a adsorção também é elevada com 70 % da capacidade espumante alcançada nos três minutos iniciais do batimento. No entanto, o *overrun* máximo da clara P é inferior ao da clara F e logo é alcançado no tempo de 9 minutos, enquanto a clara F continua a aumentar até os 18 minutos. Na clara S a adsorção seguida da incorporação de ar ocorre de maneira mais lenta, mas a mesma foi capaz de manter 99 % da capacidade espumante até o último tempo de batimento enquanto as claras F e P mantiveram somente 76 e 62 % da capacidade espumante no último tempo de batimento, respectivamente. Em função da menor formação de espuma, desde o tempo inicial de batimento, as proteínas que compõem as claras P e S, parecem apresentar um processo de adsorção mais lento e incompleto. Vale lembrar que todas as claras avaliadas nesse estudo

apresentam concentração proteica ~10 % e valor de pH ~ 9,0 (**item 4.1.1**). Uma vez que a concentração de proteínas e valor de pH das claras são similares, a menor formação de espumas para as claras P e S pode ser devido ao seu histórico térmico. Conforme Talansier e colaboradores (2009) a redução na difusão e na adsorção das proteínas para interface está associada com a o aumento da intensidade do tratamento térmico.

Embora tratamentos térmicos suaves conferidos à soluções proteicas possam favorecer a formação de espuma em função do relaxamento das cadeias proteicas mais rígidas, tratamentos térmicos com temperaturas mais elevadas causam desnaturação excessiva nas proteínas, afetando negativamente a formação de espumas. Conforme Damodaran (2010), o aumento da temperatura até 40 °C favorece a solubilidade de proteínas em soluções aquosas. No entanto, em temperaturas mais elevadas (~ 70 a 80 °C), muitas proteínas sofrem mudança do seu estado nativo para o desnaturado. Isso ocorre porque a temperatura desestabiliza especialmente as interações não covalentes dessas proteínas, como as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas que são termodinamicamente exotérmicas. Para Damodaran (2005) o calor extensivo induz a um processo de polimerização nas proteínas, prejudicando suas propriedades de formação de espuma. O tratamento térmico pode induzir o processo de desnaturação e, dependendo do grau de severidade, pode causar alterações nas propriedades funcionais das proteínas (VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2007).

Segundo Lechevalier e colaboradores (2007b), no processamento de claras em pó a transferência de calor, ocorrida na etapa de pulverização (*spray drying*), constitui a principal causa dos danos nas propriedades funcionais de formação de espumas nessas claras. Talansier et al. (2009) relatam que o processo de pasteurização conferido as claras é um ponto crítico do processo e, para Foegeding, Luck e Davis (2006), além dos processos térmicos, a mistura pode ser uma etapa importante para causar modificações nas proteínas.

Dentre os efeitos dos processos térmicos está a exposição e oxidação de grupos sulfidrilas (S-H) presentes na ovalbumina em dissulfetos (S-S) e, essas alterações no grupo funcional, podem causar a polimerização da cadeia proteica interferindo na solubilidade, difusão e na taxa de adsorção dessas proteínas para a superfície (DE JONGH et al., 2004; MINE, 1997; VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2006). Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2006)

em estudos com clara fresca, apontaram que o tratamento térmico reduz a solubilidade das proteínas da clara. A redução da solubilidade nas temperaturas de 73 a 85 °C foi atribuída à desnaturação e agregação da ovalbumina, enquanto que a 55 a 60°C, esse efeito foi atribuído a ovotransferrina.

Tratamentos térmicos conferidos à claras de ovos, também causam a maior exposição de grupos hidrofóbicos anteriormente contidos no interior da molécula (CROGUENNEC et al., 2007; MINE, 1997; TALANSIER et al., 2009; VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2006). Conforme Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2006) a exposição desses grupos aumenta as interações hidrofóbicas das proteínas, podendo facilitar a formação de agregados insolúveis. Apesar disso, Damodaran (2005) aponta que a capacidade espumante possui uma correlação positiva com a hidrofobicidade média das proteínas, uma vez que as proteínas adsorvidas desnaturam e expõem seus grupos hidrofóbicos na interface, apresentando importante papel na interface ar-líquido. Para Weirenga e Gruppen (2010) a taxa inicial de adsorção das proteínas na interface é baseada no equilíbrio entre propriedades eletrostáticas e hidrofóbicas sendo, portanto, necessário um mínimo de hidrofobicidade exposta para que a adsorção das proteínas ocorra na interface.

Entretanto, embora a hidrofobicidade de uma proteína seja um requisito importante para a formação de espumas, Daltin (2011) afirma que proteínas com cadeias hidrofóbicas longas e muito expostas podem reduzir sua solubilidade e, portanto apresentar uma baixa difusão desta para a superfície ar-líquido. Sendo assim, as temperaturas de pasteurização e secagem aplicadas nas claras P e S avaliadas nesse trabalho, podem ter causado alterações na estrutura conformacional de algumas proteínas, afetando suas cargas e solubilidade, dificultando ou impedindo sua difusão e adsorção na superfície para a formação de novas interfaces ar-líquido, causando a formação de um menor volume de espuma.

Conforme Magdassi (1996), a atividade de superfície de uma proteína esta relacionada às porções polar e apolar (anfifílica), que são determinadas em função da sua estrutura (1^a, 2^a, 3^a e 4^a). Desta forma, as diferenças nessa atividade estão relacionadas com as variações ou mudanças nessas estruturas. Mudanças nas estruturas das proteínas contidas nas claras P e S foram observadas nos ensaios de DSC (**item 4.1.7**) e indicaram que as mesmas se encontravam parcialmente desnaturadas, uma vez que apresentaram menor entalpia de

desnaturação em relação à clara F. Essa redução na entalpia de desnaturação pode indicar perda da estrutura secundária das proteínas além de que no estado parcialmente desnaturado elas devem estar solúveis, pois se estiverem insolúveis, não são capazes de se adsorverem e formarem uma película viscoelástica na interface (VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2007; POOLE; WEST; WALTERS, 1984).

Por outro lado, mudanças nas estruturas proteicas, podem afetar a distribuição de cargas das proteínas, afetando conseqüentemente a tensão superficial do líquido. Ensaio de tensão superficial (**item 4.1.8**) mostraram que as claras P e S apresentam maior tensão do que a clara F corroborando com os resultados de *overrun* apresentados. Durante o batimento, como a energia fornecida durante o preparo das espumas foi a mesma para todas as claras (velocidade de batimento padronizado) e dado que as claras P e S apresentaram maior tensão superficial, formaram menos superfícies e, portanto, quantidade menor de espumas (menor *overrun*) quando comparadas a clara F. De acordo com Daltin (2011) a quantidade de espuma formada por proteínas depende da quantidade de energia utilizada e sua relação com a tensão superficial.

Uma vez que as claras não apresentaram a mesma capacidade espumante e, portanto, não possuem os mesmo tempos de *overrun* máximo, para melhor compreensão, é importante realizar uma análise separadamente. Sendo assim, os valores de *overrun* referentes aos tempos de três minutos, no *overrun* máximo e no tempo final de batimento, das claras F, P e S foram comparados estatisticamente e são apresentados na Tabela 9. Esses tempos de análise serão aplicados para as medidas de densidade e de fração gasosa das espumas que serão apresentados na seqüência.

Tabela 9 - Comparação das médias e desvio padrão dos valores de *overrun* nos tempos de três minutos, no tempo do *overrun* máximo e no tempo final de batimento, para as claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).

Medida	<i>Overrun</i> (%) ($\bar{X} \pm s$)		
	F	P	S
Três minutos	902 \pm 41 ^{a,A}	393 \pm 37 ^{b,A}	400 \pm 34 ^{b,A}
<i>Overrun</i> máximo	1153 \pm 52 ^{a,B}	560 \pm 55 ^{b,B}	677 \pm 06 ^{c,B}
Final	874 \pm 50 ^{a,A}	382 \pm 20 ^{b,A}	661 \pm 08 ^{c,B}

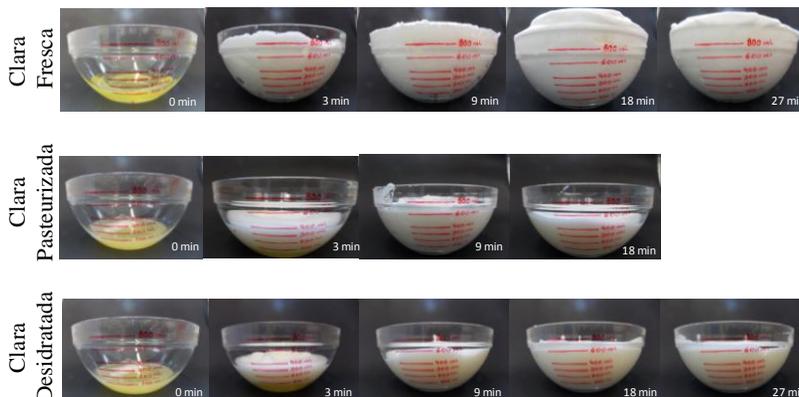
Médias seguidas com a mesma letra minúscula (mesma linha) e com a mesma letra maiúscula (mesma coluna) não diferem estatisticamente entre si através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No tempo de três minutos, a clara F apresentou *overrun* estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) das claras P e S, que não apresentaram diferença estatística entre si ($p \leq 0,05$). Entretanto nos tempos de *overrun* máximo e no tempo final de batimento todas as claras apresentaram *overrun* com diferença significativa ($p \leq 0,05$), sendo a clara F a que apresentou maiores valores em relação às demais (Tabela 9).

A clara F apresentou diferença estatística entre a medida de *overrun* máximo e no tempo final de batimento. Contudo, no tempo final não houve diferença estatística em relação a medida de três minutos. Isso indica que ocorre um processo de colapso da espuma devido o tempo de batimento (Tabela 8). Essa redução na incorporação de ar observada na medida final pode ser observada na Figura 27 através do declive da curva. O mesmo comportamento foi observado para a clara P. Na clara S o tempo de três minutos possui diferença significativa entre o *overrun* máximo e o tempo final, entretanto as duas últimas medidas não apresentaram diferenças significativas entre si. Isso demonstra que apesar de haver um leve declínio da curva (Figura 27) esta não é suficiente para diferir do valor de *overrun* máximo obtido nos ensaios com essa clara. Desta forma, pode-se sugerir que a clara S é mais estável ao processo de batimento após atingir seu *overrun* máximo do que as demais claras avaliadas.

Durante os ensaios de *overrun*, foi realizada uma análise subjetiva das espumas formadas ao longo do tempo de batimento, cujas imagens podem ser observadas na Figura 28

Figura 28 - Imagens dos ensaios de *overrun* das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).



Fonte: Próprio autor, (2017)

As imagens evidenciam a diferença de volume alcançado por cada espuma, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios de *overrun* (Figura 27 e Tabela 8). Além disso, foi observado durante os ensaios, aparentemente diferenças quanto a hidratação das espumas. As espumas obtidas das claras P e S apresentaram um aspecto que parecia ser mais cremoso. Isso quer dizer que as bolhas estavam mais hidratadas, devido a maior presença de líquido entre elas. Essa maior hidratação pode permitir uma maior mobilidade das bolhas, que juntamente com a espessura do filme, podem ser mais resistentes ao cisalhamento. No entanto, as espumas da clara F apresentaram aspecto mais seco e mais sólido, devido a sua maior capacidade espumante. Contudo, esse efeito será melhor discutido nos ensaios de microscopia óptica de fluorescência.

A densidade é uma propriedade física do material que correlaciona massa com volume. Sendo assim, os valores médios e o desvio padrão dos ensaios de densidade das claras e das espumas após três minutos de batimento, no *overrun* máximo e no tempo final do batimento são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores médios e desvio padrão das medidas de densidade das claras e das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (P) do líquido (tempo 0) e das medidas das espumas após três minutos de batimento, no overrun máximo e no final do batimento

Amostras	Densidade (g.cm ⁻³)			
	Clara	Espumas		
	Tempo zero	Três minutos	Overrun máximo	Final
F	1,0078 ± 0,0046 ^{a,A}	0,1007 ± 0,0038 ^{b,A}	0,0805 ± 0,0036 ^{c,A}	0,1036 ± 0,0054 ^{b,A}
P	1,0013 ± 0,0045 ^{a,A}	0,2037 ± 0,0150 ^{b,B}	0,1524 ± 0,0131 ^{c,B}	0,2080 ± 0,0091 ^{b,B}
S	1,0097 ± 0,0006 ^{a,A}	0,2042 ± 0,0016 ^{b,B}	0,1299 ± 0,0010 ^{c,C}	0,1327 ± 0,0015 ^{c,C}

*Notas: Médias seguidas com as mesmas letras minúsculas (mesma linha) e com as mesmas letras maiúsculas (mesma coluna) não diferem estatisticamente entre si através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As claras líquidas F, P e S, antes de serem submetidas ao processo de batimento (tempo 0), exibiram densidade entre 1,0013 e 1,0097 g.cm⁻³, não apresentando diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre si. Os valores de densidade encontrados estão de acordo com os valores reportados por Machado e colaboradores (2007) de 1,002 a 1,035 g.cm⁻³ para clara de ovo em pH 9,0.

Após os primeiros três minutos de incorporação de ar, todas as espumas apresentaram redução significativa na densidade. A espuma da clara F foi a que teve o maior decréscimo, reduzindo 10 vezes sua densidade inicial, enquanto as espumas das claras P e S exibiram uma redução na densidade de 5 vezes, não diferindo estatisticamente entre si, mas apresentando diferença estatística com a clara F. Essa redução menos acentuada na densidade das espumas das claras P e S corrobora com os ensaios de *overrun*, uma vez que foi observado que há uma menor incorporação de ar nessas claras, em comparação a clara F durante esse tempo de medida (Tabela 8 e Tabela 9).

A densidade é uma medida chave usada na indústria para caracterizar a aeração de um produto, sendo um indicador da quantidade de ar incorporado à massa (ALLAIS et al., 2006), podendo ser relacionada ao aspecto físico da espuma. Nesse caso, devido as claras P e S incorporarem menor ar, formando menos espumas, reduzem menos sua densidade e formam espumas mais cremosas ou mais hidratadas. Van Der Plancken, Van Loey e Hendrickx (2007) estudando os efeitos da formação de espumas em claras submetidas ao calor e alta pressão, observaram que as claras tratadas termicamente acima de 65 °C apresentaram espumas com maior densidade comparativamente as tratadas com temperatura inferior. Os autores observaram que essas espumas continham uma aparência mais úmida e cremosa do que as claras que não foram tratadas, cuja espuma era mais seca e com tonalidade mais branca.

No tempo de batimento referente ao *overrun* máximo foram observados os menores valores de densidade para as espumas de todas as claras. A espuma da clara F foi a que novamente apresentou menor valor de densidade (0,0805 g.cm⁻³) seguida pela espuma da clara S (0,1299 g.cm⁻³) e espuma da clara P (0,1524 g.cm⁻³) todas estatisticamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$). Esse resultado corrobora com o obtido através dos ensaios de *overrun* (Figura 27 e Tabela 9), onde mostraram que a espuma de clara F possui maior *overrun* máximo apresentando, portanto, menor densidade devido a maior incorporação de ar.

No tempo final de batimento foi observado um aumento na densidade das espumas de todas as claras. Esse aumento fez com que os valores de densidade para as espumas F e P não diferissem estatisticamente das suas densidades obtidas no início do batimento (três minutos). Para a clara S, a redução na densidade observada no final do batimento, não apresentou diferença significativa quando comparada a densidade no *overrun* máximo, indicando que essa clara perde menos ar para atmosfera após seu *overrun* máximo, em virtude do excesso de batimento. Esse comportamento já era esperado e corrobora com o observado nas curvas dos ensaios de *overrun* (Figura 27), que evidenciaram o declínio das espumas F e P após atingir o *overrun* máximo, e um declínio menos pronunciado para a curva da espuma de clara S. O aumento da densidade das espumas após atingirem sua capacidade espumante máxima ocorre devido ao colapso das bolhas de espuma em virtude do excesso de batimento, como discutido nos ensaios de *overrun*. De acordo com Damodaran (2010) o colapso, ou quebra do filme proteico, causa a liberação do gás para a atmosfera, especialmente para as espumas mais próximas da superfície, reduzindo o volume das espumas.

Os valores da fração da fase gasosa das espumas de claras F, P e S, em três minutos de batimento, no tempo de *overrun* máximo e no tempo final do batimento são apresentados na Tabela 11. Além disso, para melhor observar os efeitos da incorporação de ar e a formação das espumas a partir das claras F, P e S, são apresentados na Figura 29 os gráficos vinculados das curvas de *overrun* (A), densidade (B) e fração da fase gasosa (C).

Tabela 11 - Médias e desvio padrão dos ensaios de fração da fase gasosa (ϕ) das espumas de claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).

Amostras	Fração da fase gasosa (ϕ) ($\bar{X} \pm S$)		
	Três minutos	<i>Overrun</i> máximo	Final
F	0,90 \pm 0,00 ^{a,A}	0,92 \pm 0,00 ^{b,A}	0,90 \pm 0,01 ^{a,A}
P	0,80 \pm 0,02 ^{a,B}	0,85 \pm 0,01 ^{b,B}	0,79 \pm 0,02 ^{a,B}
S	0,80 \pm 0,01 ^{a,B}	0,87 \pm 0,00 ^{b,C}	0,87 \pm 0,01 ^{b,C}

*Notas: Médias seguidas com as mesmas letras minúsculas (mesma linha) e mesmas letras maiúsculas (mesma coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Todas as espumas apresentaram ϕ , variando entre 0,79 e 0,92, para os diferentes tempos de batimento, indicando que ocorreu uma adequada incorporação de ar (Tabela 11). Segundo Ritzoulis (2013), as espumas contidas nos alimentos costumam apresentar valores de ϕ elevados, geralmente acima de 0,50. Essa afirmativa corrobora com Walstra (1989), onde sugere que o valor da ϕ em espumas proteicas está localizado entre 0,50 e 0,97.

