



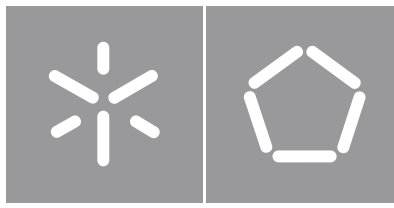
**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Joana Cerqueira Soares

**Desenvolvimento de novos produtos alimentares saudáveis e de novos produtos com proteínas alternativas**

Realização de uma bebida tipo iogurte líquido, *plant-based*, com recurso a proteínas alternativas





**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Joana Cerqueira Soares

**Desenvolvimento de novos produtos alimentares saudáveis e de novos produtos com proteínas alternativas**

Realização de uma bebida tipo iogurte líquido, *plant-based*, com recurso a proteínas alternativas

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Engenharia Química e Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação do

**Professor Doutor José António Teixeira (Universidade do Minho)**

Com a supervisão da

**Ana Silva Machado (MC)**

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

### ***Licença concedida aos utilizadores deste trabalho***



#### **Atribuição**

#### **CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## Agradecimentos

“*Estes anos são viagem*”, “*Todo o destino é partir*”. Assim começa e termina o Hino da Academia.

Após cinco anos vividos com intensidade, chegou a hora de partir, mas nunca é demais agradecer à casa que me acolheu, ensinou e ajudou a traçar esta jornada. Um enorme obrigada à Universidade do Minho, *muynobre* Academia.

Aos Professores do Departamento de Engenharia Biológica, que sempre se mostraram disponíveis e atentos, em especial à Professora Teresa Tavares e à Professora Lígia Rodrigues, a quem sempre considerei um exemplo a seguir, a todos Vós, um muitíssimo obrigado.

Ao Professor Doutor José António Teixeira, que, no papel de meu orientador de dissertação, me deu a oportunidade de realizar o estágio numa empresa como a MC, demonstrando sempre disponibilidade e capacidade de compreensão, deixo um agradecimento especial.

Eu e a Ana Silva, da MC, viemos a descobrir que foi num discurso dado por ela, em 2018, que eu ganhei o gosto pela área alimentar. Um obrigada não chega Ana! Por todo o apoio que me deu, mesmo após o fim do estágio.

À Daniela Correia, colega de equipa na MC, quero agradecer por todas as horas (a mais) que passou comigo a ajudar-me sempre que podia, quer no desenvolvimento do meu trabalho ou a ouvir os meus desabafos.

Queria agradecer também à Professora Cristina Vicente, que me deu todas as ferramentas para eu conquistar os laboratórios. Sem ela, o produto final não chegaria onde chegou. Obrigada!

A todos os meus companheiros de equipa na MC, que me fizeram sentir parte dela, e a todas as pessoas que me ajudaram no LIP, obrigada!

Aos meus pais, irmão e madrinha, que sempre me ajudaram a ultrapassar os meus medos, e estiveram comigo nos momentos bons e nos menos bons, ao longo deste caminho. Devo-vos tudo! A toda a minha família, muito obrigada por todo o apoio!

Aos amigos de sempre, um enorme obrigada e aos amigos que fiz, o que vos posso dizer é: o que Biológica uniu, nada separa.

Obrigada a todos!

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

O desejo dos consumidores por dietas mais saudáveis e sustentáveis bem como a procura de novas alternativas à alimentação de base animal tem vindo a aumentar. Devido a esta demanda, surgiu este projeto, com a empresa MC, *holding* de retalho alimentar do Grupo SONAE, em conjunto com a Universidade do Minho. Assim, o principal objetivo do estágio curricular realizado foi a introdução de um novo produto alimentar com recurso a proteínas alternativas.

Ao longo do estágio, nos escritórios da MC, foi discutido o tipo de produtos de interesse à empresa, procedendo-se a uma pesquisa e resumo do que poderia ser utilizado de *Novel Foods*, definindo-se, por fim, a realização de uma bebida tipo iogurte líquido, BTIL, 100 % *plant-based*, saudável, com recurso a proteínas e fontes de açúcar alternativas.

Após uma revisão detalhada à literatura, partiu-se para o desenvolvimento e formulação do produto desejado com recurso a concentrados proteicos *novel* e não *novel*: concentrado proteína de ervilha, concentrado de proteína de tremçoço, farinha de fava e *Aspergillus oryzae* como fonte de proteína.

Foram desenvolvidas 13 amostras, às quais se realizaram várias análises: medição do pH, da acidez titulável, da viscosidade, da sinérese e da cor, sendo que, as amostras mais promissoras, foram analisadas por um painel sensorial não treinado.

Das amostras avaliadas sensorialmente, a amostra com concentrado de proteína de tremçoço (amostra 10) e de farinha de fava (amostra 11), ambas com adição de amido como espessante e canela, de forma a disfarçar o sabor característico dos concentrados proteicos utilizados, já se encontravam com a textura pretendida e um sabor e aroma bastante aceitáveis, demonstrando, por isso, uma avaliação positiva por parte do consumidor.

Claro está que, apesar do sucesso das BTIL, a presente dissertação refere-se a testes preliminares, sendo necessárias mais fases na análise, incluindo na etapa de formulação.

Em suma, pode-se considerar que todo o projeto de estágio correu conforme o esperado, sendo que foi possível trabalhar nas várias vertentes oferecidas pelo curso, quer a nível teórico, quer a nível laboratorial.

Palavras-chave: análises químicas, físicas e sensoriais; bebida tipo iogurte; *Novel Foods*, *plant-based*, proteínas alternativas.

## Abstract

Consumers' desire for healthier and sustainable diets and the demand for new alternatives to animal-based food has been increasing. This surge on demand lead to the creation of this project, together with MC, part of the SONAE group, and the University of Minho. Thus, the main objective of the curricular internship was the introduction of a new food product using alternative proteins.

During the internship, at the MC offices, the type of products of interest of the company was discussed, which lead to researching what could be used from Novel Foods, defining the realization of a yogurt-like drink, BTIL, 100 % plant-based, healthy, using alternative proteins and alternative sources of sugar.

After a detailed review of the literature, we started to develop and formulate the desired product using novel and non-novel protein concentrates: pea protein concentrate, lupine protein concentrate, fava bean flour and *Aspergillus oryzae* as a protein source.

Thirteen samples were developed, to which several analyzes were performed: measurement of pH, titratable acidity, viscosity, syneresis and color, and the most promising samples were analyzed by a sensory panel.

Of the evaluated samples, the one with lupine protein concentrate (sample 10) and fava bean flour (sample 11) had the desired texture and a very acceptable flavor and aroma, being the ones favored by the focus group. Both solutions needed the addition of starch as a thickener and cinnamon to mask the characteristic flavor of the protein concentrates used.

Of course, despite the success of BTILs, this dissertation refers to preliminary tests, requiring more phases in the analysis, including in the formulation stage.

In summary it can be considered that the entire time of the internship went as expected, and it was possible to work on the various aspects offered by the Chemical and Biological Engineering, both at a theoretical and laboratory level.

Keywords: alternative proteins; chemical, physical, and sensory analyses; Novel Foods; plant-based; yogurt-like drink.



# Índice

Resumo .....	v
Abstract.....	vi
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas.....	xiv
Notação e Glossário .....	xvi
1. Introdução .....	1
1.1. Descrição do Problema .....	1
1.2. Objetivos do Projeto .....	1
1.3. O estágio curricular e as respetivas tarefas.....	1
1.3.1. A MC como empresa modelo .....	1
1.3.1.1. História.....	2
1.3.1.2. Os valores da MC.....	3
1.3.2. O Centro de Engenharia Biológica como núcleo da investigação .....	5
1.4. Tarefas realizadas no estágio .....	6
1.4.1. Tarefas e Entregáveis.....	7
1.4.2. Calendarização .....	8
1.5. Organização da Tese.....	8
2. Estado-da-Arte .....	10
2.1. <i>Novel Foods</i> .....	10
2.1.1 Regulamentação existente para <i>Novel Foods</i> .....	10
2.1.2 Regulamentação existente para Edulcorantes .....	13
2.2. Proteínas alternativas.....	14
2.2.1. Tipos de proteínas emergentes.....	16
2.2.1.1. Proteínas Vegetais .....	16

2.2.1.2. Proteínas de Insetos .....	17
2.2.1.3. Proteína microbiana.....	18
2.2.1.4. Proteína de algas .....	18
2.2.1.5. Proteína de fermentação de precisão .....	19
2.3. Açúcares alternativos .....	20
2.3.1 Alternativas Diretas .....	21
2.3.2 O recetor de sabor doce heterodimérico .....	22
2.3.3 Diferenças de Ação dos Açúcares.....	23
2.3.3.1 Moduladores.....	23
2.3.3.2 Intensificadores .....	23
2.3.3.3 Bloqueadores .....	23
2.4. Fermentado de leite: o iogurte.....	24
2.5. As bactérias láticas .....	25
2.5.1. Fermentação Láctica .....	27
2.6. A dieta <i>plant-based</i> .....	29
2.6.1. Sobremesa <i>plant-based</i> tipo iogurte.....	29
2.7. Análises físico-químicas .....	30
2.7.1. pH e Acidez Titulável.....	30
2.7.2. Viscosidade .....	31
2.7.3. Sinérese .....	31
2.7.4. O Sistema CIELab.....	32
2.8. Análise Sensorial .....	34
3. Pesquisa e Planeamento para formulação do produto alimentar .....	37
3.1 Processamento genérico de uma sobremesa <i>plant-based</i> tipo iogurte .....	37
3.2. Como substituir o leite de vaca nas BTIL .....	39

3.3. Escolha das Proteínas.....	40
4. Materiais e Métodos para produção de uma BTIL <i>plant-based</i> .....	42
4.1. Materiais utilizados .....	42
4.2. Metodologia.....	43
4.2.1. Análise à solubilidade da proteína através do peso seco .....	44
4.2.2. Formulação de iogurtes convencionais e sobremesas vegetais.....	45
4.2.2.1. Preparação da amostra 1.....	45
4.2.2.2. Preparação da amostra 2.....	45
4.2.2.3. Preparação da amostra 3.....	45
4.2.3. Formulação e pré-tratamento do líquido base das BTIL.....	46
4.2.3.1. Preparação da amostra 4.....	46
4.2.3.2. Preparação da amostra 5.....	46
4.2.3.3. Preparação da amostra 6.....	47
4.2.3.4. Preparação da amostra 7.....	47
4.2.3.5. Preparação da amostra 8.....	48
4.2.3.6. Preparação da amostra 9.....	48
4.2.3.7. Preparação da amostra 10 e 11.....	48
4.2.3.8. Preparação do concentrado de proteína para as amostras 12 e 13.....	49
4.2.3.9. Preparação da amostra 12.....	49
4.2.3.10. Preparação da amostra 13.....	49
4.2.4. Fermentação .....	51
4.2.5. Medição da acidez titulável .....	52
4.2.6. Medição da viscosidade .....	52
4.2.7. Análise à cor da bebida tipo iogurte líquido.....	53
4.2.8. Determinação da percentagem de sinérese .....	54

5. Resultados e Discussão .....	55
5.1. Apresentação e discussão dos resultados obtidos.....	56
5.1.1. Solubilização da proteína de ervilha e proteína fúngica.....	56
5.1.2. Medição do pH e da Acidez Titulável .....	57
5.1.3. Viscosidade .....	60
5.1.4. A cor da BTIL.....	61
5.1.5. Sinérese .....	63
5.1.6. Avaliação sensorial .....	66
6. Conclusões.....	73
6.1. Sugestão de trabalho futuro .....	74
Referências Bibliográficas.....	75
Anexos.....	85
Anexo A – Mapeamento <i>Novel Foods</i> .....	85
Anexo B – Tabelas e gráficos auxiliares .....	89
Anexo C – Exemplos de cálculo .....	95
Anexo D – Fotografias tiradas às formulações experimentadas.....	100
Anexo E – Ficha de Análise Sensorial .....	109
Anexo F – Excel utilizado para os cálculos realizados .....	111

## Índice de Figuras

Figura 1. Escritório da MC, em Matosinhos. ....	3
Figura 2. Eixos Estratégicos da MC. Adaptado de: (MC, 2022a). ....	4
Figura 3. Centro de Engenharia Biológica. ....	5
Figura 4. Cronograma do projeto de dissertação. ....	8
Figura 5. Exemplos de fontes de proteínas alternativas: (a) vegetal, (b) insetos, (c) microbiana, (d) algas e (e) fermentação de precisão. ....	14
Figura 6. Esquema sucinto do processamento do leite. Adaptado de: (Portelinha et al., 2013). ....	25
Figura 7. a) <i>Streptococcus thermophilus</i> ; b) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . Fonte: (Narvhus & Abrahamsen, 2022). ....	26
Figura 8. Fermentação homolática. Adaptado de: (Nobre, 2020). ....	27
Figura 9. Ácido Láctico, C <sub>3</sub> O <sub>3</sub> H <sub>6</sub> . Adaptado de: (Wikipédia, 2017). ....	28
Figura 10. O diagrama de espaço de cores CIELAB. Adaptado de: (Ly et al., 2020). ....	33
Figura 11. Exemplos de análises sensoriais associadas aos modelos afetivos e analíticos. Adaptado de: (Rodrigues, 2021). ....	34
Figura 12. Escala Categoria. Adaptado de: (Rodrigues, 2021). ....	36
Figura 13. Processo de produção genérico de uma sobremesa tipo iogurte <i>plant-based</i> . Adaptado de: (Montemurro et al., 2021). ....	38
Figura 14. Sistema utilizado na filtração a vácuo. ....	42
Figura 15. Laboratório utilizado na parte laboratorial - LIP. ....	43
Figura 16. Ensaio realizado em agitação, à temperatura ambiente (a) e a 50 °C (b). ....	44
Figura 17. Ângulo e inclinação do viscosímetro ajustados. ....	52
Figura 18. <i>Spindles</i> disponíveis no LIP, do R7 ao R2, da esquerda para a direita, respetivamente. ....	53
Figura 19. Colorímetro calibrado e respetiva caixa branca. ....	53
Figura 20. Viscosidade das amostras 6 a 13. ....	60