Os valores de ϕ das diferentes espumas estão de acordo com valores reportados na literatura para as claras F e S, embora não tenham sido localizados dados que permitam a comparação com as espumas de clara P. Os valores de ϕ obtidos nesse trabalho para as espumas de clara S variaram entre 0,80 e 0,87 e são similares aos resultados reportados por Pernell e colaboradores (2002) que obtiveram valores de ϕ 0,85 a 0,89 para espumas de claras reconstituídas nas concentrações de 2 %, 5 % e 10 % com tempo de batimento de até 12 minutos e de Davis e Foegeding (2007) e Yang e Foegeding (2011) (0,88) após 15 minutos de batimento. Outros autores apontaram valores superiores de ϕ variando de 0,90 a 0,95 (PTASZEK et al., 2015; TALANSIER et al., 2009; YANG; BERRY; FOEGEDING, 2009). Essa variabilidade nos valores de ϕ observadas, pode ser atribuída às diferenças na velocidade de batimento, tipo de incorporação de ar, ou formação de bancos de ar durante a medida.

Quando se analisa o comportamento das diferentes espumas considerando o tempo de batimento, observa-se que a espuma da clara F apresentou valores de ϕ significativamente maiores ($p \leq 0,05$) aos das espumas das claras S e P, em todos os tempos de batimento avaliados (Tabela 11). Estes resultados estão coerentes com os resultados obtidos nos ensaios de *overrun* e nos ensaios de densidade, uma vez que a clara F foi a que apresentou maior capacidade espumante e menor densidade tendo, portanto, maior incorporação de ar (Figura 29). Por outro lado, as espumas das claras S e P não apresentaram diferenças significativas entre elas até os três primeiros minutos de batimento, mas no *overrun* máximo e no final do batimento a espuma da clara S apresentou uma maior fração gasosa, resultados estes que refletem o comportamento destas claras no que se refere ao *overrun* e a densidade. No tempo de *overrun* máximo obtiveram-se os maiores valores de ϕ em todas as claras (Tabela 11) concordando com os resultados de *overrun* onde, nesse tempo de batimento, as espumas apresentaram *overrun* máximo e os menores valores de densidade (Figura 29).

Logo, o tempo de *overrun* máximo, pode ser considerado como tempo de batimento limitante quanto a formação de filmes e, portanto limitante quanto a incorporação de ar na espuma. Por outro lado, é importante destacar que a espuma da clara S, após o atingir o tempo relativo ao *overrun* máximo, mantém o valor de ϕ até o tempo final de batimento, comportamento diferente das amostras F e P, cuja ϕ diminui significativamente no final do processo de batimento.

Estes resultados indicam que a espuma da clara S é mais resistente ao colapso ocorrido após o *overrun* máximo, não havendo, portanto, elevada liberação do ar aprisionado na massa de bolhas, como ocorre nas demais claras. De acordo com Damodaran (2010), o *overrun* de uma espuma pode decair em função da desnaturação extensa, agregação e precipitação das proteínas causadas pelo cisalhamento excessivo. Desta forma, o colapso leva a liberação de gás para a atmosfera, anteriormente aprisionado na massa de bolhas, reduzindo a ϕ especialmente nas espumas das claras F e P. Essa resposta mais estável da espuma da clara S quanto ao cisalhamento após seu *overrun* máximo, pode ter relação com a espessura do filme proteico criado durante a formação de espuma, conforme será discutido nos resultados de microscopia óptica de fluorescência, embora deva ainda ser melhor investigado.

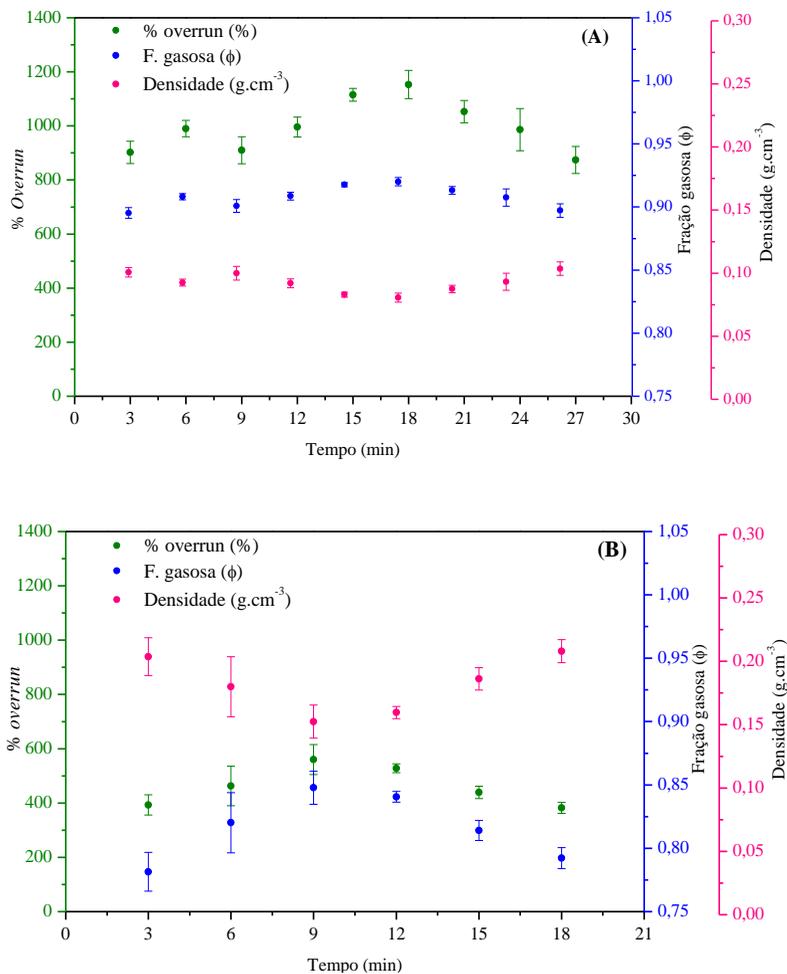
Além das informações sobre ar incorporado à espuma, a medida de fração da fase gasosa de espumas é utilizada como um indicativo da geometria das bolhas contidas na massa. Isso porque a incorporação de ar à fase contínua forma inicialmente bolhas mais esféricas e, conforme a fração gasosa aumenta, começa a ocorrer uma compressão entre essas bolhas que tendem a deformar e formar estruturas poliédricas. A interpretação da geometria em função da fração gasosa é usada como um indicativo da estabilidade das espumas, pois afeta tanto a lamela formada quanto os ângulos relativos às bordas de *Plateau* entre as bolhas.

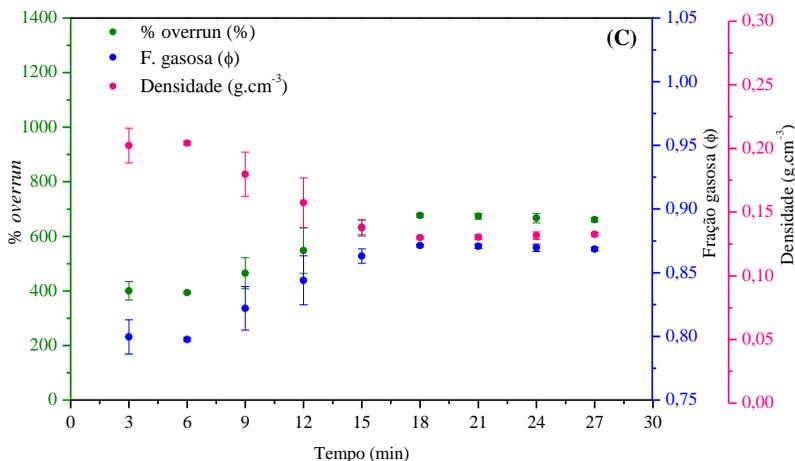
A morfologia de espumas se altera conforme há o aumento da fração de fase gasosa (ϕ). Valores abaixo de 0,83 apresentam espumas com esferas uniformes e incompressíveis, caracterizando espumas molhadas. Entretanto, quanto mais próximo de 1 for a ϕ , as espumas tendem a apresentar bolhas mais comprimidas, menos úmidas e com morfologia poliédrica (MASON,1999; SCHRAMM, 2014).

Desta forma, a partir dos valores de ϕ observadas nas espumas da clara F, P e S, embora não sendo uma correlação direta, pode ser um indicativo de que essas espumas apresentem bolhas com geometria

poliédrica, entretanto esse comportamento será melhor explorado nos ensaios de microscopia óptica de fluorescência.

Figura 29 - Curvas das médias e desvio padrão do *overrun* (%), densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) e fração da fase gasosa (ϕ) das espumas das claras fresca (A), pasteurizada (B) e desidratada reconstituída (C).





Todas as claras mostraram comportamento similar, apresentando curvas de *overrun* e de fração da fase gasosa crescentes, seguida de uma decréscimo após a capacidade espumante máxima ser alcançada (Figura 29). Além disso, as curvas de densidade mostraram comportamento inverso, sendo no início decrescente e após a capacidade espumante máxima, crescente. Sendo assim, a união das curvas em um único gráfico mostrou que a fração da fase gasosa é diretamente proporcional e a densidade inversamente proporcional ao *overrun* das espumas das claras F, P e S. Desta forma, a fração da fase gasosa atinge seu máximo e a densidade atinge seu mínimo quando a clara atinge seu *overrun* máximo. Isso significa dizer que devido à formação de bolhas e aumento da massa de espuma, ocorre o aumento do *overrun* e da fração da fase gasosa, em função da formação de novos filmes (superfícies) e aprisionamento do ar. Em contrapartida, o aumento do *overrun*, devido o aumento da massa de bolhas avaliado dentro de um volume fixo, causa a redução da densidade dessas espumas.

Campbell e Mougeot (1999) em estudos de caracterização de produtos alimentares aerados expõem que produtos como merengue, tem uma espuma com densidade entre 0,17 e 0,18 g.cm⁻³, *overrun* entre 750 e 800 % e fração gasosa entre 0,88 e 0,90, valores esses similares aos obtidos nesse trabalho.

Em estudo das propriedades físico-químicas das espumas de clara de ovos adicionadas de pectina e goma xantana, Ptaszek e colaboradores (2015) observaram que durante a formação de espumas, a fração da fase gasosa tem comportamento inverso ao da densidade. Os autores

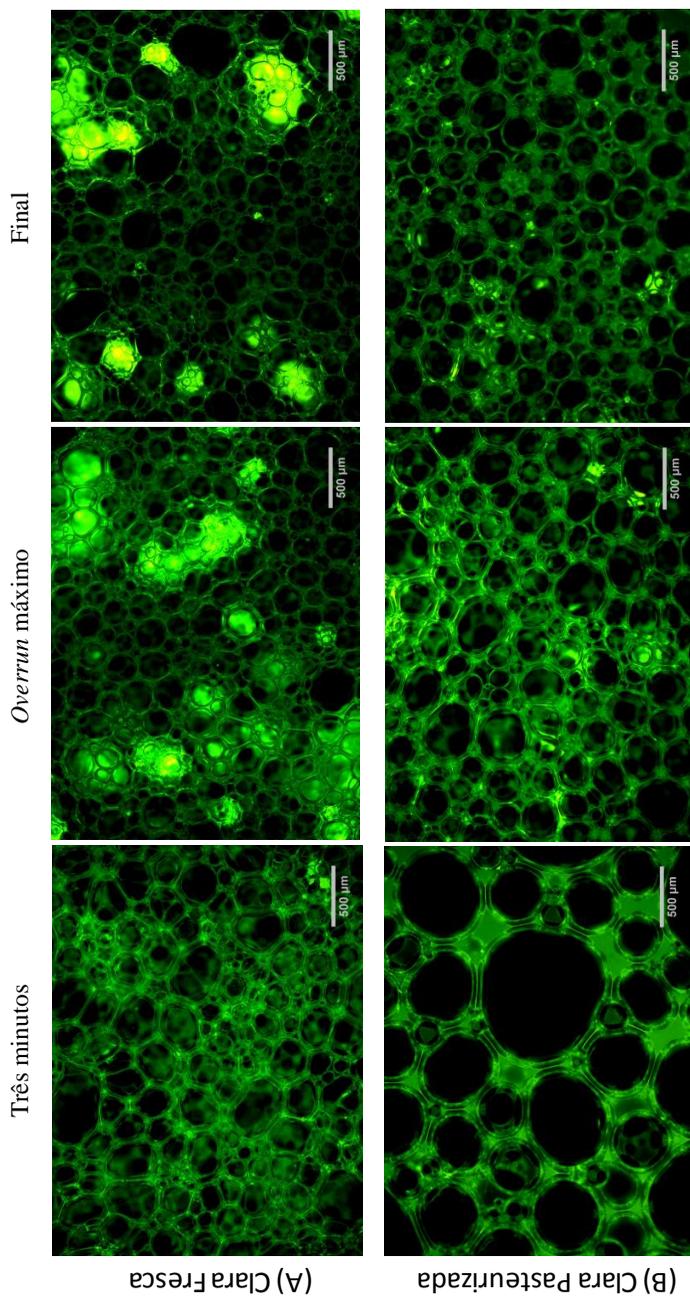
apontam que a clara padrão (sem hidrocoloides) foi a que apresentou maior fração gasosa e, portanto, menor densidade quando comparada às demais. O mesmo comportamento foi observado por Żmudzinski e colaboradores (2014) estudando o papel dos hidrocoloides nas propriedades mecânicas de espumas de clara de ovos.

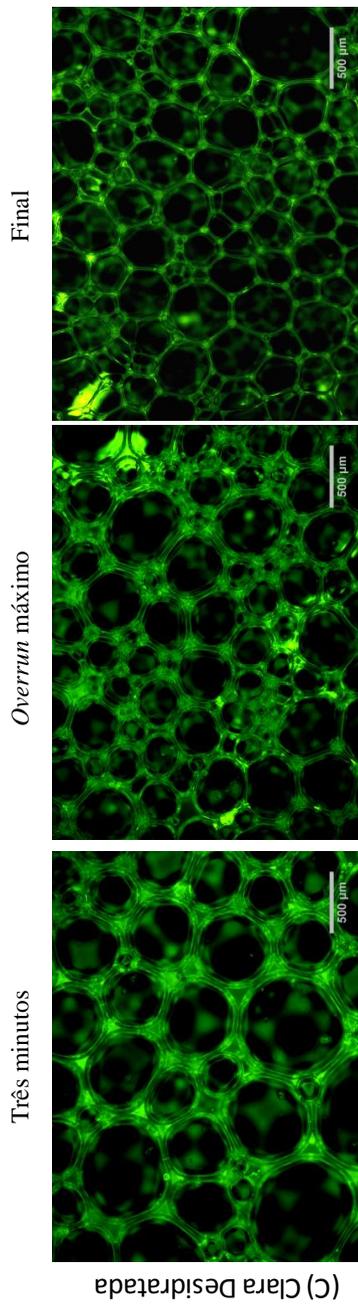
4.2.2 Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de *overrun*

Os ensaios de *overrun* (item 4.2.1) evidenciaram uma diferença quanto à capacidade espumante entre as claras F, P e S durante o tempo de batimento aplicado. Como já discutido, diversos fatores podem contribuir para essas diferenças, entre eles a tensão superficial do líquido, mudanças nas estruturas proteicas, características do filme proteico formado, entre outros. Para melhor compreender as diferenças na capacidade espumante dessas claras, medidas de interface com auxílio de ensaios de microscopia óptica de fluorescência durante os ensaios de *overrun* foram realizados e são apresentados na Figura 30.

Na Figura 30 são apresentadas as imagens de microscopia óptica de fluorescência referente aos ensaios de *overrun* nos tempos de três minutos, no tempo de *overrun* máximo e no tempo final do batimento para as espumas das claras fresca (imagens A), pasteurizada (imagens B) e desidratada reconstituída (imagens C).

Figura 30 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência das análises de *overrun* das espumas das claras frescas (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) nos três primeiros minutos de batimento, no *overrun* máximo e no final do batimento, com ampliação de 40 vezes.





Todas as apresentaram bolhas com geometria que variaram entre esférica e poliédrica, apresentando mudanças quanto ao tamanho e distribuição de bolhas, conforme houve evolução no tempo de medida (Figura 30). Segundo Walstra (1989), essa dinâmica no tamanho das bolhas ocorre porque no início do batimento para a formação de espumas, as bolhas formadas costumam ser de maior tamanho, mas, devido às forças de cisalhamento que agem em função do elevado gradiente de velocidade formado no líquido, as bolhas tendem a ser rompidas em bolhas menores. Além disso, Wilson (1989) explica que as modificações na morfologia durante o batimento de espumas também ocorre em virtude das forças atrativas entre as bolhas, que podem afetar sua geometria. Contudo Daltin (2011) atribui um papel relevante nessas modificações à tensão superficial das soluções, cujo impacto se dá especialmente no tamanho das bolhas formadas.