Figura 21. Resposta dos consumidores à pergunta 1 (Resposta à P1), 2 (Resposta à P2) e 3 (Resposta à P3) da Ficha de Análise Sensorial.....	67
Figura 22. Resposta dos consumidores à pergunta 4 da Ficha de Análise Sensorial. ....	68
Figura 23. Resposta dos consumidores às perguntas 5 (experiência global), 7 (sabor) e 8 (aroma). .....	68
Figura 24. Resposta dos consumidores às perguntas 6.1, 6.2 e 6.3 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 948.....	69
Figura 25. Resposta dos consumidores às perguntas 6.1, 6.2 e 6.3 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 464.....	70
Figura 26. Resposta dos consumidores à pergunta 9 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 948. .....	71
Figura 27. Resposta dos consumidores à pergunta 9 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 464. .....	72
Figura A. 1. Exemplo de uma parte do mapeamento geral dos alimentos contidos na Lista da União.....	85
Figura A. 2. Exemplo de uma parte da folha Excel com os produtos mais saudáveis.....	86
Figura A. 3. Exemplo de uma parte da folha Excel com os produtos <i>Clean Label</i> . ....	87
Figura A. 4. Exemplo de uma parte da folha Excel com as proteínas alternativas. ....	88
Figura D. 1. Amostra 1.....	100
Figura D. 2. Amostra 2.....	100
Figura D. 3. Amostra 3.....	101
Figura D. 4. Amostra 4.....	101
Figura D. 5. Amostra 5.....	102
Figura D. 6. Amostra 6.....	103
Figura D. 7. Amostra 7.....	104

Figura D. 8. Amostra 8.....	104
Figura D. 9. Amostra 9.....	104
Figura D. 10. Amostra 10.....	104
Figura D. 11. Amostra 11.....	105
Figura D. 12. Amostra 12.....	105
Figura D. 13. Amostra 13.....	105
Figura D. 14. Bebida e sobremesa de soja utilizados na amostra 5.....	106
Figura D. 15. Sistema utilizado na acidez titulável.....	106
Figura D. 16. Ponto de viragem de fenolftaleína.....	107
Figura D. 17. Centrífuga (a)) e tubo falcon de 13 mL (b))......	107
Figura D. 18. Caixa dos filtros utilizados na filtração a vácuo.....	108
Figura D. 19. Cadinhos, após uma hora de secagem, da proteína fúngica.....	108
Figura E. 1. Página 1 da Ficha de Análise Sensorial realizada.....	109
Figura E. 2. Página 2 da Ficha de Análise Sensorial realizada.....	110

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Concentrados proteicos utilizados nas formulações .....	40
Tabela 2. Tipo e marca de material necessários para as tarefas experimentais .....	43
Tabela 3. Ingredientes utilizados nas amostras 1, 2 e 3.....	46
Tabela 4. Ingredientes utilizados nas amostras 4 a 13.....	50
Tabela 5. Quantidade e fonte de cultura starter utilizada para cada amostra .....	51
Tabela 6. Percentagem de concentrado proteico de ervilha solubilizado .....	56
Tabela 7. Percentagem de concentrado proteico fúngico solubilizado.....	57
Tabela 8. pH antes e depois de incubar, percentagem de ácido láctico e acidez titulável em graus <i>Dornic</i> .....	58
Tabela 9. Valores do espaço de cor das diferentes amostras.....	61
Tabela 10. Percentagem de sinérese a 1000 rpm e a 5000 rpm das amostras 6 a 13 e da amostra de comparação.....	63
Tabela 11. Percentagem de sinérese de acordo com o tipo de espessante e de proteína utilizado .....	64
Tabela 12. Código utilizado para cada amostra à qual foi realizada a análise sensorial.....	66
Tabela B. 1. pH antes e depois de incubar, bem como a percentagem de ácido láctico e a acidez titulável para as amostras 1, 2 e 3 .....	89
Tabela B. 2. Viscosidade das amostras 1, 2 e 3 .....	89
Tabela B. 3. Cor das amostras 1, 2 e 3.....	90
Tabela B. 4. Sinérese das amostras 1, 2 e 3 .....	90
Tabela B. 5. Viscosidade apresentada pelo viscosímetro das amostras 6 a 13 .....	91
Tabela B. 6. Resposta às perguntas 1, 2 e 3 .....	91
Tabela B. 7. Resposta à pergunta 4.....	92
Tabela B. 8. Resposta às perguntas 5, 7 e 8 .....	92



Tabela B. 9. Resposta às perguntas 6.1 e 6.3 das amostras 234, 590, 344 e 845 .....	93
Tabela B. 10. Resposta às perguntas 6.1, 6.2 e 6.3 para as amostras 948 e 464 .....	93
Tabela B. 11. Resposta à pergunta 9.....	94

## Notação e Glossário

### Lista de abreviaturas

C	Concentração
° C	Grau Celsius
° D	Grau Dornic
g	Gramma
m	Massa
mL	Mililitro
MM	Massa Molar
M	Molaridade
mol	Mole
n	Número de mol
P	Poise
V	Volume

### Siglas e Acrónimos

AA	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AT	Acidez titulável
ATP	Adenosina Trifosfato
BAP	Peptídeos bioativos
BTIL	Bebida tipo logurte Líquido
CEB	Centro de Engenharia Biológica
CGS	Sistema centímetro–grama–segundo
CIE	<i>International Commission on Illumination</i>

CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
FP	Fermentação de Precisão
GPCR	Recetores acoplados à proteína G
I&D	Investigação e Desenvolvimento
JAR	Escala <i>Just About Right</i>
LCS	Adoçante de baixa caloria
LDB	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
LIP	Laboratório de Indústria e Processos
MC	Modelo Continente
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina nos seus dois estados de oxidação
NADH	
NaOH	Hidróxido de sódio
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	<i>Plant-based</i>
PS	Percentagem de sinérese
QDA	<i>Qualitative Data Analysis</i>
Radiação UV	Radiação ultravioleta
RGB	Representação Vermelha, Verde e Azul
SA	Álcoois de açúcar
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i>
UE	União Europeia
UHT	<i>Ultra high temperature</i>

# **1. Introdução**

## **1.1. Descrição do Problema**

Atualmente, existe uma enorme corrida à procura de novas alternativas alimentares mais saudáveis e substitutos à alimentação de base animal.

Surgiu o presente projeto, com o objetivo de responder às necessidades de mercado e às políticas de sustentabilidade, tendo como base o desenvolvimento de novos produtos alimentares saudáveis e sustentáveis.

## **1.2. Objetivos do Projeto**

Os objetivos da presente dissertação focam-se no estudo detalhado da Lista da União sobre *Novel Foods* e no desenvolvimento nacional de um produto com características inovadoras, que contribua para uma nutrição mais segura, saudável, personalizada, conveniente e sustentável.

Espera-se a criação de um alimento que encontre todas estas características: saudável, sustentável (desde a sua produção, ao seu embalamento) e natural.

Pretende-se assim uma bebida tipo iogurte líquido, BTIL, com propriedades alternativas à fonte animal (proteínas alternativas à caseína do leite) e às fontes sintéticas de açúcar, procurando sempre a melhor alternativa para o consumidor.

## **1.3. O estágio curricular e as respetivas tarefas**

### 1.3.1. A MC como empresa modelo

O projeto de estágio curricular decorreu na empresa MC, líder, em Portugal, no retalho alimentar, com um conjunto de marcas reconhecidas.

A MC é parte integrante do grupo SONAE.

#### 1.3.1.1. História

Diversificando o negócio, em 1985, a SONAE abriu a primeira loja Continente, em Matosinhos, sendo este, o primeiro hipermercado em Portugal. Deu-se assim início à atividade que é hoje intitulada por MC (MC, 2022b).

Com o passar dos anos, entre 1989 e 2001, foram introduzidas, a nível nacional, lojas de tamanho médio com a insígnia de Modelo, supermercados de proximidades conhecidos como Continente Bom-dia e ocorreu também a criação da loja Continente Online (MC, 2022b).

A partir de 2005, houve uma extensão da oferta de retalho especializado, abrindo parafarmácias intituladas de “área saúde”, conhecidas hoje como *Well's* e também uma rede de cafetarias – Bagga (MC, 2022b).

Em 2006 criou-se o cartão de fidelização conhecido como “Cartão Continente” e após um ano, ocorreu o lançamento das lojas Note!, conhecidas pelos produtos de papelaria e livraria (MC, 2022b).

Mais tarde, entre 2011 e 2014, foram introduzidas as lojas de proximidade franquizadas Meu Super e abriu também a primeira loja de produtos e serviços para animais de estimação (ZU) (MC, 2022b).

Já em 2016, abriu o primeiro supermercado Biológico, a *Go Natural* e em 2017 a clínica Dr. *Wells*, com especialização em medicina dentária e estética (MC, 2022b).

A nível internacional, em 2019, a MC adquiriu 60 % de participação numa empresa espanhola, a Arenal e, em 2021, inaugurou a primeira loja sem caixas, a loja Continente Labs (MC, 2022b).

Hoje, a MC conta com 4 milhões de famílias clientes, mais de 1300 lojas espalhadas pela Península Ibérica e mais de 35000 colaboradores (MC & Lima, 2022).

O escritório em Matosinhos, onde se realizou a parte teórica da presente dissertação, encontra-se na Figura 1.



**Figura 1.** Escritório da MC, em Matosinhos.

#### 1.3.1.2. Os valores da MC

O principal foco da MC é o consumidor e as suas necessidades. Por este motivo foram definidos valores corporativos para responderem a esse compromisso. A Confiança e Integridade; o Investimento nos Colaboradores, no desenvolvimento das suas capacidades e na garantia de um bom ambiente de trabalho; a Ambição, ao estabelecer sempre novas metas; a Inovação, para responder à melhoria e crescimento da empresa; a Responsabilidade Corporativa, para responder às preocupações ambientais e políticas para um desenvolvimento sustentável; a Frugalidade e Eficiência, que apostam na otimização dos processos e utilização de recursos e a Cooperação e Independência, que asseguram, assim, as melhores soluções para as comunidades (MC, 2022c).

Foram definidos eixos estratégicos, assentes nos pilares do seu crescimento e liderança, tendo sempre em consideração a valorização de todos os *stakeholders* (MC, 2022a). Estes encontram-se apresentados na Figura 2.

	<p><b>Potenciar a apreciação dos clientes:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Melhorar a perceção de valor pelo Cliente;</li><li>• Robustecer a oferta de produtos frescos;</li><li>• Transformar a oferta de marca própria;</li><li>• Alargar a gama de nutrição saudável.</li></ul>
	<p><b>Assegurar um perfil de eficiência exemplar:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Aumentar a agilidade e eficiência do modelo operativo;</li><li>• Otimizar o parque de lojas com foco na produtividade das vendas.</li></ul>
	<p><b>Desenvolver importantes avenidas de crescimento:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Focar a expansão de lojas no segmento de proximidade e conveniência;</li><li>• Potenciar oportunidades no digital e no negócio de <i>e-commerce</i>;</li><li>• Desenvolver o negócio da Saúde, Bem-estar e Beleza.</li></ul>
	<p><b>Criar valor sustentável para todos os <i>stakeholders</i>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Contribuir para a redução da pegada ecológica em benefício do Ambiente;</li><li>• Promover escolhas conscientes e uma relação próxima com a Comunidade;</li><li>• Fomentar o bem-estar, inclusão e desenvolvimento das Pessoas na MC.</li></ul>

**Figura 2.** Eixos Estratégicos da MC. Adaptado de: (MC, 2022a).

### 1.3.2. O Centro de Engenharia Biológica como núcleo da investigação

Localizado no campus de Gualtar da Universidade do Minho, o Centro de Engenharia Biológica (CEB) (Figura 3), é um centro de investigação cuja pesquisa central é focada em quatro áreas que alocam as escalas molecular, celular e de processo. Essas áreas são a Biotecnologia Industrial e Bioengenharia, a Biotecnologia de Alimentos, a Biotecnologia Ambiental e Bioengenharia e a Biotecnologia em Saúde e Bioengenharia. Avaliado pelas unidades de I&D da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), obteve, em 2014, a classificação de Excelente, mantendo essa classificação desde 2002 (Centro de Engenharia Biológica, 2022).



**Figura 3.** Centro de Engenharia Biológica.

Para além dos distintos artigos e teses de doutoramento publicados, foram também conseguidas 15 publicações de patentes e lançadas mais de 14 empresas *spin-off* e *start-ups*, graças ao reconhecido trabalho dos investigadores do CEB, em consolidação com projetos de investigação e desenvolvimento (Centro de Engenharia Biológica, 2022).