As espumas obtidas a partir da clara F (imagens A) apresentaram elevada quantidade de bolhas, desde os primeiros três minutos de batimento quando comparada as demais espumas (Figura 30). No *overrun* máximo ocorre uma redução do tamanho e aumento do número de bolhas na mesma área de espuma observada, quando comparadas a espumas com três minutos de batimento e, após o *overrun* máximo, observa-se um aumento no tamanho das bolhas. Quando avaliada a geometria das bolhas, observa-se que em todos os tempos de medida a clara F apresentou bolhas com formato poliédrico.

As espumas das claras P e S, através da observação das imagens B e C, respectivamente, apresentaram em três minutos de batimento espumas com menor número de bolhas e com bolhas aparentemente de maior diâmetro, quando comparadas à espuma da clara F (imagem A). Nessa medida, as bolhas de ambas as espumas apresentaram geometria predominantemente esférica. No *overrun* máximo, observa-se uma redução no tamanho e aumento do número das bolhas quando comparadas com as espumas após três minutos de batimento. No *overrun* máximo a geometria das bolhas começa a passar de uma forma esférica para poliédrica em ambas as claras e, no final do batimento, não se observam grandes diferenças em relação às espumas do *overrun* máximo, apenas que a espuma da clara P apresenta geometria mais esférica, enquanto a espuma da clara S é mais poliédrica.

Estes resultados estão de acordo com as observações reportadas por outros autores que, avaliando a morfologia de espumas de clara, relatam geometrias esféricas e poliédricas e aparecimento de uma ou outra modificação no tamanho em função das condições de batimento do

sistema. Assim, Yang, Berry e Foegeding (2009) observaram, com auxílio de microscopia confocal, que a espuma de clara desidratada reconstituída obtida após 20 minutos de batimento, apresentou bolhas com formato próximo ao esférico e com variada distribuição de tamanho de bolhas. O mesmo foi observado por Yang e Foegeding (2011) em espumas de clara desidratada reconstituída obtida após 15 minutos de batimento.

Raikos, Campbell e Euston (2007) avaliando os efeitos da propriedade espumante de clara fresca tratada termicamente com adição de sacarose e cloreto de sódio, observaram através de imagens microscopia confocal, que as espumas que apresentavam maior densidade de bolhas e com menor diâmetro eram aquelas relacionadas ao tempo de batimento de maior capacidade espumante. Os autores associam o tempo de batimento com a melhor adsorção das proteínas na interface ar-líquido, resultando em um melhor poder espumante e, portanto, espumas com maior número de bolhas. Lau e Dickinson (2005), estudando as propriedades espumantes de soluções de clara de ovo e açúcar invertido, observaram com auxílio de microscopia confocal, que a fase contínua com menor viscosidade foi capaz de incorporar mais ar, porém formou uma espuma com bolhas de tamanho médio maior do que as soluções que continham menos açúcar.

No que se refere à dinâmica de morfologia e tamanho das bolhas durante o batimento, alguns estudos apontam um comportamento similar ao observado neste estudo. Para Figueredo, Ribeiro e Sabadini (1999), as bolhas de uma espuma apresentam, geralmente, geometria esférica e/ou poliédrica. As bolhas esféricas contêm filmes líquidos mais espessos e são obtidas, principalmente, na fase inicial da formação de uma espuma. Conforme ocorre o afinamento do filme líquido a distância das bolhas de gás diminui, este tende a adquirir um formato mais poliédrico. Para Langevin (2017) a fração do volume de líquido presente na espuma influencia diretamente na forma da bolha. A quantidade da fração de volume de líquido na espuma pode variar de menos de 1 % (espuma seca) a mais de 10 % (espuma úmida). Em espumas com baixas frações líquidas, as bolhas são deformadas em poliedros com faces quase planas e faces curvas. Quanto maior for a fração de volume de líquido, bolhas mais esféricas e com movimento mais independentemente são criadas.

Ritzoulis (2013) descreve que no início do batimento, durante a formação de espuma, as bolhas inicialmente formadas estão separadas por camadas relativamente espessas da fase contínua apresentando

geometria esférica. Conforme a espuma torna-se uma grande concentração de bolhas, as forças atrativas podem resultar na junção das bolhas com subsequente perda da forma esférica à medida que cada bolha tenta acomodar-se entre seus vizinhos.

Outro fator que, segundo Daltin (2011), influencia tanto a formação quanto o tamanho das bolhas é a tensão superficial. Segundo este autor, quanto menor for a tensão superficial de soluções proteicas, mais será favorecida a formação de bolhas menores e em maior número.

Uma vez que a clara F apresentou maior capacidade espumante nos ensaios de *overrun* em relação às demais claras durante todo tempo de medida, micrografias dessa espuma mostrando bolhas com tamanhos menores, maior número de bolhas e geometria poliédrica (Figura 30-A) estão de acordo com os menores valores de tensão superficial e os maiores valores de ϕ que esta clara apresentou. O aumento no diâmetro das bolhas, observado no final do batimento para as claras F, também está de acordo com a redução do *overrun* e ϕ observados nesse mesmo tempo de medida, que se deve ao colapso da espuma em função do batimento excessivo.

Para as claras P e S, fica evidente que espumas com bolhas em menor número e de maior tamanho (Figura 30 – B/C), também estão de acordo com os ensaios de *overrun* e ϕ . Nessas claras o *overrun*, referente a três minutos de batimento é inferior ao da clara F, o que justifica a menor presença de bolhas nessas espumas. Devido a menor ϕ , a geometria da espuma se apresenta em uma forma mais esférica, uma vez que a incorporação de ar ainda não se mostra suficiente para as bolhas iniciarem um processo de compressão e, portanto, deformação. No entanto, com o aumento da incorporação de ar chegando ao seu máximo (*overrun* máximo), essas claras apresentaram maiores valores de *overrun*, aumentando o número de bolhas e reduzindo seu tamanho, passando para uma geometria aparentemente mais poliédrica.

No que se refere ao efeito da tensão superficial das claras sobre as características morfológicas das espumas, Foegeding, Luck e Davis (2006) apontam que o maior resultado da adsorção da proteína na superfície se dá pela redução da tensão superficial. Sendo assim, proteínas presentes em líquidos com tensão superficial menor são capazes de adsorver e formar novas superfícies ar-líquido, aumentando significativamente o volume da espuma. Este efeito da tensão superficial sobre as dimensões das bolhas pode ser observado nas espumas produzidas com a clara F, que por apresentar menor tensão superficial entre as claras, foi capaz de formar espumas com maior número de

bolhas, com menores tamanhos e mais poliédricos, conforme evidenciado nas imagens A da Figura 30.

A fração da fase gasosa também influencia na geometria das bolhas de uma espuma. Embora não seja uma relação direta, ela pode ser correlacionada. Nos ensaios de ϕ (**item 4.2.1**) a clara F apresentou ϕ de 0,90 já no início do batimento, corroborando com a sua aparência poliédrica desde a medida de três minutos, conforme observado na Figura 30.

Para contribuir com a análise das imagens apresentadas na Figura 30, as imagens de microscopia das triplicatas dos ensaios de *overrun* foram tratadas obtendo-se a média do número de bolhas que formam as espumas das claras F, P e S, sendo apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Médias e desvio padrão do número de bolhas obtidas pelo tratamento das imagens de microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de *overrun* das claras (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), referentes os tempos de três minutos, *overrun* máximo e tempo final.

Amostras	Número de bolhas (Unidades) ($\bar{X} \pm S$)		
	Três minutos	<i>Overrun</i> máximo	Final
F	128 ± 11 ^{A,a}	301 ± 8 ^{A,b}	224 ± 49 ^{A,c}
P	29 ± 5 ^{B,a}	102 ± 11 ^{B,b}	135 ± 13 ^{B,c}
S	28 ± 5 ^{B,a}	77 ± 8 ^{C,b}	115 ± 12 ^{C,c}

*Notas: Médias seguidas com as mesmas letras minúsculas (mesma linha) e a médias seguidas com as mesmas letras maiúsculas (mesma coluna), não diferem estatisticamente entre si através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Todas as claras apresentaram número de bolhas crescente conforme houve o aumento no tempo de batimento, atingindo seu maior valor no *overrun* máximo para as claras F (301 unidades) e P (102 unidades) e no final do batimento para a clara S (115 unidades). Do mesmo modo, devido ao número crescente de bolhas, todas as claras apresentaram diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$), quando avaliadas isoladamente nos diferentes tempos de batimento analisados. Quando comparadas entre si, a espuma da clara F foi a que apresentou significativamente maior número de bolhas durante todo o tempo de medida quando comparada às espumas das claras S e P. Por outro lado, as claras P e S, embora não tenham se diferenciado nos três minutos de

batimento, no *overrun* máximo e no final do batimento a clara P apresentou maior número de bolhas.

O aumento do número de bolhas com o tempo de batimento para todas as espumas avaliadas nesse estudo corrobora com o trabalho de Lau e Dickinson (2006). Esses autores observaram com auxílio de microscopia confocal, que espumas obtidas a partir de soluções de xarope de açúcar invertido e clara de ovo, apresentaram aumento da densidade de bolhas e redução no diâmetro das mesmas, conforme houve o aumento no tempo de batimento.

No que se refere às diferenças entre as espumas em termos de número de bolhas, estas podem ser atribuídas às características diferentes das claras. A espuma da clara F apresentou maior incorporação de ar quando comparada com as espumas das claras P e S. Isso indica que no início do batimento a incorporação de ar é mais eficiente para as claras F em relação às claras P e S. Desta forma, devido à maior adsorção das proteínas da clara F na superfície, ocorre a formação de maior número de bolhas, sugerindo a presença de bolhas de menor diâmetro, uma vez que a área medida foi padronizada. A eficiência na adsorção das proteínas da clara F pode estar relacionada à menor tensão superficial em relação às demais claras e da manutenção da estrutura nativa das proteínas contidas na solução que, favorecem a dinâmica de formação de novas interfaces ar-líquido, conforme discutido nos ensaios de tensão superficial e de *overrun* (**itens 4.1.8 e 4.2.1**). Segundo Foegeding, Luck e Davis (2006) a maior adsorção da proteína na superfície se dá pela redução da tensão superficial e conforme Daltin, (2011) a redução da tensão superficial é decisiva para a formação das bolhas que constituem as espumas.

Nas claras P e S, o menor número de bolhas e, portanto, a menor formação de espumas se deve, além de soluções com maior tensão superficial, às mudanças nas estruturas das proteínas em função dos tratamentos térmicos como visto nos ensaios de DSC (**item 4.1.7**), que podem alterar sua solubilidade e sua interação eletrostática, interferindo no processo de adsorção dessas proteínas para formação da interface, conforme discutido nos ensaios de *overrun* (**item 4.2.1**).

No tempo de batimento relativo ao *overrun* máximo, embora todas as claras tenham atingido a capacidade máxima de incorporação de ar nessa medida durante os ensaios de *overrun*, o mesmo comportamento não foi observado com relação ao número de bolhas obtidos nas espumas das claras P e S, uma vez que para estas espumas houve um aumento no número de bolhas no final do batimento (Tabela

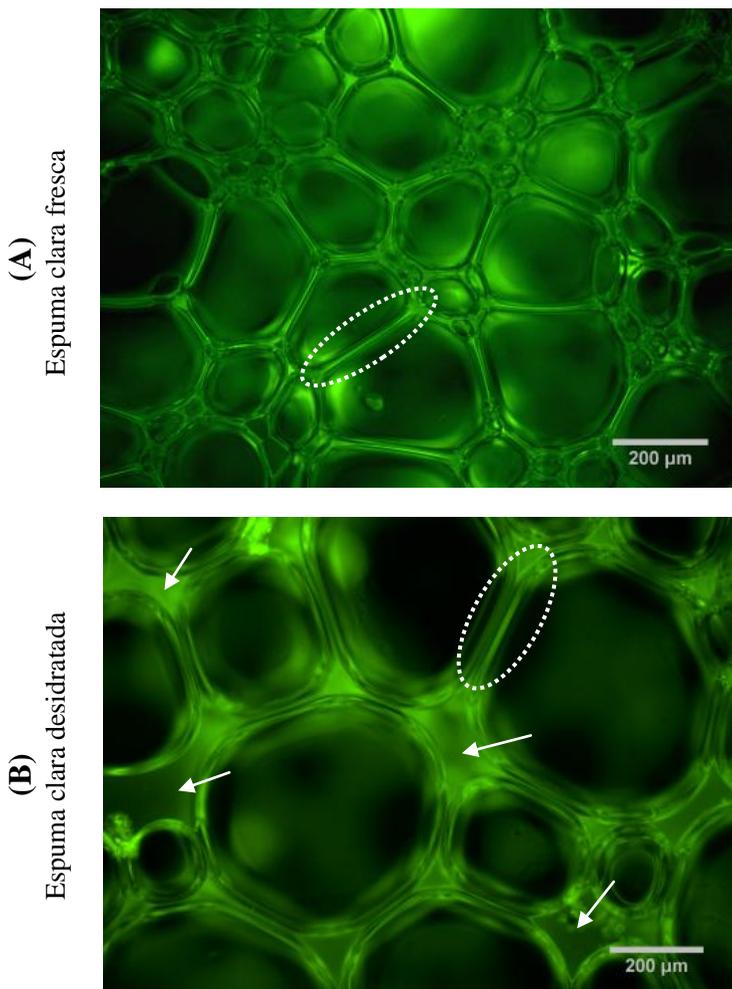
12). Comportamento similar foi descrito por Lau e Dickinson (2006) em espumas de clara de ovo em pó com adição de xarope de açúcar invertido. Estes pesquisadores observaram uma capacidade espumante elevada em 5 minutos de batimento para soluções de 6 % de clara, no entanto, a maior densidade de bolhas nessas espumas foi observada após 15 minutos de batimento. Eles atribuíram esse comportamento à quebra de bolhas grandes em menores, resultando na redução da fase dispersa e consequente redução do *overrun*.

Esse aumento no número de bolhas sugere que, mesmo aparentemente, não havendo a incorporação de ar após o *overrun* máximo, o filme proteico pode ser dividido em bolhas menores, como resistência ao efeito do cisalhamento, aumentando a quantidade de bolhas sem aumentar, necessariamente, o volume da espuma. Uma possível justificativa para esse comportamento pode ser devido a maior hidratação das espumas P e S, o que permite maior mobilidade das bolhas durante processo de cisalhamento.

Durante os ensaios de *overrun*, observou-se, através de avaliações subjetivas, que as claras P e S tinham em aspecto cremoso, mesmo após o *overrun* máximo, enquanto a clara F apresentava uma espuma mais seca e rígida. Langevin (2017) afirma que se a fração da fase líquida dentro da espuma for elevada, mais bolhas esféricas são formadas e ocorre uma mobilidade mais independente dessas bolhas dentro do sistema. De acordo com Daltin (2011), a cremosidade da espuma está associada à quantidade de fluido presente entre as bolhas, que por sua vez está relacionado à menor quantidade de ar incorporado. Se há o aumento da incorporação de ar, ocorre uma redução da espessura dos filmes lamelares, causando uma “desidratação” na espuma, o que reduz a mobilidade das bolhas e causa um aspecto mais rígido à espuma.

Para melhor compreensão do efeito da “cremosidade” da espuma em função da presença de filmes lamelares criados, são apresentadas na Figura 31 duas microscopias ópticas de fluorescência das espumas de clara fresca (A) e desidratada (B) no tempo de batimento referente ao *overrun* máximo (18 minutos). As imagens foram marcadas com um círculo tracejado para indicar o filme lamelar criado entre duas interfaces e com setas para indicar a fase contínua.

Figura 31 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência com ampliação de 100 vezes, dos ensaios de *overrun* no tempo de 18 minutos das espumas das claras fresca (A) e desidratada reconstituída (B)



As imagens A e B (Figura 31) mostram a diferença da presença de filmes lamelares nas espumas das claras F e S. Embora ambas as espumas tenham grande número de filmes lamelares, na espuma da clara S as áreas de interfacialmente são maiores, indicando que nessas espumas os filmes são mais espessos. A presença de regiões com maior quantidade de líquido (fase contínua), conforme indicado pelas setas na

Figura 31-B, permitiu que a espuma apresentasse um aspecto mais cremoso devido a sua maior hidratação, dando maior mobilidade as bolhas presentes. Nas espumas da clara F (Figura 31-A), a maior presença de filmes lamelares favoreceu uma maior distribuição da fase contínua pela espuma, conferindo a essa clara filmes lamelares mais finos e uma espuma com aspecto mais seco e rígido, corroborando com o observado nos ensaios de *overrun* (item 4.2.1, Figura 28).

Durante os ensaios de microscopia dos ensaios de *overrun* foi observado que os filmes interfaciais das espumas avaliadas possuíam espessuras diferentes. Para melhor observar essas diferenças, imagens de microscopia óptica de fluorescência com ampliação de 100 vezes (A) e 400 vezes (B) das espumas elaboradas com claras F, P e S foram realizadas e são apresentadas na Figura 32. Nas imagens observam-se em destaque os filmes interfaciais, cujos retângulos (imagens A) indicam a região interfacial que foi ampliada para a obtenção da imagem B. Nas imagens B, os traços marcam a espessura do filme proteico interfacial das espumas das claras F, P e S.

A partir do tratamento das imagens foram realizadas as medidas de espessura dos filmes interfaciais das espumas das claras F, P e S elaboradas após três minutos de batimento, no tempo de *overrun* máximo e no tempo final de batimento, sendo apresentadas como média e o desvio padrão na Tabela 13.