A nível internacional, o CEB estabeleceu um conjunto de parcerias, que levaram a projetos de pesquisa com diversas entidades reconhecidas mundialmente, intercâmbios de estudantes e cientistas, etc. O CEB acolhe investigadores de 45 diferentes nacionalidades, mostrando assim o seu reconhecimento internacional (Centro de Engenharia Biológica, 2022).



## 1.4. Tarefas realizadas no estágio

O estágio curricular teve início no dia 14 de fevereiro de 2022.

Iniciou-se com a recolha de informação referente à legislação europeia sobre *Novel Foods*. Procedeu-se, em seguida, à realização de uma análise detalhada a todo o Regulamento de Execução (EU) 2017/2470 da Comissão de 20 de dezembro de 2017 que estabelece a Lista da União de novos alimentos em conformidade com o Regulamento (EU) 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo a novos alimentos e às suas respetivas atualizações. Parte dessa análise pode ser verificada no Anexo A.

A análise consistiu na procura de informação sobre cada alimento presente na Lista e na sua divisão por grupos de interesse ao projeto: produtos mais saudáveis, *clean label* e proteínas alternativas.

De seguida, com a ajuda das Equipas de Inovação de Produto, *Granted Projects* e responsáveis comerciais pela categoria de laticínios da MC, foi efetuado um *brainstorm*, para que se pudesse estabelecer um produto final de modo que este fosse, posteriormente, produzido em laboratório, tornando assim o projeto de estágio mais rico nas duas principais áreas de formação do curso.

Após o apuramento das ideias obtidas, foi definida, em conjunto com os Professores José Teixeira e Cristina Vicente da Universidade do Minho, a produção de uma bebida tipo iogurte líquido, *plant-based*, com recurso a proteínas alternativas.

Logo após a definição final do plano de trabalhos laboratorial, foi formulado e produzido o protótipo final, cujo processo está descrito nas secções 4 e 5 da presente dissertação.

### 1.4.1. Tarefas e Entregáveis

Inicialmente, foram projetadas 8 tarefas, 3 *milestones* e 3 *deliverables*.

As oito tarefas referidas foram essenciais para o desenvolvimento de todo o trabalho da presente dissertação, desde que se iniciou a sua escrita, em janeiro de 2022.

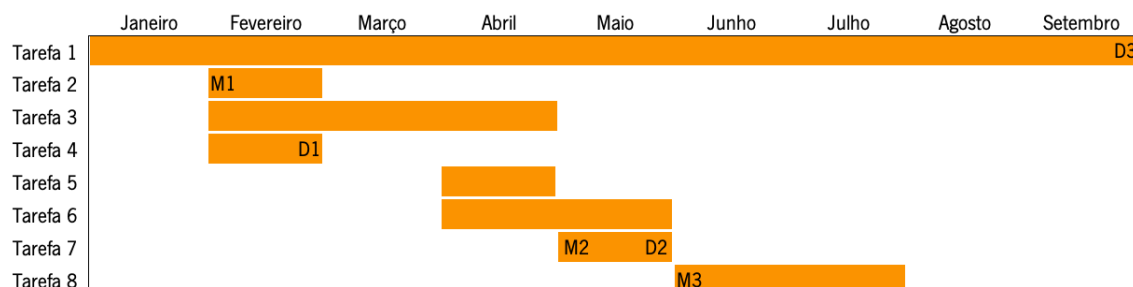
A primeira tarefa teve como base o início da escrita da dissertação; a segunda e terceira, foram o levantamento da legislação sobre *Novel Foods*, bem como as categorias a trabalhar, respetivamente. A Tarefa 4 consistiu no levantamento de *Novel Foods* aprovados que se enquadram na substituição de aditivos, gordura, sal, açúcar ou como fonte de enriquecimento nutricional, seguindo-se pela Tarefa 5, que se tratou de uma análise às dificuldades encontradas e, de que forma alguns dos *Novel Foods* estudados podem contribuir para as mesmas. A Tarefa 6 tratou-se de uma segunda análise às dificuldades que se mantiveram, e quais as suas alternativas, procurando mais bibliografia que suportasse essa informação. A sétima tarefa foram as discussões para definição de qual a categoria/produto a trabalhar em laboratório e quais as soluções a testar, e por fim, a Tarefa 8, consistiu no trabalho realizado em laboratório.

No que toca aos *milestones*, o primeiro refere-se ao início da recolha de informação sobre *Novel Foods* a nível legislativo, bem como a sua organização em subtemas. O segundo *milestone* trata-se do começo da procura de informação para as Bebidas Tipo logurte Líquido e o *milestone* 3, o início da atividade laboratorial.

Estes *milestones* resultaram no *deliverable* 1, que se refere ao mapeamento da Lista da União, bem como a sua divisão em categorias, o *deliverable* 2 que foi a realização de um relatório com toda a informação teórica recolhida, e do estudo-da-arte do possível produto final, metodologias já existentes, ingredientes, etc. E por fim, o *deliverable* 3, que é a entrega da presente dissertação.

## 1.4.2. Calendarização

A calendarização proposta encontra-se na Figura 4. Nela, está incluída a duração das oito tarefas e onde se encontra cada *milestone* e *deliverable* propostos e referidos na secção acima.



**Figura 4.** Cronograma do projeto de dissertação.

A Figura representa um Diagrama de *Gantt* realizado através da ferramenta Excel para o projeto de Dissertação.

Este diagrama é muito utilizado na gestão de atividades/projetos e consiste num gráfico com barras horizontais de forma a ilustrar a cronologia de todas as atividades e/ou tarefas para os vários projetos. O comprimento de cada barra representa a duração de cada tarefa e pode indicar se existem outras a decorrer ao mesmo tempo. Assim, o diagrama representado na Figura acima mostra a sequência de trabalhos a ser realizada, bem como os seus prazos (Martins, 2020).

## 1.5. Organização da Tese

A presente dissertação de mestrado encontra-se dividida em 6 secções principais.

Na Introdução é realizado um pequeno enquadramento ao que foi feito ao longo dos 6 meses de estágio, bem como uma breve apresentação, descrevendo o problema e objetivos do projeto. É também feita uma apresentação às duas entidades onde se realizou o estágio e uma exposição da organização do documento.

No Estado-da-Arte é relatado, detalhadamente, a informação teórica recolhida ao longo do tempo, de forma a enquadrar o tema da dissertação, bem como o objetivo do projeto.

A Pesquisa e Planeamento para formulação do produto alimentar descreve a revisão da informação encontrada para a produção do produto final, de forma a ser possível descrever os materiais e métodos para realização do mesmo.

Nos Materiais e Métodos são descritos os materiais necessários para a realização do produto final.

Nos Resultados e Discussão são apresentados os resultados mais relevantes, com posterior discussão.

A Conclusão descreve as principais conclusões de todo o projeto de estágio. No final desta, são apresentadas sugestões de trabalho futuro para a parte laboratorial.

No final, encontram-se também as Referências Bibliográficas e Anexos, onde podem ser encontradas tabelas e gráficos, exemplos de cálculo, fotografias tiradas ao longo do projeto, a Ficha de Análise Sensorial utilizada e as folhas Excel, quer para o mapeamento de *Novel Foods*, quer para a análise dos dados obtidos experimentalmente.

## 2. Estado-da-Arte

### 2.1. *Novel Foods*

*Novel Foods*, ou novos alimentos, são alimentos ou ingredientes que não são consumidos, por hábito, em determinado país, sendo, por isso, considerados uma novidade. Estes novos alimentos incluem, por exemplo, alimentos de países terceiros, como fruta, fontes de óleo, proteínas, enzimas e outras substâncias; ou simplesmente alimentos já existentes cujo processo de produção se trata de uma nova tecnologia/inovação (Bragazzi et al., 2017; Hendrich, 2016).

Os chamados “alimentos de países terceiros” são alimentos tradicionais de outros países fora da União Europeia. Existem também os “novos ingredientes”, que se tratam de novas substâncias utilizadas para reforçar determinados alimentos com nutrientes, como é o caso do fitoesterol – esteróis vegetais (Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, 2021).

Para qualquer possível novo alimento, deve ser elaborada uma avaliação do risco associado. Geralmente, nessa avaliação, são utilizados alimentos e/ou ingredientes ditos “tradicionais”, de forma a serem utilizados como ponto de referência. Assim, numa primeira avaliação, o novo alimento e o tradicional, são comparados e diferenciados. Nessa abordagem é realizada uma comparação sistemática com todas as informações disponíveis desde a composição do alimento até às características nutricionais e toxicológicas do mesmo. Esta comparação é necessária para se chegar à conclusão se o produto é, ou não, seguro para consumo. Nesta avaliação pode haver a necessidade de testes biológicos e/ou toxicológicos (Bragazzi et al., 2017).

#### 2.1.1 Regulamentação existente para *Novel Foods*

De forma a garantir a segurança e a qualidade nutricional do fornecimento de alimentos foi criada a regulamentação de novos alimentos.

Segundo o Regulamento (UE) N.º 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de novembro de 2015, relativo a novos alimentos, que revoga os anteriores sobre este tema, um novo alimento é aquele cujo consumo na União Europeia (UE) era raro, ou inexistente, antes de 15 de maio de 1997 (União Europeia, 2015).

Qualquer alimento, para ser considerado novo, deve resultar de um processo de produção que anteriormente não era utilizado para a produção de alimentos na UE, resultando em alterações consideráveis na sua composição e/ou estrutura, afetando o seu valor nutritivo, metabólico ou o teor em substâncias indesejáveis (União Europeia, 2015).

De acordo com o Regulamento acima referido, *são várias as categorias existentes para que possa ser considerado um novo alimento* (União Europeia, 2015).

O Regulamento (CE) N.º 258/97 (regulamento anterior ao acima referido que terá sido revogado), sofreu uma evolução científica desde 1997, por isso, é importante rever e atualizar certas categorias. Essas categorias devem incluir insetos inteiros e respetivas partes, alimentos com uma nova estrutura molecular, ou intencionalmente modificada, alimentos que vêm de culturas de células ou de tecidos derivados de animais, plantas, microrganismos, fungos ou algas, e também alimentos produzidos a partir de matérias-primas de origem mineral (União Europeia, 2015).

Deverá também existir uma categoria que mencione alimentos provenientes de plantas que foram obtidas através de propagações não tradicionais. A definição de novos alimentos pode também incluir alimentos que constam em certas micelas ou lipossomas (União Europeia, 2015).

Os alimentos constituídos por nanomateriais artificiais também deverão ser considerados novos alimentos. Nanomateriais artificiais, de acordo com Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, *são qualquer material intencionalmente produzido com dimensões na ordem dos 100 nanómetros ou menos, ou composto por diversas partes funcionais, internamente ou à superfície, que conservam as propriedades características da nanoescala* (União Europeia, 2011, 2015).

Vitaminas, minerais e outras substâncias (utilizadas em suplementos alimentares ou em fórmulas para lactentes e de transição), alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés (destinados a lactentes e crianças pequenas) deverão também ser abrangidos pela definição de novos alimentos de acordo com o Regulamento em vigor (União Europeia, 2015).

Os alimentos tradicionais de países terceiros devem também ser abrangidos por este Regulamento, caso a sua utilização seja segura nesse país. *O alimento em questão deverá ser consumido nesse país terceiro há, pelo menos, 25 anos. Para serem considerados novos*

*alimentos de países terceiros na UE, devem derivar da produção primária desse país, independentemente de serem alimentos transformados ou não* (União Europeia, 2015).

Para serem autorizados e utilizados, todos os novos alimentos devem preencher os critérios definidos no Regulamento em vigor. Deverão ser considerados seguros, e a sua utilização não deve, em qualquer circunstância, induzir o consumidor em erro. Se um alimento for substituído por um novo, este não deve consistir numa desvantagem nutricional para o consumidor (União Europeia, 2015).

Todo e qualquer novo alimento apenas poderá seguir para o mercado se estiver incluído na Lista da União. Esta lista trata-se de um documento que possui todos os novos alimentos e alimentos tradicionais de países terceiros autorizados, até hoje, na UE, incluindo o nome, a forma de uso, a rotulagem e outras condições e indicações (DGAV, 2014).

Antes de ser aceite na Lista da União, devem ser definidos critérios claros para a avaliação de riscos de segurança. Essa avaliação deverá ser creditada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (DGAV, 2014).

Após a introdução do novo alimento na Lista da União, a Comissão Europeia possui o poder de inserir requisitos de monitorização após a comercialização, garantindo que a utilização se encontra dentro de limites seguros (União Europeia, 2015).

Alguns exemplos de novos alimentos introduzidos na Lista da União são os Cogumelos *Agaricus bisporus*, tratados com radiação UV, a Levedura para panificação *Saccharomyces cerevisiae*, tratada com UV, a Betaina e o Óleo de diacilglicerol de origem vegetal (União Europeia, 2017).

As novas tecnologias são incentivadas na formulação/produção de alimentos, de forma a haver uma redução do impacto ambiental, aumentando a segurança alimentar e beneficiando os consumidores.

O Regulamento (UE) N.º 2015/2283 não se aplica a alimentos que sejam utilizados como alimentos geneticamente modificados, enzimas alimentares, aditivos alimentares, aromatizantes alimentares e solventes de extração, utilizados na produção de géneros alimentícios ou ingredientes alimentares (União Europeia, 2015).

## 2.1.2 Regulamentação existente para Edulcorantes

Segundo o Regulamento (CE) N.º 1333/2008, relativo a aditivos alimentares, apenas os aditivos autorizados pela União Europeia podem ser vendidos e utilizados em alimentos (União Europeia, 2008).