Figura 32 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de overrun das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) no tempo de batimento de três minutos, com ampliação de 100 X (A) e 400 X (B) indicando regiões de filmes proteicos e suas respectivas espessuras

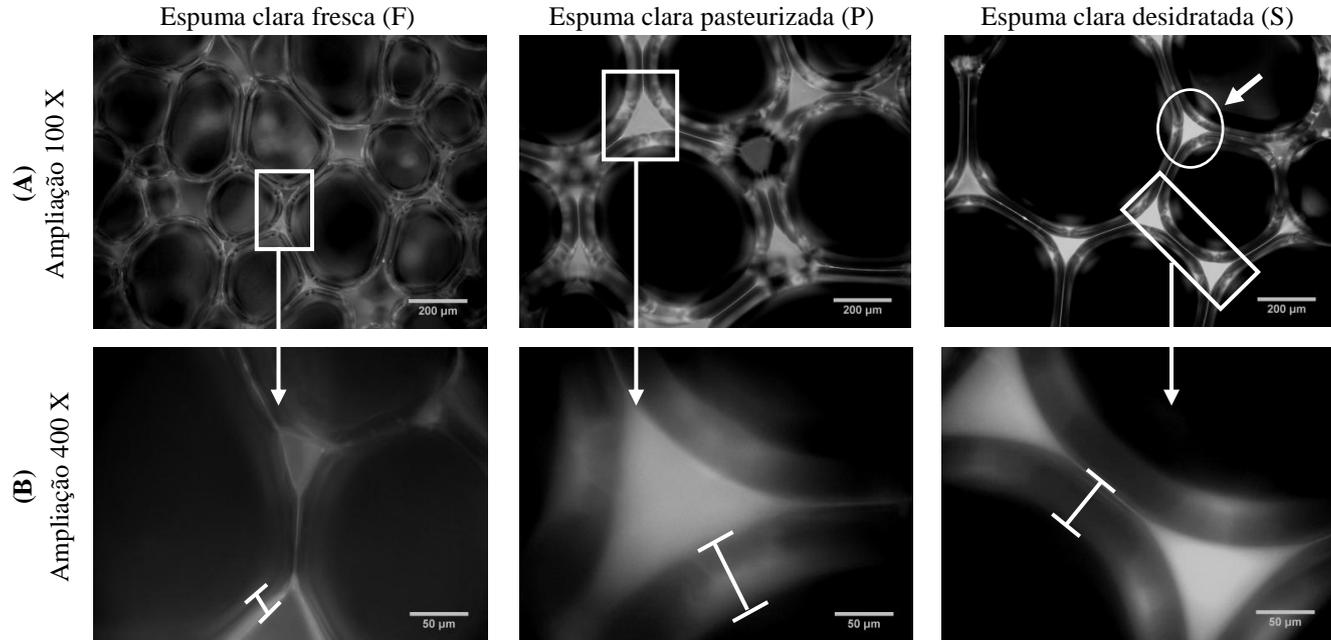


Tabela 13 - Médias e desvio padrão das medidas de espessura dos filmes interfaciais das espumas elaboradas a partir das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), nos tempos de três minutos de batimento, no *overrun* máximo e no final do batimento

Amostras	Espessura (μm) ($\bar{X} \pm S$)		
	Três minutos	<i>Overrun</i> máximo	Final
F	17,95 \pm 3,67 ^{A,a}	10,96 \pm 1,52 ^{A,b}	9,58 \pm 2,44 ^{A,c}
P	52,87 \pm 12,89 ^{B,a}	27,75 \pm 4,32 ^{B,b}	25,96 \pm 5,34 ^{B,b}
S	38,49 \pm 6,81 ^{C,a}	22,70 \pm 4,46 ^{C,b}	16,55 \pm 4,41 ^{C,c}

^aNotas: Médias seguidas com as mesmas letras minúsculas (mesma linha) e a médias seguidas com as mesmas letras maiúsculas (mesma coluna), não diferem estatisticamente entre si através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Como é observado na Figura 32 (imagens A e B) obtidas no tempo de três minutos de batimento, a espuma da clara F apresenta espessura da película interfacial que compõe a bolha menos espessa do que o observado nas demais claras. Os traços indicam o início e o fim da espessura dos filmes interfaciais (imagem B) para todas as espumas analisadas, evidenciando as diferenças na espessura da película interfacial das bolhas das espumas.

Dutta et al. (2004) supõem que as bolhas de ar estão rodeadas com uma camada de meio contínuo, cuja espessura pode variar. Sendo assim, a película interfacial que recobre as bolhas das claras F, P e S, observada neste estudo, pode ser devido a interação entre as camadas de proteínas e uma quantidade de fase contínua (líquido).

No que se refere às modificações na espessura dos filmes lamelares durante o batimento, observou-se que todas as claras apresentaram comportamento similar, com redução na espessura do filme conforme houve o aumento no tempo de batimento, exceto para a espuma da clara P, na qual a espessura do filme não variou após o *overrun* máximo. Isso indica que embora haja redução na capacidade espumante após o tempo de *overrun* máximo, as bolhas podem continuar se dividindo em função do cisalhamento aplicado, reduzindo sua espessura sem, necessariamente, incorporar mais ar a espuma.

As claras F apresentaram filmes com menor espessura quando comparados às demais claras durante todo o tempo de medida (Tabela 13). Isso corrobora com o observado nas imagens da Figura 32 -B.

Nessas imagens ressalta-se a menor espessura dos filmes interfaces apresentados pela clara F. A espuma da clara P foi a que apresentou maiores valores de espessura, sendo cerca de 60 % mais espessa do que os filmes medidos na clara F, durante todo o tempo de medida. Em relação a clara S a diferença observada na espessura foi menor. A clara S segue o comportamento observado na clara F, reduzindo o filme conforme aumenta o tempo de batimento e apresentando valores de espessura localizados entre os valores observados para as claras F e P.

Devido ao efeito do tratamento térmico e mudanças na estrutura proteica, alterações nas cargas elétricas e, portanto na interação eletrostática entre as proteínas e proteínas-solvente podem ocorrer. Se uma maior repulsão eletrostática proteína-solvente ocorrer, aumentando a interação proteína-proteína, pode ser que espumas das claras P e S formem filmes interfaciais mais espessos devido à formação de multicamadas proteicas durante a criação das bolhas em função da maior interação entre proteínas. Entretanto, esse fato deve ser melhor investigado.

Analisando a variação da espessura do filme lamelar em função do tempo de batimento, observa-se que para as espumas de clara F a presença de um filme menos espesso, observado nas bolhas após três minutos de batimento, são um indicativo da maior incorporação de ar e maior fração da fase gasosa, que ocorre já no início do batimento, como discutido nos ensaios de *overrun* e de fração da fase gasosa. Conforme Daltin (2011), cada novo filme formado faz com que os filmes anteriores reduzam sua espessura. Isso corrobora com os resultados observados nessas espumas, uma vez que apresentaram maior incorporação de ar e consequente formação de maior número de filmes, produzindo maior número de bolhas com menor espessura de filme interfacial. Essa melhor capacidade de incorporar ar à massa de bolhas, está relacionada a menor tensão superficial e maior viscosidade da solução, bem como, estado conformacional nativo das proteínas, como já discutido nos ensaios anteriores.

A espuma da clara P foi a que apresentou maior espessura dos filmes interfaciais (52,87 μm) sendo 66 % maior do que a espessura dos filmes da clara F, porém a diferença é menor em relação a clara S (27 %) após três minutos de batimento (Tabela 13). Embora nos ensaios de *overrun* as claras P e S tenham apresentado menor capacidade espumante em relação a clara F, a clara P foi a que obteve os menores valores de *overrun* em relação a todas as claras avaliadas. Desta forma, a clara P que apresentou menor capacidade espumante e menor fração

gasosa, foi a que obteve filmes mais espessos. Isso, mais uma vez sugere que quanto maior for a capacidade de formar novas superfícies e, conseqüentemente, incorporar mais ar e formar mais espuma, menor será a espessura do filme formado.

No tempo de *overrun* máximo os filmes interfaciais de todas as claras apresentam redução da espessura entre 40 e 50 %, em relação a espessura do filmes no início do batimento (três minutos), conforme Tabela 13. Essa redução na espessura dos filmes interfaciais coincide com a maior capacidade de incorporação de ar nas espumas medidas nos ensaios de % *overrun* (item 4.2.1), bem como ao aumento do número de bolhas nas espumas apresentados na Tabela 12. Embora pareça haver uma correlação do aumento da capacidade espumante, com o aumento do numero de bolhas presentes na espuma e a redução na espessura do filme interfacial, os resultados observados no final do batimento, para as análises do número de bolhas e a espessura do filme, não parecem apresentar tal tendência. Isso porque, mesmo sendo pequena, ainda ocorre a redução da espessura do filme (6 a 20 %, em relação à espessura no *overrun* máximo), em todas as claras (Tabela 13). O aumento do número de bolhas também é observado no final do batimento para as claras P e S (Tabela 12). Nesse tempo de medida, os ensaios de *overrun* e fração da fase gasosa apresentaram redução, que foi relacionada a um colapso das espumas em função do excesso de batimento. Sendo assim, a aumento do numero de bolhas nas claras P e S pode ser um mecanismo de redução das bolhas maiores em menores em função do cisalhamento, sem que haja necessariamente a incorporação de ar à massa.

Conforme Wilson (1989) durante a formação de espuma, as bolhas iniciais apresentam-se separadas por camadas relativamente espessas da fase contínua e, durante o batimento, se o filme for muito afinado ocorrerá sua a ruptura. Isso sugere que durante o batimento processos de formação de bolhas e de coalescência ocorrem simultaneamente.

Embora diversos estudos da propriedade de formação de espuma de clara de ovos já tenham sido publicados, não foram encontrados trabalhos que tenham realizado a medida da espessura dos filmes proteicos, conforme realizado neste estudo.

Durante os ensaios de microscopia óptica de fluorescência das medidas de *overrun* foi possível observar as regiões referentes às bordas de *Plateau*, que se formam com o encontro da face de três bolhas adjacentes. As bordas de *Plateau* foram observadas em todas as

espumas em todos os tempos de medida e pode se observada com na Figura 32 – A, indicado por um círculo e uma seta.

A caracterização da borda de *Plateau* ou canais de *Plateau* ocorre devido a intersecção de três interfaces (bolhas) diferentes, formando uma estrutura que se assemelha a um triângulo, como apontado pelos círculos tracejados. A presença e identificação dessas regiões são importantes para auxiliar na caracterização microestrutural das espumas, bem como, na compreensão da geometria das bolhas, seu tamanho e os efeitos na estabilidade das espumas.

As bolhas formadas apresentam pressão interna diferente da fase contínua especialmente entre as bordas de *Plateau*. Conforme a lei de Young-Laplace, a face interna de uma bolha possui pressão maior do que a face externa, uma vez que o lado côncavo de uma esfera apresenta maior pressão em função das forças de atração (DALTIM, 2011). Essa diferença de pressão interfere tanto no tamanho das bolhas formadas quanto no processo de estabilidade da espuma (SHAW, 1975; WASTRA, 2010).

Nas espumas em que a fração da fase gasosa é baixa, a pressão de *Laplace* provoca bolhas mais esféricas, em função de uma grande área côncava na fase contínua. Se a fração gasosa for elevada, a lamela começa a ficar cada vez mais fina e plana e a junção de três lamelas forma a borda de *Plateau* (WILSON, 1989). Devido a região de superfície convexa que compõe a borda de *Plateau*, há uma menor pressão dessa região em relação a lamela. Essa diferença de pressão entre fase contínua e fase dispersa, bem como entre a lamela e a borda de *Plateau* são importantes para compreender a estabilidade da espuma (DALTIM, 2011). Esses efeitos serão melhor discutidos nos ensaios de estabilidade.

4.2.3 Percentagem de drenado e tempo de meia vida

Os resultados da % DR determinados durante um período de análise de 120 minutos, para as espumas das claras F, P e S obtidas após batimento no tempo de *overrun* máximo respectivo de cada clara (determinado nos ensaios de *overrun*), são apresentados como média e desvio padrão na Tabela 14.

Tabela 14 - Média e desvio padrão da drenagem (% DR) dos ensaios de estabilidade das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S) nos tempos: 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.

Tempo (min)	% DR ($\bar{X} \pm S$)		
	F	P	S
20	15 ± 2 ^a	19 ± 1 ^a	17 ± 2 ^a
30	26 ± 2 ^a	28 ± 2 ^{a,b}	31 ± 2 ^b
40	35 ± 1 ^a	36 ± 2 ^a	42 ± 1 ^b
60	47 ± 2 ^a	47 ± 2 ^a	55 ± 1 ^b
90	58 ± 2 ^a	56 ± 2 ^a	65 ± 1 ^b
120	64 ± 2 ^a	62 ± 2 ^a	70 ± 2 ^b

^aNotas: Médias seguidas com as mesmas letras minúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Todas as espumas apresentaram uma % DR crescente até o fim da medida (120 minutos) com valores variando entre 15 a 70 % da massa do líquido drenado em relação ao líquido total contido na espuma (Tabela 14).

As espumas das claras F e P apresentaram processo de drenagem similar durante todo o tempo de medida, não sendo observadas diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre a estabilidade dessas espumas. A clara S apresentou valores que foram de 17 a 70 % nos tempos de 20 e 120 minutos, respectivamente, apresentando % DR superior aos das espumas das claras F e P durante todo o tempo de medida. Isso indica uma menor estabilidade das espumas produzidas com a clara S quando comparada às espumas de clara F e P. O processo de desestabilização de espumas proteicas é complexo e tem sido abordado por vários autores. Esse processo pode ser estar relacionado com a força gravitacional, a diferença de densidade entre a fase contínua e a fase dispersa, a viscosidade da fase contínua, as diferenças de pressão, as características viscoelásticas dos tensoativos e a tensão interfacial (DALVIN, 2011; DAMODARAN, 2005).

Embora os resultados apontem que espumas da clara S sejam mais afetadas pelos efeitos que governam a estabilidade (Tabela 14), indicar quais desses efeitos são mais intensos faz necessário o uso de outras técnicas. Sendo assim, para melhor compreender os efeitos relacionados a instabilidade das espumas das claras F, P e S, eles serão melhor explorados através da avaliação das mudanças estruturais dinâmicas das bolhas nos ensaios de microscopia óptica de fluorescência

dos ensaios de estabilidade. O uso das técnicas de microscopia é importante porque além das propriedades relacionadas ao fluxo de líquido, a drenagem também depende da geometria da rede de espuma e da distribuição de bolhas (YANG; FOEGEDING, 2011).

Em uma análise da cinética de drenagem das espumas observa-se que até 40 minutos de ensaio, todas as claras apresentaram maior taxa de drenagem, sendo estatisticamente maior para a espuma da clara S e, nos 80 minutos de medida restantes, a taxa de drenagem reduziu expressivamente para todas as claras.

Essa maior drenagem no início da medida (até 40 minutos) está relacionada ao efeito da força gravitacional, que é favorecida se a espuma for mais hidratada, ou seja, com maior quantidade de fluido permeando uma espuma com menor densidade de bolhas (observado pela menor fração da fase gasosa nas claras P e S, discutido no **item 4.2.1**). Depois de 40 minutos, o filme lamelar começa a ficar mais fino e a drenagem passa a ser governada, principalmente, pelas forças de atração tensoativo-água e as forças de repulsão entre as duas interfaces muito próximas (DALVIN, 2011). De acordo com Rio et al. (2014) quando a fração do volume líquido de espuma reduz abaixo de 30 % as bolhas deixam de ser esféricas e passam a estruturas mais compactas e achatadas em relação as películas líquidas, formando estruturas poliédricas. Conforme Damodaran (2005) quando duas interfaces da película fina do líquido são aproximadas (interfaces de duas bolhas) as proteínas adsorvidas geram uma interação e criam uma pressão de separação, que dificulta a drenagem do líquido, retardando o afinamento do filme. Sendo assim, a cinética de drenagem das claras F, P e S pode ser dividida em duas etapas em que o processo ocorre por mecanismos diferentes: a) nos primeiros 40 minutos, onde a drenagem é governada pela ação da gravidade e b) após 40 minutos, quando o processo de drenagem passa a ter maior influência das forças de atração entre proteína-líquido e as forças de repulsão entre as interfaces o que leva a uma diminuição na velocidade de drenagem.

As lamelas mais espessas, que ocorrem principalmente no início da drenagem, estão relacionadas com a maior hidratação da espuma, devido a menor incorporação de ar (ROSEN; KUNJAPPU, 2012; SHAW, 1975). Como discutido nos ensaios de *overrun*, fração da fase gasosa e ensaios de microscopia óptica de fluorescência do *overrun* (**item 4.2.1 e 4.2.2**), as espumas das claras P e S apresentaram menor formação de espuma, o que pode favorecer a taxa de drenagem maior

nessa etapa, devido a maior quantidade de fluido permeando uma quantidade menor de bolhas, especialmente na espuma da clara S.