Os aditivos devem ser empregues a um nível o mais baixo possível, permitindo a obtenção dos resultados pretendidos. Este nível baixo deve ter em conta uma dose diária aceitável (União Europeia, 2008).

Segundo o regulamento acima referido, na presença de aditivos, quer sejam destinados a um consumidor, ou não, estes devem cumprir os requisitos de rotulagem. Esta deve ser clara e deve conter a indicação do nome e/ou do número E (códigos de referência para aditivos alimentares) (União Europeia, 2008).

Existe uma lista de todos os aditivos utilizados e aprovados pela União Europeia, sendo assim, demonstrados como seguros. A sua segurança é garantida por organismos de peritos internacionais (DGAV, 2014).

Apenas podem ser incluídos na lista comunitária, aditivos alimentares na classe dos edulcorantes se cumprirem, pelo menos um dos seguintes critérios (EFSA, 2021, 2022):

a) Substituição de açúcar na produção de alimentos com valor energético baixo, de géneros alimentícios não-cariogénicos, ou de géneros alimentícios sem adição de açúcares; ou

b) Substituição de açúcares nos casos em que tal permita prolongar o prazo de conservação do género alimentício; ou

c) Produção de géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial, na aceção da alínea a) do n.º 2 do artigo 1.º da Diretiva 89/398/CEE.

E pelo menos 1 dos critérios (EFSA, 2021, 2022):

a) Conservação da qualidade nutritiva dos géneros alimentícios;

b) Abastecimento de ingredientes necessários aos géneros alimentícios fabricados tendo em conta grupos de consumidores com necessidades nutricionais especiais;



c) Aumento da conservação ou a estabilidade de um género alimentício ou melhorar as suas propriedades organoléticas, desde que não altere a natureza, a essência ou a qualidade do género alimentício de modo suscetível de induzir o consumidor em erro;

d) Auxílio no fabrico, a transformação, a preparação, o tratamento, a embalagem, o transporte ou a armazenagem dos géneros alimentícios, incluindo os aditivos alimentares, as enzimas alimentares e os aromas alimentares, desde que o aditivo alimentar não seja utilizado para dissimular os efeitos da utilização de matérias-primas defeituosas ou de métodos ou técnicas indesejáveis, incluindo métodos ou técnicas não higiénicas, durante qualquer uma daquelas operações (EFSA, 2021, 2022).

## 2.2. Proteínas alternativas

Ao longo dos séculos, tem-se verificado um aumento da população global, que tem vindo a comprometer a sustentabilidade dos sistemas alimentares e agrícolas. Com isto, é essencial uma expansão destes dois setores, tendo-se discutido, exaustivamente, outras fontes alimentares alternativas. Alguns exemplos dessas fontes, que vão ser posteriormente detalhadas, encontram-se na Figura 5.



**Figura 5.** Exemplos de fontes de proteínas alternativas: (a) vegetal, (b) insetos, (c) microbiana, (d) algas e (e) fermentação de precisão.

A situação mundial referida, bem como a intenção dos consumidores de incluírem, na sua alimentação diária, mais proteínas vegetais, trouxeram à conversa o tema do uso de fontes alternativas de proteína (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, 2017).

As proteínas, os hidratos de carbono e os lípidos são macronutrientes essenciais para um bom funcionamento metabólico e crescimento do Homem. As primeiras fornecem aminoácidos essenciais e devem ser inseridas numa dieta alimentar equilibrada e saudável (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, 2017).

Geralmente, as proteínas alimentares são obtidas através da ingestão de produtos de origem animal. No entanto, existe a necessidade de alimentar, de forma sustentável, a população, tendo assim emergido as proteínas alternativas (Lähteenmäki-Uutela et al., 2021).

Proteínas alternativas consistem em novas fontes de proteína, além das obtidas através de animais, ou seja, são alternativas destinadas a substituir a carne convencional, o leite e outros produtos alimentares de origem animal (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, 2017).

Os tipos de proteínas alternativas são classificados com base nas suas fontes, sejam elas à base de plantas, de insetos ou de agricultura celular, sendo que esta última engloba carne, leite e ovos produzidos *in vitro* por meio de métodos celulares (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, 2017; Sexton et al., 2019).

Alguns exemplos de proteínas alternativas que já se encontram no mercado são, por exemplo, os insetos comestíveis, uma vez que, estes têm sido apresentados como alimentos ricos em proteínas e micronutrientes (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, 2017) e as algas, que são ricas em proteínas e, algumas espécies, num micronutriente muito importante, o iodo. O iodo é um oligoelemento fundamental para o organismo porque está envolvido no crescimento e desenvolvimento dos órgãos, principalmente do cérebro. Controla também os processos metabólicos do organismo, sendo que a sua única forma de obtenção é através da alimentação (Brito, 2021).

Outros exemplos de proteínas emergentes são os grãos de, por exemplo, trigo e zeína, as leguminosas, as proteínas de oleaginosas e de cereais, as micoproteínas, microalgas e fungos (micoproteínas) (Asgar et al., 2010; Fasolin et al., 2019).

São várias as proteínas encontradas nos cereais, sendo que neles se encontra a albumina, a globulina, a gliadina e a glutelina (Asgar et al., 2010).

Recentemente, De Vries et al. (2018) destacaram a importância de três direções principais de inovação para os futuros sistemas alimentares: 1) melhor eficiência – “produção em massa ao menor custo possível”; 2) oportunidade de inovação impulsionada pelas tendências de consumo e pela necessidade de equilibrar o uso de proteínas de origem animal - desenvolvimento de novas percepções/sensações e produtos de nicho com alto valor em pequena escala; e 3) desenvolvimento de alimentos funcionais visando a saúde e bem-estar no consumo. O uso de fontes alternativas de proteína aliada ao uso de tecnologias eco inovadoras e de baixo custo está então alinhado com essa mudança de paradigma (de Vries et al., 2018).

## 2.2.1. Tipos de proteínas emergentes

### 2.2.1.1. Proteínas Vegetais

As proteínas vegetais são, por exemplo, as hortofrutícolas e os cereais.

Quando se fala na substituição das proteínas convencionais, tais como a proteína da carne e de ovo, as fontes vegetais parecem ser um substituto congênito, pois estas fontes estão naturalmente presentes na dieta regular do consumidor e trazem benefícios à saúde e ao meio ambiente, sendo que os custos associados à sua produção são também mais reduzidos (Fasolin et al., 2019).

Uma vantagem do uso de fontes vegetais é a produção, em menor quantidade, de gases de efeito de estufa, sendo estes menos intensivos e menos ambientalmente destrutivos (Tarhini et al., 2017).