Contudo, após um tempo de drenagem, começa a ocorrer o afinamento do filme lamelar, a drenagem começa a envolver a remoção do líquido da região lamelar que passará a ser escoado para as regiões de bordas de *Plateau* (SHAW, 1975). Esse movimento do fluido intensifica o efeito da coalescência nas bolhas em função do afinamento da lamela (DALVIN, 2011; RIO et al., 2014). Desta forma, a drenagem sob a influência da diferença de pressão é mais importante quando as lamelas são finas (ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

Apesar de ser um processo inevitável, a drenagem pode ser retardada pela fase contínua mais viscosa e pelo aumento da pressão de separação. A viscosidade mais elevada do líquido pode causar um fluxo mais lento de líquido através da rede de espuma e limitar a taxa de difusão de gás (DAMODARAN, 2005; YANG; BERRY; FOEGEDING, 2009; YANG; FOEGEDING, 2011). Sendo assim, o comportamento da cinética de drenagem das claras está de acordo com os resultados reológicos onde as claras com maior viscosidade ($F > P > S$) apresentaram maior estabilidade (**item 4.1.5**).

Manzocco, Panozzo e Nicoli (2013) estudando os efeitos da aplicação de radiação ultravioleta (UV) em clara de ovos, observaram que as espumas de claras tratadas com UV apresentaram estabilidade superior àquelas não tratadas. Os autores apontaram como uma das causas a maior viscosidade aparente da fase contínua que poderia aumentar a viscoelasticidade do filme. Outros estudos com espumas feitas com adição de xarope de açúcar invertido e com sacarose mostram que o aumento da viscosidade da fase contínua contribuiu para o aumento da estabilidade de espumas proteicas (LAU; DICKINSON, 2006; YANG; FOEGEDING, 2010, 2011).

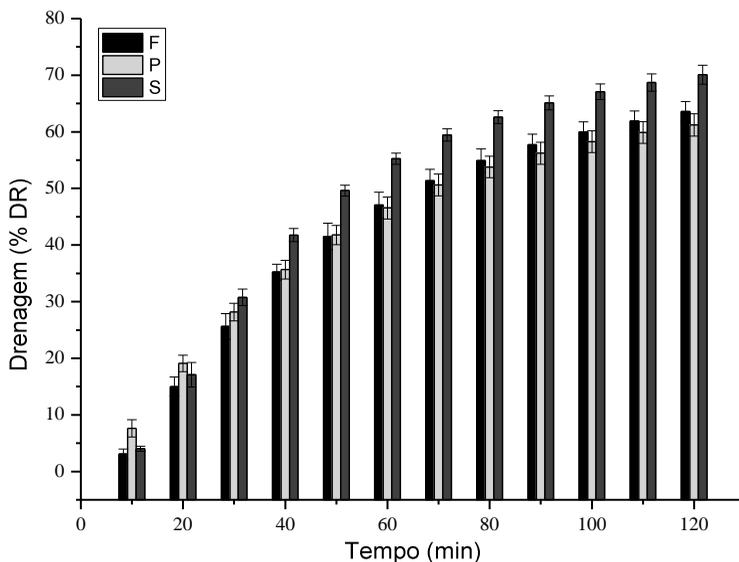
Outro fator que deve ter contribuído para a maior estabilidade das espumas das claras F quando comparada a da clara S está associado ao efeito dos tratamento térmico conforme discutido anteriormente (**itens 4.1.7 e 4.2.1**). As proteínas presentes nas claras F, provavelmente sofreram menores modificações o que favoreceu as interações proteína-água, contribuindo com a pressão de separação entre as interfaces o que colabora para maior interação com o filme líquido, reduzindo sua drenagem.

Além disso, a menor estabilidade observada nas espumas da clara S em relação às demais espumas pode também estar associada a sua maior tensão superficial o que pode ter favorecido o processo de

drenagem. A diferença de pressão faz o líquido drenar para as bordas de *Plateau* e, quanto maior a tensão superficial da solução na lamela, maior a diferença de pressão e, portanto, maior poderá ser a drenagem (ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

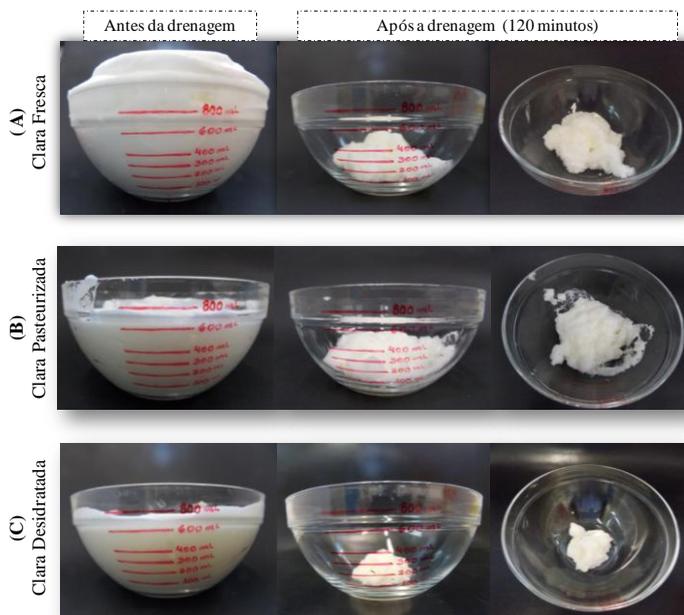
Para melhor observar a estabilidade das espumas, os valores das médias e desvio padrão da % DR foram plotados em um gráfico e são apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Cinética de estabilidade das médias e desvio padrão do drenado (% DR) das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), durante os ensaios de estabilidade.



Fica evidente (Figura 33) a diferença no processo de drenagem para as claras F, P e S, onde após 40 minutos de drenagem a clara S começa a apresentar menor estabilidade em relação às demais espumas. Esse comportamento corrobora com as imagens adquiridas durante os ensaios de estabilidade para todas as claras, registradas antes da medida e após os 120 minutos de drenagem, conforme apresentado na Figura 34 através das imagens A, B e C.

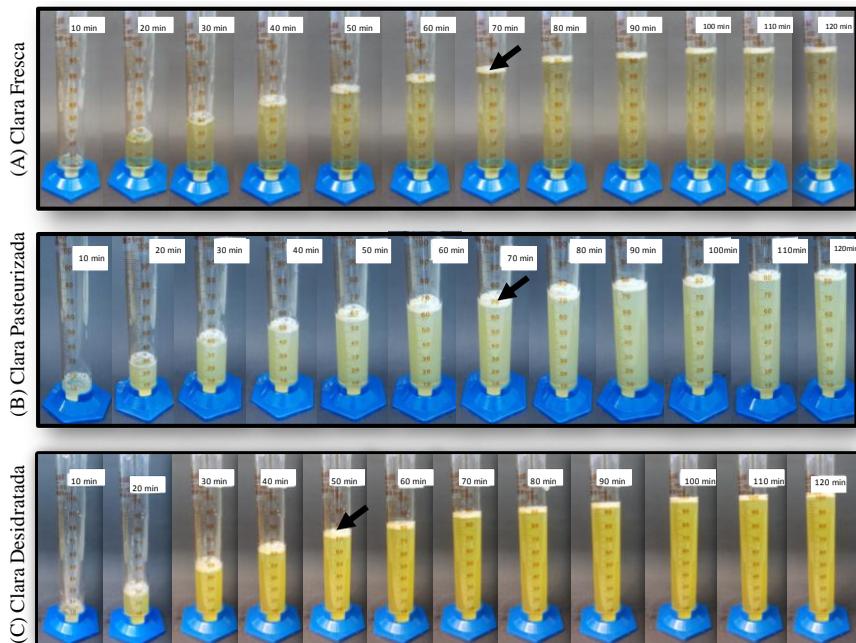
Figura 34 - Imagens das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), durante os ensaios de estabilidade, obtidas antes de iniciar o ensaio de drenagem e após os 120 minutos de drenagem.



A espuma da clara S (Figura 34 - C) apresentou menor quantidade de espuma residual após os ensaios % DR (120 minutos), corroborando com os resultados de maior % DR da fase líquida da espuma apresentados na Tabela 14 e na Figura 33.

O tempo de meia vida das espumas também pode ser usado como parâmetro para avaliar a estabilidade das espumas. Sendo assim, de forma ilustrativa, os drenados no tempo de medida de 10 a 120 minutos dos ensaios de estabilidade das espumas das claras F, P e S foram registrados e são apresentados na Figura 35. O tempo de meia vida foi indicado por uma seta no tempo do drenado correspondente de cada clara.

Figura 35 - Imagens capturadas durante os ensaios de drenagem apontando o tempo de meia vida das espumas de clara fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S).



Os tempos de meia vida das claras F e P foram obtidos após 70 minutos de análise, conforme indicado nas imagens A e B, respectivamente. Contudo, o tempo de meia vida para a espuma da clara S ocorreu em um tempo menor, 50 minutos. Isso indica que os fatores que atuam no processo de desestabilização das espumas ocorrem mais intensamente nas espumas da clara S dos que nas espumas das claras F e S, corroborando os valores de % DR (Tabela 14) que apontam a espuma da clara S como a de menor estabilidade.

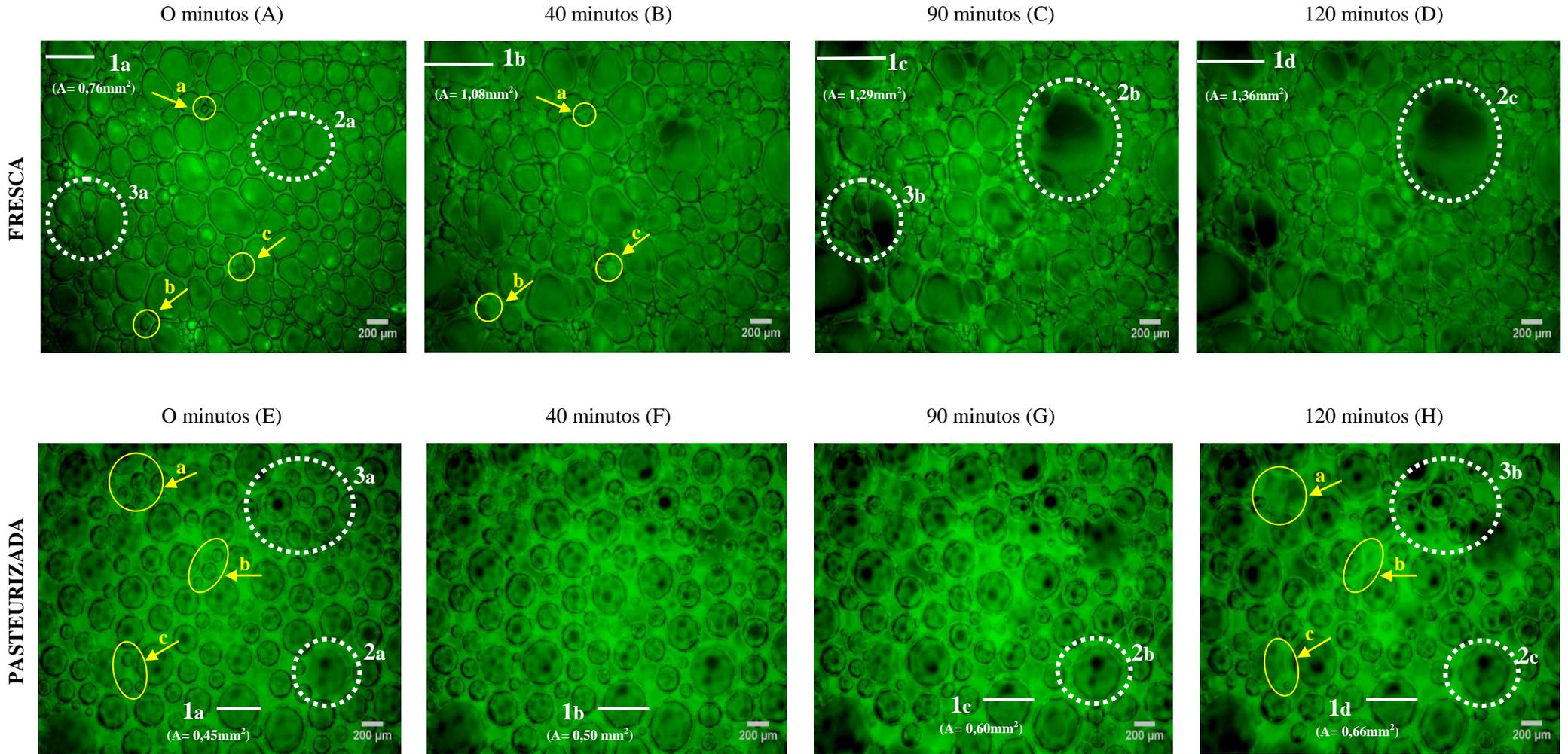
Yang, Berry e Foegeding (2009) estudaram a estabilidade de espumas de clara desidratada (EWP), de soro de leite (WPI) e espumas com mix de ambas (EWP/WPI) relatam que a espuma EWP apresentou maior tempo de meia vida do que as demais espumas. Os autores sugerem que a estabilidade das espumas de WPI e WPI / EWP depende da viscosidade da solução, bem como da elasticidade interfacial. Resultado similar foi observado por Yang e Foegeding (2010) estudando os efeitos da adição de sacarose em espumas isoladas de clara de ovo e de soro de leite. Nesse estudo foi observado que o tempo de meia vida da espuma de soro de leite aumentou exponencialmente enquanto o da clara de ovo aumentou linearmente com o aumento da viscosidade

aparente da solução, sugerindo que as mudanças de estabilidade da espuma podem ser retardadas por uma fase contínua viscosa e interfaces elásticas. Lau e Dickinson (2005) estudando as propriedades espumantes de soluções de clara de ovo e açúcar invertido, observaram que a espuma obtida apenas com clara apresentou um tempo de meia vida de 1h, sendo inferior àquelas espumas formadas com a presença de açúcar, devido a diferença de viscosidade.

4.2.4 Microscopia óptica de fluorescência dos ensaios de estabilidade: avaliação das mudanças estruturais dinâmicas

As microestruturas das espumas recém-formadas observadas por microscopia óptica de fluorescência complementam as medidas de estabilidade das espumas e fornecem mais evidências experimentais sobre as diferenças encontradas na estabilidade das espumas das claras F, P e S. Sendo assim, as microscopias óptica de fluorescência relativas aos tempos de 0, 40, 90 e 120 minutos para a espuma da clara fresca (A – D), clara pasteurizada (E – H) e clara desidratada reconstituída (I – L) são apresentadas na Figura 36.

Figura 36 – Avaliação das mudanças estruturais dinâmicas das espumas das claras fresca (imagens A – D), pasteurizada (Imagens E – H) e desidratada reconstituída (imagens I – L) nos tempos de 0, 40, 90 e 120 minutos dos ensaios de estabilidade com auxílio de microscopia óptica de fluorescência com ampliação de 40 vezes



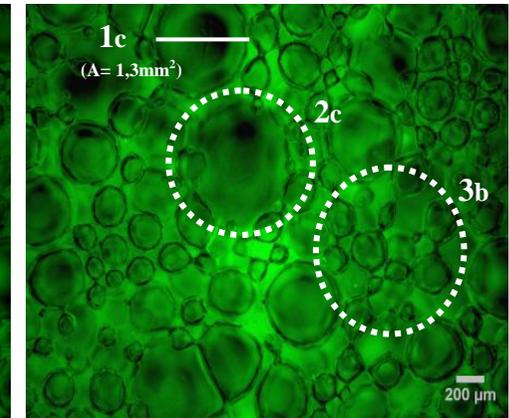
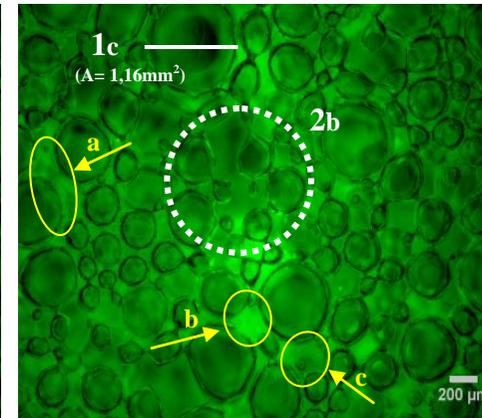
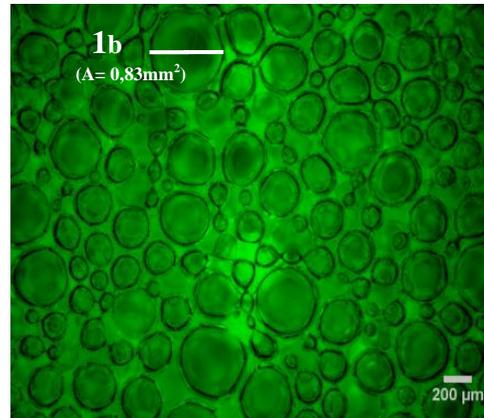
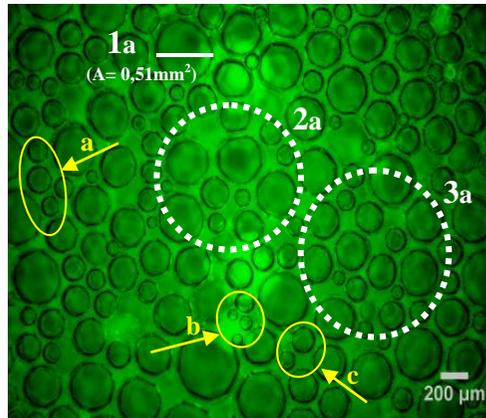
DESIDRATADA

0 minutos (I)

40 minutos (J)

90 minutos (K)

120 minutos (L)



*Notas:

Número 1, seguido das letras a, b, c e d representam o *coarsening* (crescimento) da bolha durante o tempo.

Número 2 seguido das letras a, b e c indicam o círculo tracejado referente a ocorrência da maturação de Ostwald.

Número 3 seguido pelas letras a, b e c indicam o círculo tracejado referente a ocorrência do movimento das bolhas pra superfície (*creaming*) e o processo de coalescência.

Setas a, b e c e círculos amarelos indicam regiões em que ocorreu o desaparecimento de bolhas pequenas.

A sequência de imagens (Figura 36) permitiu observar o movimento dinâmico no sistema e as mudanças na distribuição de bolhas no mesmo plano focal, em todas as espumas avaliadas. Na sequência de imagens observa-se a evolução da camada superior da espuma instável, de um sistema inicialmente mais denso de pequenas bolhas (imagens A, E, I) para um sistema menos denso de grandes bolhas (imagens D, H, L). Esse processo de mudança da espuma, conforme discutido (**item 4.2.3**), envolve a combinação de fatores como maturação de Ostwald, coalescência, *coarsening* e *creaming*.

Para permitir uma análise quantitativa, as bolhas contidas nas imagens apresentadas na Figura 36 foram computadas e os valores são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Número de bolhas das espumas das claras fresca (F), pasteurizada (P) e desidratada reconstituída (S), das imagens A – L dos ensaios de estabilidade com auxílio de microscopia óptica de fluorescência nos tempos de 0, 40, 90 e 120 minutos.

Tempo (minutos)	Bolhas (unidade)		
	Fresca	Pasteurizada	Desidratada
0	260	137	168
40	141	124	140
90	115	110	107
120	106	96	102

*Nota: A contagem das bolhas foi realizada apenas em relação ao ensaio apresentado na Figura 36, não apresentando média e desvio padrão e, portanto, sem análise estatística.

Todas as claras apresentaram comportamento similar, exibindo redução do número de bolhas com o passar do tempo de medida. A espuma da clara F expôs o maior número de bolhas no tempo 0 (260 un), seguida pela clara S (168 un) e clara P (137 un). Essa maior densidade no número de bolhas para a espuma da clara F é observado pela imagem A (Figura 36), quando comparada as demais claras (imagens E; I) estando de acordo com os resultados *overrun*.

Para todas as espumas avaliadas, no fim do ensaio, o número de bolhas reduziu, para 120, 96 e 102 unidades para as claras F (imagem

D), P (imagem H) e S (imagem L), respectivamente, evidenciando a redução das bolhas com o passar do tempo de análise.

A redução no número de bolhas em espumas de clara de ovo ocorrida durante os ensaios de estabilidade observados nesse estudo corrobora com trabalhos publicados por outros autores, que utilizaram a microscopia confocal como ferramenta de análise. Yang, Berry e Foegeding (2009) estudando espumas de clara de ovo desidratada reconstituída, observaram um aumento no tamanho das bolhas e uma redução do número de bolhas nas espumas durante o tempo de medida. Yang e Foegeding (2011) estudaram os efeitos da adição de sacarose em espumas de clara de ovo e observaram que após 20 minutos em repouso, as espumas apresentaram redução do número de bolhas por unidade de área e um aumento de tamanho das mesmas. A redução na densidade de bolhas, seguida pelo aumento no diâmetro das bolhas também foi observado por Lau e Dickinson (2005) e Raikos, Campbell e Euston (2007) durante ensaios de estabilidade de espumas proteicas com clara do ovo.

Analisando detalhadamente as imagens (Figura 36) é possível observar que todas as claras apresentaram mecanismos de desestabilização variados que serão discutidos separadamente.

Todas as claras mostraram redução no diâmetro de bolhas pequenas até que ocorresse o seu completo desaparecimento, com destaque para as espumas das claras P e S conforme apontado pelas setas amarelas seguidas das letras a, b e c (Figura 36). No tempo zero (logo após a formação das espumas) as setas apontam nas espumas das claras F (imagem A), P (imagem E) e S (imagem I) a presença de bolhas de pequeno diâmetro que durante o tempo de medida, não foram mais observadas, como mostram as imagens B, H e K das espumas das claras F, P e S, respectivamente.

Quando a espuma formada apresenta tamanho de bolha menor, bem como, menor dispersão no tamanho de bolhas, isto contribuiu para uma maior estabilidade da espuma. A redução de bolhas de menor diâmetro nas espumas pode ser explicada com base nos mecanismos de desestabilização das bolhas, que envolvem diferença de densidade entre a fase contínua e a fase dispersa e na diferença de pressão entre as bolhas de tamanhos diferentes (YANG; BERRY; FOEGEDING, 2009). As bolhas com raio menor possuem pressão interna superior a das bolhas com diâmetro maior e, conforme Wierenga e Gruppen (2010), o gás dentro de um sistema coloidal difunde para áreas onde a concentração de gás dissolvido é menor (menor pressão) como as bolhas maiores e a atmosfera. Essa difusão faz com que o desaparecimento das

bolhas em uma espuma seja termodinamicamente favorável, devido à redução da energia livre do sistema (FIGUEREDO; RIBEIRO; SABADINI, 1999).

Embora presente em todas as espumas estudadas, nas espumas das claras P e S esse mecanismo parece ter maior efeito do que nas espumas da clara F (Figura 36), uma vez que se observa a evolução das espumas para uma estrutura de bolhas cada vez maiores e mais hidratadas o que pode ter contribuído para esse processo de desestabilização devido às diferenças de pressão entre as fases.

Um segundo mecanismo de desestabilização das espumas foi observado pelo desaparecimento de bolhas menores e aumento de tamanho de outras. Para melhor observar esse efeito e como forma ilustrativa da ocorrência desse mecanismo de desestabilização, foi escolhida uma bolha em cada espuma cujo crescimento foi acompanhado durante todo o ensaio. As bolhas acompanhadas são indicadas na Figura 36 por um traço horizontal com o valor da área da esfera em mm^2 e o número 1 seguido das letras a, b, c, d referentes aos tempos de 0, 40, 90 e 120 minutos respectivamente.

Esse processo de crescimento das bolhas está relacionado com a redução das bolhas de diâmetro menor, uma vez a difusão do gás é espontaneamente favorecida pela diferença de pressão. Esse processo de crescimento das bolhas de maior diâmetro é conhecido como *coarsening* que tem a mesma origem do fenômeno da maturação de Ostwald (RIO et al., 2014). Todas as espumas avaliadas apresentaram o fenômeno de *coarsening*, conforme indicado pelo número 1 seguido das letras a, b, c, d (Figura 36), onde é possível observar o crescimento das bolhas com o passar do tempo de medida.

O valor da área calculada em mm^2 , apresenta valores cada vez maiores até o fim da medida em todas espumas, conforme apontado pelo número 1 acompanhado das letras a, b, c, d. Aparentemente, a espuma da clara S foi a mais afetada por este mecanismo de desestabilização, apresentando um número maior de bolhas que se observa aumento de tamanho durante o ensaio, apesar de apenas uma ter sido indicada. Além disso, a distribuição de bolhas nesta espuma apresenta bolhas bem maiores após 120 minutos de medida, quando comparado ao tempo inicial (tempo 0). Dentre a área das bolhas medidas durante os ensaios, a taxa de crescimento foi mais elevada na clara S, mostrando com aumento na área de bolha de 155 % do tempo zero até o tempo de 120 minutos (imagens I - L). As claras F e P apresentaram um crescimento elevado, porém menor do que o observado na clara S, com aumento na

área de 78 % (imagens A – D) e 47 % (imagens E – H), respectivamente.

O processo de *coarsening* ocorre em função da diferença de pressão e da difusão do gás entre as fases. Segundo Rosen e Kunkappu (2012) as bolhas grandes tendem a crescer às custas das bolhas pequenas e esse processo, conforme Daltin (2011), é espontâneo, uma vez reduz a diferença de pressão dentro do sistema coloidal.

Yang e Foegeding (2011) estudando os efeitos da adição de sacarose em espumas de clara de ovo observaram, durante os ensaios de estabilidade das espumas, comportamento similar ao deste estudo. Embora apontando que as alterações globais nas espumas fossem muito complexas os autores observaram que o tamanho da bolha crescia durante o período de observação, uma vez houve aumento na área das bolhas de forma global em todos os tratamentos.

Durante os ensaios, observou-se uma dinâmica nas espumas, ou seja, enquanto algumas bolhas saem do plano focal, outras surgem, mostrando que elas não estavam em um estado estacionário. Devido às diferenças de densidade entre gás e fase contínua as bolhas tendem a se deslocar para a superfície, processo conhecido como *creaming* (YANG; BERRY; FOEGEDING, 2009). Através dos círculos tracejados (Figura 36) apontados pelo número 2 seguido pelas letras a, b, c referentes os tempos 0, 90 e 120 minutos, respectivamente, para todas as claras esse evento pode ser observado. No tempo zero (imagens A, E, I) observa-se uma região com a presença de bolhas variadas. No tempo de 90 minutos (imagens E, G, H), a distribuição das bolhas reduz abrindo espaço para entrada de uma bolha de maior diâmetro no plano focal, sendo sua presença nítida no tempo de 120 minutos (imagens I, K, L). Para a clara F, a difusão da bolha para a superfície parece ocorrer com o rompimento da estrutura das bolhas que estão em volta. Essa destruição pode ser um processo de coalescência observado.

O processo de *creaming* em espumas é influenciado pela diferença de densidade entre as fases, o diâmetro das bolhas e a viscosidade da fase contínua. Segundo Daltin (2011) a taxa de *creaming* é favorecida pelo diâmetro da bolha, ou seja, quanto maior for a bolha mais facilmente ele se movimenta para a superfície do fluido. Desta forma, pode-ser dizer que espumas com bolhas menores são mais estáveis quanto a esse fenômeno. Além disso, quanto maior a diferença nas densidades entre as fases, maior será a força de empuxo nas bolhas, entretanto, se a viscosidade da fase dispersa for elevada, ela pode retardar esse processo pois, quanto maior a viscosidade mais difícil será a fluabilidade da bolha.

Conforme Ritzoulis (2013) devido a menor densidade do ar em relação aos líquidos, as bolhas de espumas alimentares tendem a separar para o topo do líquido, podendo o movimento ser retardado pelo aumento na viscosidade da fase contínua. Conforme Yang, Berry e Foegeding (2009) bolhas com maiores tamanhos possuem uma maior força de flutuabilidade e, portanto, têm maior ascensão dentro da fase contínua, aumentando a taxa de *creaming*.

O mecanismo de desestabilização pelo desaparecimento das bolhas de menor tamanho e *coarsening* de bolhas de maior tamanho está relacionado com os efeitos da maturação de Ostwald, que também foi identificado nesse trabalho. Na maturação de Ostwald, também conhecida como desproporção, ocorre a difusão do gás contido nas bolhas de menor diâmetro para as bolhas vizinhas de maior diâmetro. Isso acontece devido à diferença de pressão entre esferas de raios diferentes (DAMODARAN, 2005; SADAHIRA et al., 2016). A ocorrência do progresso de maturação de Ostwald pode ser vista na Figura 36 através do círculo tracejado indicado com o número 3 seguido da letra “a” para o tempo zero (imagens A, E, I) e pela letra “b” para o tempo de 90 ou 120 minutos (imagens C, H, L).

Todas as espumas foram afetadas pelo processo de maturação de Ostwald, com destaque para as claras P e S, que apresentaram elevada ação desse mecanismo de desestabilização uma vez que em espumas onde há uma variada distribuição de tamanho de bolhas, esse processo pode ser favorecido. No tempo 0, as regiões destacadas com círculo tracejado (3a) das imagens A, E, I das espumas das claras F, P e S, respectivamente, foram escolhidas para apresentar a ação desse mecanismo. Nesse tempo de medida, as regiões das espumas destacadas continham de bolhas de tamanhos variados. Após 90 ou 120 minutos, as mesmas regiões indicadas pelo círculo tracejado (3b) (imagens C, H e L), apresentaram mudanças na estrutura das bolhas mostrando áreas interfaciais unidas, redução no tamanho de bolhas menores e aumento das bolhas no entorno. A difusão do gás entre as bolhas e atmosfera devido a diferença de pressão, auxilia nas mudanças que envolvem a distribuição dos tamanhos das bolhas na espuma inicialmente obtida (FIGUEREDO; RIBEIRO; SABADINI, 1999).

A maturação de Ostwald pode promover o aumento no tamanho das bolhas e favorecer o processo de coalescência, juntamente ao processo de drenagem. A coalescência ocorre devido ao afinamento da lamela, com a consequente ruptura da bolha. Embora se saiba que esse processo ocorra, Yang e Foegeding (2011) afirmam que ele é difícil de ser identificado. Para Daltin (2011) a diferença de pressão é a maior

responsável por provocar a ruptura da bolha. A drenagem também afeta o colapso das espumas, uma vez que esse processo reduz a espessura dos filmes lamelares favorecendo sua ruptura (ROSEN; KUNJAPPU, 2012). Yang e Foegeding (2011) atribuíram a maturação de Ostwald as mudanças nos tamanhos das bolhas observados em espumas de clara de ovo durante os ensaios de estabilidade. Sadahira et al. (2016) estudando os efeitos da interação pectina-proteína da clara do ovo nas propriedades espumantes também atribuem a mudança na distribuição de tamanhos das bolhas a maturação de Ostwald.

Desta forma, a maturação de Ostwald pode acelerar o processo de *creaming*, uma vez que ocorre o aumento no tamanho das bolhas, elas podem mais facilmente se separar da fase contínua devido a mais força motriz para sua flutuabilidade, o que pode acelerar a drenagem. Nas espumas de clara S a maturação de Ostwald foi mais intensa, que pode ter sido favorecido devido a menor viscosidade dessa clara quando comparada as demais. O maior crescimento das bolhas e ascensão das bolhas maiores de uma fase com menor viscosidade, podem ter contribuído tanto com a separação de fases como com o rompimento da estrutura, favorecendo a drenagem dessas espumas. Esses fatores podem ter contribuído com a menor estabilidade observada nessa espuma durante os ensaios de estabilidade (**item 4.2.3**).

Os fenômenos de desestabilização, observados em todas as espumas avaliadas, parecem ocorrer simultaneamente, afetando uns aos outros. A diferença de pressão entre as fases e entre as bolhas de diâmetros diferentes favorecem a difusão do gás no sistema coloidal, favorecendo tanto o movimento das bolhas para superfície causando a separação de fases quanto o processo de maturação de Ostwald. Devido à maturação de Ostwald ocorre a redução e desaparecimento das bolhas de esfera pequena e a expansão das esferas de diâmetro maior (*coarsening*). O *coarsening* das esferas reduz a espessura do filme que favorece o processo de coalescência. A ruptura do filme, em virtude da coalescência, aumenta o processo de drenagem, que tornam as bolhas remanescentes mais poliédricas, causando o aumento da diferença da pressão capilar fazendo com que a fase contínua se desloque para as bordas de *Plateau*, que pode ter favorecido a drenagem por capilaridade.

Diversos eventos de desestabilização foram observados nas espumas produzidas com as diferentes claras. Nas espumas da clara S o efeito da maturação de Ostwald parece ter afetado mais intensamente do que as demais claras. Desta forma, a difusão de gás favoreceu o desaparecimento de bolhas de menor diâmetro e o *coarsening* de bolhas maiores, obtendo no fim do ensaio uma espuma evidentemente com

menor número de bolhas e a presença de bolhas de maior tamanho. Esse efeito pode ter favorecido a drenagem por gravidade, uma vez que durante todo o ensaio a espuma tem a presença de bolhas esféricas mais hidratadas, o que pode ter contribuído para sua menor estabilidade. Além disso, fatores como menor viscosidade, maior tensão superficial e proteínas com estrutura comprometida pelos tratamentos térmicos, podem ter contribuído para a menor estabilidade dessa espuma. Na espuma da clara P, esses efeitos também são intensos, mais a maior espessura das películas proteicas que cobriam as bolhas (observados nas microscopias de *overrun*, **item 4.2.2**) pode ter auxiliado a espuma a manter uma maior estabilidade.

5 CONCLUSÃO

As claras fresca, pasteurizada e desidratada apresentaram pH, umidade e teor de proteínas de acordo com o reportado na literatura. Apresentaram concentrações de açúcares redutores e índice de escurecimento na ordem de $F > P > S$, podendo ser atribuídos à reação de Maillard em decorrência dos processamentos térmicos aos quais as claras P e S foram submetidas.

Todas as claras apresentaram coloração tendendo ao amarelo esverdeado ao qual foi atribuído a presença da riboflavina, que também pode ter sido responsável, juntamente com os produtos da reação de Maillard nas claras P e S, pela ocorrência da auto fluorescência nessas claras.

Todas as claras apresentaram curva de % *overrun* similares, com aumento crescente até atingirem o *overrun* máximo, com posterior decréscimo como consequência do colapso das espumas. A clara fresca apresentou melhor capacidade espumante, menor densidade e maior fração da fase gasosa, quando comparada às demais claras, durante todo o tempo de análise. Esse comportamento foi atribuído ao menor valor de tensão superficial e a maior viscosidade observados nos ensaios com a clara fresca, bem como, devido possivelmente à melhor atividade de superfície das suas proteínas.

Embora apresentando mesmo comportamento de degradação térmica evidenciado nos ensaios de TGA, a possível redução da atividade de superfície das claras pasteurizada e desidratada foi atribuída à perda parcial da estrutura proteica em função dos tratamentos térmicos aos quais foram submetidas durante o processamento, sendo evidenciada através da sobreposição de picos de temperatura de desnaturação e devido a menor entalpia de desnaturação, observados nos ensaios de DSC.

A espuma da clara desidratada apresentou maior % DR e menor tempo de meia vida quando comparadas às demais claras, sendo considerada a espuma com menor estabilidade. Essa menor estabilidade foi associada à estrutura proteica mais prejudicada devido a soma dos tratamentos térmicos, devido a maior hidratação da espuma (mais cremosa), menor viscosidade, maior tensão superficial e provável maior efeito da força de gravidade e maior diferença de pressão entre as fases.

Os ensaios de microscopia óptica de fluorescência evidenciaram a estrutura poliédrica, maior número de bolhas e bolhas de diâmetro menor das espumas da clara fresca, bem como estrutura mais esférica para as demais espumas. As espumas da clara fresca apresentaram maior

presença de filmes lamelares, filme interfacial de menor espessura, bem como, a presença das bordas de *Plateau* em todas as espumas. Essas diferenças foram atribuídas as diferenças na capacidade espumante e na fração da fase gasosa, bem como, da tensão superficial e das possíveis mudanças de solubilidade, difusão e adsorção das proteínas na interface em função do histórico térmico das claras. Os ensaios de microscopia óptica de fluorescência demonstraram ainda que as espumas, quando em repouso, apresentaram um movimento dinâmico de um sistema inicialmente denso de bolhas pequenas para um sistema menos denso de bolhas grandes, especialmente observado nas claras desidratadas, evidenciando os fenômenos de desestabilização de *coarsening*, maturação de Ostwald, *creaming* e coalescência em todas as espumas, sendo mais intensos nas espumas das claras pasteurizada e desidratada. A ocorrência desses fenômenos pode ser atribuído à diferença de densidade entre as fases, diferença de pressão, geometria das bolhas, espessura das lamelas, distribuição de bolhas e viscosidade da fase contínua.

REFERÊNCIAS

- ABBASNEZHAD, B.; HAMDAMI, N.; KHODAEI, D. Modeling of rheological characteristics of liquid egg white and yolk at different pasteurization temperatures. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 9, n. 3, p. 359–368, 2015.
- ABBASNEZHAD, B.; HAMDAMI, N.; SHAHEDI, M.; VATANKHAH, H. Thermophysical and rheological properties of liquid egg white and yolk during thermal pasteurization of intact eggs. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 8, n. 4, p. 259–269, 2014.
- ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; AHN, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents--a review. **Poultry science**, v. 92, p. 3292–9, 2013.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015** 2015. Disponível em: <<http://www.abpa-br.org>>
- ALLAIS, I.; EDOURA-GAENA, R. B.; GROS, J. B.; TRYSTRAM, G. Influence of egg type, pressure and mode of incorporation on density and bubble distribution of a lady finger batter. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 2, p. 198–210, 2006.
- ALLEONI CARRARO, A. C. Albumen Protein and Functional Properties of Gelatoin and Foaming. **Scientia Agricola.**, v. 63, n. 3, p. 291–298, 2006.
- AMARAL, G.; GUIMARÃES, D.; NASCIMENTO, J. C.; CUSTODIO, S. Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **Agroindústria**, v. 43, p. 167–207, 2015.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C; PADMA ISHWARYA, S. **Spray drying techniques for food ingredient encapsulation**. Índia: John Wiley & Sons Ltd, 2015.
- ANTON, M. Chemical composition of eggs. In: HUOPALAHTI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive Egg Compounds**. Springer, p.1-5, 2007.
- ARNTFIEDL, S. D.; MURRAY, E. D. The influence PF processing parameters on food protein functionality I. Differential scanning

calorimetry as an indicator of protein denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, n. 4, p. 289-294, 1981.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists** (method 926.12 and 991.20). 16th ed, Gaithersburg, Maryland, 1996.

AQUINO, J. D. S.; MARIA, R.; FIGUEIREDO, F. DE; QUEIROZ, C. M. DE. Caracterização físico-química e microscópica de ovos desidratados de avestruz 1. v. 2014, p. 468–473, 2014.

ARAÚJO, W. M. C.; MONTEBELLO, N. P.; BOTELHO, R. B. A.; BORGIO, L. A. **Alquimia dos alimentos**. 3 ed. Brasília –DF: Editora Senac, 2015

ARZENI, C.; PÉREZ, O. E.; PILOSOF, A. M. R. Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 308–316, 2012.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2 ed., Brasília, DP: Embrapa, 2012.

AYADI, M. A.; KHEMAKHEM, M.; BELGITH, H.; ATTIA, H. Effect of moderate spray drying conditions on functionality of dried egg white and whole egg. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. E281-E287, 2008.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBER, P. **Food Chemistry**. 4 th ed., Germany:Springer, 2009.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução a química dos alimentos**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 1995.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. **Aprova as Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados**. Brasília: MAPA/SIPA, 1990, 31 p.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Resolução nº 5, de 05 de julho de 1991. **Dispõe sobre o Padrão de Identidade e Qualidade de ovo integral**. Brasília: MAPA/RIISPOA, 1991.

- BRULYANTS, G. WOUTERS, J. MICHAUX, C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. **Current Medical Chemistry**, v. 12, n. 17, p. 2011-2010, 2011.
- BULAJ, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 1, p. 87–92, 2005.
- CAMPBELL, G. M.; MOUGEOT, E. Creation and characterisation of aerated food products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 9, p. 283–296, 1999.
- CAMPBELL, L.; RAIKOS, V.; EUSTON, S. R. Modification of functional properties of egg-white proteins. **Nahrung - Food**, v. 47, n. 6, p. 369–376, 2003.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica combo**. 5. ed., São Paulo: Cengage Learning, p. 87-120, 2011.
- CANFIELD, E.; LIU, K. The Disulfide Bonds of Egg White Lysozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 5, p. 1997–2002, 1965.
- CANFIELD, R. E. The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. **The Journal of Biological Chemistry** v. 228, n. 8, p. 2698–2707, 1963.
- CANTAT, I.; COHEN-ADDAD, S.; ELIAS, F.; GRANER, R. F.; OHLER, H.; PITOIS, O.; ROUYER, F.; SAINT-JALMES, A. **Foams: structure and dynamics**. USA: Oxford University Press, 2013.
- CLARK, S.; JUNG, S.; LAMSAL, B. **Food processing: principles and applications**. 2 th. USA: Wiley Blackwell, 2014.
- COMBS JR, G. F. **The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health**. 3th ed. USA: Elsevier, 2008.
- CORRÊA, P. C.; CESAR, P.; JÚNIOR, A.; STRINGHETA, P. C.; CARDOSO, J. B. Equilíbrio higroscópico e atividade de água para ovo integral em processado “spray dryer”. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 15–22, 2002.
- CROGUENNEC, T.; RENAULT, A.; BEAUFILS, S.; DUBOIS, J. J.; PEZENNEC, S. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 315, n. 2, p. 627–636, 2007.

DALTIN, D. **Tensoativos: Química, Propriedades e Aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, p. 180-244, 2010.

DAMODARAN, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. R54–R66, 2005.

DAMODARAN, S.; ANAND, K.; RAZUMOVSKY, L. Competitive Adsorption of Egg White Proteins at the Air–Water Interface: Direct Evidence for Electrostatic Complex Formation between Lysozyme and Other Egg Proteins at the Interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 872–876, 1998.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, p. 180-244, 2010.

DANSON, M. J.; HOUGH, D. W. Structure, function and stability of enzymes from the archaea. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 307-314, 1998.

DAVIS, J. P.; FOEGEDING, E. A. Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 2, p. 200–210, 2007.

DE JONGH, H. H. J.; KOSTERS, H. A.; KUDRYASHOVA, E.; MEINDERS, M. B. J.; TROFIMOVA, D.; WIERENGA, P. A. Protein Adsorption at Air-Water Interfaces: A Combination of Details. **Biopolymers**, v. 74, n. 1-2, p. 131–135, 2004.

DE SOUZA, P. M.; FERNÁNDEZ, A. Rheological properties and protein quality of UV-C processed liquid egg products. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 1, p. 127–134, 2013.

DESERT, C.; GUÉRIN-DUBIARD, C.; NAU, F.; JAN, G.; VAL, F.; MALLARD, J. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4553–4561, 2001.

DICKINSON, E. Mixed proteinaceous emulsifiers: review of competitive protein adsorption and the relationship to food colloid stabilization. **Food Hydrocolloids**, v. 1, n. 1, p. 3–23, 1986.

DICKINSON, E. Adsorbed protein layers at fluid interfaces:

interactions, structure and surface rheology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 15, n. 2, p. 161–176, 1999.

DONOVAN, J. W.; MAPES, C. J. A differential scanning calorimetric study of conversion of ovalbumin to S-ovalbumin in eggs. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 27, n. 2, p. 197–204, 1976.

DONOVAN, J. W.; MAPES, C. J.; DAVIS, J. G.; GARIBALDI, J. A. A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 1, p. 73–83, 1975.

DUCE, C.; GHEZZI, L.; ONOR, M.; BONADUCE, I.; COLOMBINI, M. P.; TINE', M. R.; BRAMANTI, E. Physico-chemical characterization of protein-pigment interactions in tempera paint reconstructions: Casein/cinnabar and albumin/cinnabar. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 6, p. 2183–2193, 2012.

DURMUS, Z.; BAYKAL, A.; KAVAS, H.; DIREKÇI, M.; TOPRAK, M. S. Ovalbumin mediated synthesis of Mn₃O₄. **Polyhedron**, v. 28, n. 11, p. 2119–2122, 2009.

DUTTA, A.; CHENGARA, A.; NIKOLOV, A. D.; WASAN, D. T.; CHEN, K.; CAMPBELL, B. Destabilization of aerated food products: Effects of Ostwald ripening and gas diffusion. **Journal of Food Engineering**, v. 62, n. 2, p. 177–184, 2004.

ELKORDY, A. A.; FORBES, R. T.; BARRY, B. W. Integrity of crystalline lysozyme exceeds that of a spray-dried form. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 247, n. 1-2, p. 79–90, 2002.

FAO. Food And Agriculture Organization Of The United. **Production of commodity in selected country**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>>. Acesso em: 06 jul. 2015.

FAOSTAT.FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize>> acesso 16/01.

FERREIRA, M.; HOFER, C.; RAEMY, A. A calorimetric study of egg white proteins. **Journal of Thermal Analysis**, v. 48, n. 3, p. 683–690, 1997.

FIGUEIREDO, T. C.; CANÇADO, S. V.; VIEGAS, R. P.; RÊGO, I. O. P.; LARA, L. J. C.; SOUZA, M. R.; BAIÃO, N. C. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, n. 3, p. 712–720, 2011.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. Ciência de espumas - Aplicação na extinção de incêndios. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 126–130, 1999.

FOEGEDING, E. A.; LUCK, P. J.; DAVIS, J. P. Factors determining the physical properties of protein foams. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2-3 SPEC. ISS., p. 284–292, 2006.

FREITAS, L. W.; PAZ, I. C. L. A.; GARCIA, R. G.; CALDARA, F. R.; SENO, L. O.; FELIX, G. A.; LIMA, N. D. S.; FERREIRA, V. M. O. S.; CAVICHIOLO, F. Aspectos qualitativos de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 11, p. 66–72, 2011.

FRONING, G. W. Egg products industry and future perspectives. IN: In: MINE, Y. **Egg Bioscience and biotechnology**. John Willey & Sons, p. 307-326, 2008.

FRONING, G. W.; PETERS, D.; MURIANA, P.; ESKRIDGE, K.; TRAVNICEK, D.; SUMNER, S. S. **International egg pasteurization manual by**. [s.l: s.n.].

GABAL, M. A. Effect of Mg substitution on the magnetic properties of NiCuZn ferrite nanoparticles prepared through a novel method using egg white. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 19, p. 3144–3148, 2009.

GREGORY, J. F. Vitaminas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, p. 180-244, 2010.

GOMES, M. T. M. S.; PELEGRINE, D. H. G. Solubility of egg white proteins: Effect of pH and temperature. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 3, 2012.

HAMMERSHØJ, M.; RASMUSSEN, H. C.; CARSTENS, J. H.; PEDERSEN, H. Dry-pasteurization of egg albumen powder in a fluidized bed. II. Effect on functional properties: gelation and foaming. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 263–274, 2006.

HANDA, A.; KURODA, N. Functional improvements in dried egg white through the Maillard reaction. **Journal of Agricultural and Food**

Chemistry, v. 47, n. 5, p. 1845–1850, 1999.

HIIDENHOVI, J. Ovomucin. In: HUOPALAHTI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive Egg Compounds**. Springer, p.61-66, 2007

HUNTINGTON, J. A.; STEIN, P. E. Structure and properties of ovalbumin. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, n. 1-2, p. 189–198, 2001.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4° ed., 1° ed. digital. São Paulo, 2008. 1020p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE**. p. 14–49, Brasília:IBGE, 2016.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisas de orçamentos familiares 2008-2009: Despesas, rendimentos e condições de vida**. Brasília: IBGE, 2010.

ITOH, T.; MIYAZAKI, J.; SUGAWARA, H.; ADACHI, S. Studies on the Characterization of Ovomucin and Chalaza of the Hen's Egg. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1518–1521, 1987.

KAPOOR, M.; ROY, M. K.; JUNEJA, L. R. Processed egg products: perspective on nutritional values. In: GUERRERO-LEGARRETA, I. **Handbook of poultry science and technology. Volume 2: secondary processing**, John Wiley & Sons, Inc, 2010.

KAROUI, R.; DUFOUR, E.; SCHOONHEYDT, R.; BAERDEMAEKER, J. DE. Characterisation of soft cheese by front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools: Effect of the manufacturing process and sampling zone. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 632–642, 2007.

KAROUI, R.; KEMPS, B.; BAMELIS, F.; DE KETELAERE, B.; MERTEN, K.; SCHOONHEYDT, R.; DECUYPERE, E.; DE BAERDEMAEKER, J. Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of egg freshness: 2 - Evolution of egg yolk. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 2, p. 180–188, 2006.

KATO, I.; SCHRODE, J.; KOHR, W. J.; LASKOWSKI, M. Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. **Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 193–201, 1987.

KATO, Y.; MATSUDA, T.; KATO, N.; NAKAMURA, R. Browning and Protein Polymerization Induced by Amino-Carbonyl Reaction of Ovalbumin with Glucose and Lactose. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 36, n. 1973, p. 806–809, 1988.

KATO, Y.; WATANABE, K.; SATO, Y. Effect of Maillard Reaction on Some Physical-Properties of Ovalbumin. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 6, p. 1835–1839, 1981.

KEMPS, B. J.; BAMELIS, F. R.; MERTENS, K.; DECUYPERE, E. M.; DE BAERDEMAEKER, J. G.; DE KETELAERE, B. The assessment of viscosity measurements on the albumen of consumption eggs as an indicator for freshness. **Poultry Science**, v. 89, n. 12, p. 2699–2703, 2010.

KIOSSEOGLU, J.; PARASKEVOPOULOU, A. Part II. Major Baking Ingredients: Eggs. In: HUI, Y. H. **Baking products: science and technology**. 1th ed., Blackwell Publishing, p. 161-172, 2006.

KO, K. Y.; AHN, D. U. An economic and simple purification procedure for the large-scale production of ovotransferrin from egg white. **Poultry science**, v. 87, n. 7, p. 1441–1450, 2008.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421–8431, 2005.

KRUGLYAKOV, P.; KARAKASHEV, S.; NGUYEN, A.; VILKOVA, N. Foam drainage. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 3, p. 163–170, jun. 2008.

KUMBÁR, V.; TRNKA, J.; NEDOMOVÁ, Š.; BUCHAR, J. On the influence of storage duration on rheological properties of liquid egg products and response of eggs to impact loading – Japanese quail eggs. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 86–94, dez. 2015.

KUROKAWA, H.; DEWAN, J. C.; MIKAMI, B.; SACCHETTINI, J. C.; HIROSE, M. Crystal Structure of Hen Apo-ovotransferrin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 40, p. 28445–28452, 1999.

KUROPATWA, M.; TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Impact of pH on the interactions between whey and egg white proteins as assessed by the foamability of their mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2174–2181, 2009.

LAMEB. Laboratório multiusoário de estudos em biologia, 2017. Disponível em: <lameb.ccb.ufsc.br/microscopio/microscopio-olympus/>. Acesso em: 10 de set. 2016.

LANDFELD, A.; NESVADBA, P.; KÝHOS, K.; NOVOTNÁ, P.; PRŮCHOVÁ, J.; HOUŠKA, M. Sorption and thermal properties of dried egg whites. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 1, p. 59–63, 2008.

LANGEVIN, D. Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 88, n. 1-2, p. 209–222, 2000.

LANGEVIN, D. Aqueous foams and foam films stabilised by surfactants. Gravity-free studies. **C. R. Mecanique**, v. 11, n. 1519, p. 47–55, 2017.

LAU, C. K.; DICKINSON, E. Instability and structural change in an aerated system containing egg albumen and invert sugar. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 111–121, 2005.

LAU, K.; DICKINSON, E. Structural and Rheological Properties of Aerated High Sugar Systems Containing Egg Albumen. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. E232–E239, 2006.

LECHEVALIER, V.; CROGUENNEC, T.; ANTON, M.; NAU, F. Processed egg products. In: . NYS, Y.; BAIN, M.; VAN IMMERSEEL, F. **Improving the safety and quality of eggs and egg products, volume 1: Egg chemistry, production and consumption**. USA: Woodhead Publishing Limited, 2011.

LECHEVALIER, V.; CROGUENNEC, T.; NAU, F.; GUÉRIN-DUBIARD, C. Ovalbumin and Gene-Related Proteins. In: HUOPALAHTI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive Egg Compounds**. Springer, p.51-57, 2007a.

LECHEVALIER, V.; CROGUENNEC, T.; PEZENNEC, S.; GURIN-DUBIARD, C.; PASCO, M.; NAU, F. Evidence for synergy in the denaturation at the air-water interface of ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme in ternary mixture. **Food Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 79–87, 2005.

LECHEVALIER, V.; JEANTET, R.; ARHALIASS, A.; LEGRAND, J.; NAU, F. Egg white drying: Influence of industrial processing steps on protein structure and functionalities. **Journal of Food Engineering**, v.

83, n. 3, p. 404–413, dez. 2007b.

LECHEVALIER, V.; NAU, F.; JEANTET, R. Powdered egg. In: BHANDARI, B.; BANSAL, N.; ZHANG, M.; SCHUCK, P. **Handbook of food powders**, Woodhead Publishing Limited, 2013.

LESNIEROWSKI, G.; KIJOWSKI, J. Lysozyme. In: HUOPALAHTI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive Egg Compounds**. Springer, p.51-57, 2007.

LI-CHAM, E. C. Y.; KIM, H-O. Structure and chemical composition of eggs. In: MINE, Y. **Egg Bioscience and biotechnology**. John Wiley & sons, p. 1-96, 2008.

LOMAKINA, K.; MÍKOVÁ, K. A study of the factors affecting the foaming properties of egg white - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 24, n. 3, p. 110–118, 2006.

LOPÉZ-FANDIÑO, R. Part. II Use of Egg Compounds for Human Nutrition: Nutritional Evaluation of Egg Compounds. In: ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive Egg Compounds**. Springer, p.117-140, 2007.

LOUVET, N.; ROUYER, F.; PITOIS, O. Ripening of a draining foam bubble. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, n. 1, p. 82–86, 2009.

LUCISANO, M.; HIDALGO, A.; COMELLI, E. M.; POMPEI, C. Evolution of Chemical and Physical Yolk Characteristics during the Storage of Shell Eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 95, p. 1447–1452, 1996.

MACHADO, F. F.; COIMBRA, J. S. R.; GARCIA ROJAS, E. E.; MINIM, L. A.; OLIVEIRA, F. C.; SOUSA, R. D. C. S. Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1304–1307, 2007.

MA, C. Y.; HARWALKAR, V. R. Thermal analysis of food proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 35, p. 317-366, 1991.

MAGDASSI, J. **Surface activity of proteins: chemical and physicochemical modifications**. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1996.

MANZOCCO, L.; PANOZZO, A.; NICOLI, M. C. Effect of pulsed light on selected properties of egg white. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 522–527, 2013.

- MARTIN, A.; GROLLE, K.; BOS, M.; STUART, M.; VANVLIET, T. Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 254, n. 1, p. 175–183, 2002.
- MASON, T. G. New fundamental concepts in emulsion rheology [Review]. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 4, n. 3, p. 231–238, 1999.
- MCMURRY, J. **Química orgánica**. 7a. ed. Cengage learning, 2008.
- McREYNOLDS. L.; O'MALLEY, B. W.; NISBET, A. D.; FOTHERGILL, J. E.; GIVOL, D.; FIELDS, S.; ROBERTSON, M.; BROWNLIE, G. G. Sequence of chicken ovalbumin mRNA, **Nature**, v. 273, p. 723-728, 1978.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, 1959.
- MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 7, p. 225–232, 1995.
- MINE, Y. Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2924–2928, 1997.
- MINE, Y. Recent advances in egg protein functionality in the food system. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 1, p. 31–39, 2002.
- MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1088–1094, 2004.
- MINE, Y.; ZHANG, H. Egg components in food systems. In: ESKIN, N. A. M.; SHAHIDI, F. **Biochemistry of foods**. 3th, Springer-Verlag, p. 215-237, 2013.
- MINE, Y. Egg Proteins. In: USTUNOL, Z. **Applied Food Protein Chemistry**, John Wiley & Sons Ltd, p. 459-461, 2015.
- MLEKO, S.; KRISTINSSON, H. G.; LIANG, Y.; GUSTAW, W. Rheological properties of foams generated from egg albumin after pH treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 908–914, 2007.
- NEMETH, C.; HORVATH, K.; DROBECZ, A.; FRIEDRICH, L.;

PASZTOR-HUSZAR, K.; BALLA, C. Calorimetric study of changes induced by preservatives in liquid egg products. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 60, n. 4, p. 347–352, 2010.

NICORESCU, I.; VIAL, C.; TALANSIER, E.; LECHEVALIER, V.; LOISEL, C.; DELLA VALLE, D.; RIAUBLANC, A.; DJELVEH, G.; LEGRAND, J. Comparative effect of thermal treatment on the physicochemical properties of whey and egg white protein foams. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 797–808, 2011.

OFFENGENDEN, M.; FENTABIL, M. A.; WU, J. N-glycosylation of ovomucin from hen egg white. **Glycoconjugate Journal**, v. 28, n. 3-4, p. 113–123, 2011.

OHATA, S. M.; VIOTTO, L. A. Comportamento reológico de constituintes do ovo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 01, p. 10–18, 2011.

OKPALA, C. O. R.; PIGGOTT, J. R.; SCHASCHKE, C. J. Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 61–67, 2010.

OMANA, D. A.; WANG, J.; WU, J. Ovomucin - a glycoprotein with promising potential. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 9, p. 455–463, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. v.2, Porto Alegre: Artmed, 2005.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B. G. Polyphenoloxidase Activity and Color of Blanched and High Hydrostatic Pressure Treated Banana Puree. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 1, p. 42–45, 1999.

PASHLEYR, R. M.; KARAMAN, M. E. **Applied colloid and surface chemistry**. John Wiley: USA, 2004.

PERNELL, C. W.; FOEGEDING, E. A.; LUCK, P. J.; DAVIS, J. P. Properties of whey and egg white protein foams. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 204, n. 1-3, p. 9–21, 2002.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of food proteins**. Woodhead Publishing Limited, p 1-9, 2011.

- PHILLIPS, L. G.; HAQUE, Z.; KINSELLA, J. E. A method of the measurement of foam formation and stability. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 4, p. 1074-1077, 1987.
- PISSINATI, A.; OBA, A.; YAMASHITA, F.; DA SILVA, C. A.; PINHEIRO, J. W.; ROMAN, J. M. M. Qualidade interna de ovos submetidos a diferentes tipos de revestimento e armazenados por 35 dias a 25°C. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 531-540, 2014.
- POOLE, S.; WEST, S. I.; WALTERS, C. L. Protein-Protein Interactions: Their Importance in the Foaming of Heterogeneous Protein Systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**, v. 35, p. 701-711, 1984.
- POWRIE, W.; NAKAI, S. The chemistry of eggs and products. In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg science and technology**. 3th ed., The avi publishing company, Inc, p. 97-140, 1986.
- PTAK, D. Rigid-body oscillations of α -helices: implications for protein thermal stability. **Biophysical Chemistry**, v. 73, n. 1-2, p. 121-127, 1998.
- PTASZEK, P.; KABZIŃSKI, M.; KRUK, J.; KACZMARCZYK, K.; ŻMUDZIŃSKI, D.; LISZKA-SKOCZYLAŚ, M.; MICKOWSKA, B.; ŁUKASIEWICZ, M.; BANASZ, J. The effect of pectins and xanthan gum on physicochemical properties of egg white protein foams. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 129-137, 2015.
- RAIKOS, V.; CAMPBELL, L.; EUSTON, S. R. Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 347-355, 2007.
- RANNOU, C.; TEXIER, F.; MOREAU, M.; COURCOUX, P.; MEYNIER, A.; PROST, C. Odour quality of spray-dried hens' egg powders: The influence of composition, processing and storage conditions. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 905-914, 2013.
- RIISPOA. Regulamento da inspeção. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952**. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro: RIISPOA, 1952
- RIO, E.; DRENCKHAN, W.; SALONEN, A.; LANGEVIN, D. Unusually stable liquid foams. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 74-86, 2014.

RITZOULIS, C. Translated by RHOADES, J. **Introduction to the physical chemistry of foods**. London: CRC Press, 2013.

ROLLER, S.; BOARD, R. G. Naturally occurring antimicrobial systems. In: RUSSELL, N. J.; GOULD, G. W. **Food preservatives**. 2 th ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and interfacial phenomena**. 4th ed., USA: John Wiley & sons, Inc., 2012.

SADAHIRA, M. S.; RODRIGUES, M. I.; AKHTAR, M.; MURRAY, B. S.; NETTO, F. M. Effect of egg white protein-pectin electrostatic interactions in a high sugar content system on foaming and foam rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 1–10, 2016.

SÁDECKÁ, J.; TÓTHOVÁ, J. Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in the Food Classification; a Review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 25, n. 4, p. 159–173, 2007.

SAHIN, S.; SUMNU, S. G. **Physical properties of foods**, Springer, 2006.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, foams, suspensions, and aerosols: microscience and applications**. 2th ed., Germany: Wiley-VCH, 2014.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHAW, D. J. **Introdução a química dos coloides e de superfícies**. Ed. da Universidade de São Paulo, 1975.

SHENGA, E.; SINGH, R. P.; YADAV, A. S. Effect of pasteurization of shell egg on its quality characteristics under ambient storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 4, p. 420–425, 2010.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Maillard reaction products in foods: Implications for human health: Produtos da reação de Maillard em alimentos: Implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 6, p. 895–904, 2011.

SIEBEL, N. F.; BARSOSA, L. N.; GONÇALVES, P. M.; SOUZA-SOARES, A. Qualidade física e química de ovos de codornas alimentadas com dietas modificadas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 58–64, 2005.

SILVA, A. P.; PINTO, A. L.; FREITAS, J. M. S.; PINTO, A. L. na reação de Maillard em diferentes açúcares Effects of relationship time /

temperature and concentration / pH in the Maillard reaction at different sugars. **revista brasileira de agrotecnologia**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2015.

SMITH, M. B.; BACK, JOAN F. Modification of ovalbumin in stored eggs detected by heat denaturation. **Nature**, v. 193, p.878-879, 1962.

SMITH, M. B.; BACK, J. F. Studies on Ovalbumin. Ii. the Formation and Properties of S-Ovalbumin, a More Stable Form of Ovalbumin. **Australian journal of biological sciences**, v. 18, n. 1936, p. 365–377, 1965.

SINGH, J.; SHARMA, H. K.; PREMI, M.; KUMARI, K. Effect of storage conditions of egg on rheological properties of liquid whole egg. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 543–550, 2011.

SONG, H.-P.; KIM, B.; CHOE, J.-H.; JUNG, S.; KIM, K.-S.; KIM, D.-H.; JO, C. Improvement of foaming ability of egg white product by irradiation and its application. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 217–221, 2009.

SPADA, F. P.; GUTIERREZ, É. M. R.; SOUZA, M. C. DE; BRAZACA, S. G. C.; LEMES, D. E. A.; FISCHER, F. S.; COELHO, A. A. D.; SAVINO, V. J. M. Viscosity of egg white from hens of different strains fed with commercial and natural additives. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 1, p. 47–51, 2012.

SRI DEVI KUMARI, T.; KANNAN, R.; PREM KUMAR, T. Synthesis of LiMn₂O₄ from a gelled ovalbumin matrix. **Ceramics International**, v. 35, n. 4, p. 1565–1568, 2009.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology**, 3th ed. Macmillan Education, 1986.

STRIXNER, T.; KULOZIK, U. Egg proteins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of food proteins**. Woodhead Publishing Limited, p. 150–201, 2011.

SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M. G.; BERLUTTI, F.; VALENTI, P. Ovotransferrina. In: HUOPALAHTI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive Egg Compounds**. Springer-Verlag, p. 43–48, 2007.

THAMMASIRIRAK, S.; PONKHAM, P.; PREECHARRAM, S.; KHANCHANUAN, P.; PHONYOTHEE, P.; DADUANG, S.; SRISOMSAP, C.; ARAKI, T.; SVASTI, J. Purification, characterization

and comparison of reptile lysozymes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 209-217, 2006.

TALANSIER, E.; LOISEL, C.; DELLAVALLE, D.; DESRUMAUX, A.; LECHEVALIER, V.; LEGRAND, J. **Optimization of dry heat treatment of egg white in relation to foam and interfacial properties**. Elsevier Ltd, 2009.

UNIPROT. **Ovomucoid**. 2015. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P01005>>. Acesso em: 10 jul. 2015 a.

UNIPROT. **UniProtKB - F1NBL0 (MUC6_CHICK)**. 2015. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/F1NBL0#sequences>>. Acesso em: 16 jul. 2015 b

USDA. *United States Department of Agriculture Agricultural. National Nutrient Database for Standard Reference Release 28*, 2016. Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/113?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=egg+white>>. Acesso em: 06 mai. 2016.

USTUNOL, Z. Amino Acids, Peptides and Proteins. In: USTUNOL, Z. **Applied Food Protein Chemistry**. John Wiley & Sons Ltd, p. 11-22, 2015 b.

USTUNOL, Z. Introduction to Food Proteins. In: USTUNOL, Z. **Applied Food Protein Chemistry**. John Wiley & Sons Ltd, p. 3-4, 2015 a.

VALDERRAMA, J. M. **Caracterización interfacial de proteínas y tensoactivos: Aplicación a dispersiones alimentarias**. 2006. 296 p. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Físicas, Universidad de Granada, Granada, 2006.

VAN DEN BERG, M.; JARA, F. L.; PILOSOF, A. M. R. Performance of egg white and hydroxypropylmethylcellulose mixtures on gelation and foaming. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 282–291, 2015.

VAN DER PLANCKEN, I.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. E. Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: A kinetic study. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 3, p. 316–326, 2006.

VAN DER PLANCKEN, I.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. E. Foaming properties of egg white proteins affected by heat or high pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 4, p. 1410–

1426, 2007.

VANNUCCHIO, H.; SELMA, F. C. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Vitaminas do Complexo B: Tiamina, Riboflavina, Niacina, Piridoxina, Biotina e Ácido Pantotênico.**

Comitê de nutrição, ILSI Brasil: São Paulo, 2009

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology.** 2 th ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2014.

WALSTRA, P. **Principles of foam formation and stability.** In: WILSON, A. J. *Foams: physics, chemistry and structure.* Springer: New York, 1989.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. **Sistemas dispersos: considerações básicas.** In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de alimentos de Fennema.* 4 ed, Porto Alegre: Artmed, 2010.

WATANABE, K.; SHIMOYAMADA, M.; ONIZUKA, T.; AKIYAMA, H.; NIWA, M.; IDO, T.; TSUGE, Y. Amino acid sequence of alpha-subunit in hen egg white ovomucin deduced from cloned cDNA. **DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping**, v. 15, n. 4, p. 251–261, 2004.

WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. New views on foams from protein solutions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, n. 5, p. 365–373, 2010.

WIERENGA, P. A.; MEINDERS, M. B. J.; EGMOND, M. R.; VORAGEN, F. A. G. J.; DE JONGH, H. H. J. Protein Exposed Hydrophobicity Reduces the Kinetic Barrier for Adsorption of Ovalbumin to the Air-Water Interface. **Langmuir**, v. 19, n. 21, p. 8964–8970, 2003.

WILLIAMS, J.; ELLEMAN, T. C.; KINGSTON, I. B.; WILKINS, A. G.; KUHN, K. A. The primary structure of hen ovotransferrin. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 122, n. 2, p. 297–303, 1982.

WILSON, A. J. **Foams: physics, chemistry and structure.** New York, Springer, 1989.

WOOTTON, M.; HONG, T. N.; THI, L. A. N. P. A Study of the Denaturation of Egg White Proteins during Freezing Using Differential Scanning Calorimetry. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1336–1338, 1981.

WU, J.; ACERO-LOPEZ, A. Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 480–487, 2012.

WU, J.; MAJUMDER, K.; GIBBONS, K. Bioactive Proteins and Peptides from Egg Proteins. In: MINE, Y.; LI-CHAN, E., JIANG, B. **Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals**, A John Wiley & Sons, Inc., p. 247-264, 2010.

XIONG, Y. L. Dairy Proteins. In: TARTÉ, R. **Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications**. Springer, p. 131-144, 2008.

YANG, X.; BERRY, T. K.; FOEGEDING, E. A. Foams prepared from whey protein isolate and egg white protein: 1. Physical, microstructural, and interfacial properties. **Journal of food science**, v. 74, n. 5, p. E259–68, 2009.

YANG, X.; FOEGEDING, E. A. Effects of sucrose on egg white protein and whey protein isolate foams: Factors determining properties of wet and dry foams (cakes). **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 2-3, p. 227–238, 2010.

YANG, X.; FOEGEDING, E. A. The stability and physical properties of egg white and whey protein foams explained based on microstructure and interfacial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p. 1687–1701, 2011.

YE, A. Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 110, p. 946-952, 2008.

ŻMUDZIŃSKI, D.; PTASZEK, P.; KRUK, J.; KACZMARCZYK, K.; ROŻNOWSKI, W.; BERSKI, W.; PTASZEK, A.; GRZESIK, M. The role of hydrocolloids in mechanical properties of fresh foams based on egg white proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 121, p. 128–134, 2014.