A nível nutricional, e, para além de se tratarem de fontes alternativas às proteínas convencionais, os alimentos tais como as leguminosas, as nozes, frutas e hortícolas, são também fontes de nutrientes, tais como vitaminas, minerais, antioxidantes, fibras e agentes anti-inflamatórios que promovem a saúde dos consumidores (Kojima et al., 2018).

Apesar das proteínas vegetais possuírem um elevado teor proteico, estas são deficientes em aminoácidos essenciais. Outros fatores que afetam a sua utilização são a biodisponibilidade e digestibilidade das mesmas (Lynch et al., 2018). Assim, para responder a este problema, devem-se combinar as várias fontes vegetais, para atingir o perfil de aminoácidos pretendido.

Relativamente a características tecnológicas, as proteínas vegetais podem apresentar um importante papel no desenvolvimento e produção alimentar. A Colza, por exemplo, apresenta ótimas propriedades estabilizantes de espuma e emulsão devido à presença de cruciferina e napina. As proteínas de leguminosas, por exemplo, o tremçoço, o grão-de-bico, a lentilha, a ervilha e as nozes (por exemplo, castanha de caju), possuem um forte potencial de estabilização de emulsões, espumas e/ou formação de gel (Berghout et al., 2015).

A proteína da soja apresenta propriedades gelificantes, mas também compostos fenólicos que podem reduzir a qualidade nutricional e funcional. No entanto, a elasticidade dos géis da proteína de soja aumenta quando os compostos fenólicos são removidos. Além disso, subprodutos à base de vegetais da indústria alimentícia têm sido utilizados para o isolamento de proteínas, como o bagaço de maçã, o farelo de aveia, as folhas de beterraba e a polpa de laranja (Fasolin et al., 2019).

#### 2.2.1.2. Proteínas de Insetos

Para além do seu valor nutricional, a proteína de insetos tem um impacto positivo a nível ecológico, ambiental e económico (Sun-Waterhouse et al., 2016). Apesar das suas vantagens, a questão de consumir insetos ainda representa uma problemática por parte do consumidor, sendo, por muitos, rejeitada (Hartmann & Siegrist, 2016).

Os insetos que são geralmente consumidos são *Coleoptera* (31 %), *Lepidoptera* (18 %), *Hymenoptera* (14 %), *Orthoptera* (13 %) e *Hemiptera* (10 %) (Sun-Waterhouse et al., 2016). Estes possuem uma elevada eficiência de conversão alimentar, ciclos de vida curtos e altas taxas de reprodução, sendo, por isso, mais vantajosos em relação a outras fontes (van Huis, 2013).

Apesar das várias vantagens nutricionais, a quantidade de cada nutriente depende da espécie de inseto utilizada, no entanto, eles são, no geral, ricos em proteínas, gorduras, minerais e vitaminas. Ferro, zinco, potássio, sódio, cálcio, fósforo, magnésio, manganês, cobre, riboflavina, vitamina B5, biotina e ácido fólico podem ser encontrados em insetos (van Huis, 2013). Em algumas espécies, a concentração de ferro e zinco poderá ser igual ou superior à da carne bovina, de frango e de porco (Mwangi et al., 2018).

Este tipo de proteína contém os aminoácidos essenciais necessários (Zielińska et al., 2015). Estudos recentes investigam a solubilidade, espumabilidade, capacidade de gelificação e

propriedades emulsionantes das proteínas de insetos, revelando seu potencial tecnológico (Fasolin et al., 2019).

A nível de aplicabilidade, os insetos comestíveis são comumente utilizados sob a forma de pó seco ou farinha, sendo necessários mais estudos de forma a se testar a viabilidade e funcionalidade tecnológica da mesma (Lamsal et al., 2019).

#### 2.2.1.3. Proteína microbiana

A proteína microbiana trata-se de uma proteína que deriva de microrganismos unicelulares e multicelulares, entre os quais se encontram as bactérias e fungos (Fasolin et al., 2019).

Este tipo de proteínas não exige uma grande quantidade de espaço para o seu cultivo, uma vez que são, geralmente, cultivadas em tanques ou reatores. Existe também um sistema de lagoas abertas para a mesma finalidade (Laurens et al., 2017). O seu cultivo é, também, ecológico. O substrato utilizado são subprodutos agroindustriais, que produzem a proteína enquanto os resíduos são tratados (Fasolin et al., 2019).

Os aminoácidos essenciais dependem não só da espécie do microrganismo utilizado e do seu substrato, como também do estágio de crescimento celular, da fonte de nutrientes e das condições do meio de crescimento (Laurens et al., 2017). São considerados de alta qualidade uma vez que, os valores de aminoácidos essenciais, se aproximam do valor de referência da OMS (Organização Mundial da Saúde) (Fasolin et al., 2019; Millward, 2012).

#### 2.2.1.4. Proteína de algas

O interesse pelos recursos marinhos tem vindo a aumentar, não só a nível económico, mas também devido à maior preocupação dos consumidores por uma alimentação mais ecológica, natural e saudável (Vieira de Mendonça et al., 2021).

São várias as vantagens da utilização de algas como fonte de proteína, as quais possuem taxas de crescimento e produção mais elevadas, uma eficiência fotossintética maior, um consumo de água mais reduzido, uma pequena quantidade de lignina, o que facilita a extração da proteína e a capacidade de armazenar carbono. Uma outra grande vantagem, é a redução do impacto

ambiental, visto que são capazes de remover 10 a 50 vezes mais CO<sub>2</sub> do que as plantas terrestres (Vieira de Mendonça et al., 2021).

Por sua vez, as algas não são, ainda, bem aceitas pela população em geral, devido à sua cor, considerada indesejada, e ao sabor forte que possuem, visto que contêm compostos de enxofre e compostos voláteis derivados de lipídios (Vieira de Mendonça et al., 2021).

Estudos sobre a sua digestibilidade mostraram que as algas têm uma fraca digestibilidade proteica quando consumidas como *Single Cell Protein* ou célula inteira, devido à composição e estrutura de sua parede celular, geralmente contendo alto teor de fibras e eventualmente polifenóis (Harrysson et al., 2018).

As algas são divididas em microalgas e macroalgas. As primeiras são conhecidas como sendo uma elevada fonte de proteína, uma vez que são ricas em aminoácidos (AA) essenciais, sendo, por vezes, idênticos a certas fontes de proteína animal (Koyande et al., 2019; Wells et al., 2017).

As macroalgas castanhas contêm elevados teores de arsênio, em comparação com as verdes e vermelhas (Amlund et al., 2019). A utilização destas é essencialmente para produção de hidrocolóides, como, por exemplo, o alginato e o ágar-ágar, que, devido às propriedades espessantes, estabilizantes e gelificantes, são utilizados no processamento de carnes, laticínios, geleias, entre outros (Wells et al., 2017).

As microalgas são ricas em proteínas e compostos bioativos e as macroalgas, ricas em minerais, vitaminas e fibras. As proteínas das algas conseguem prover de peptídeos bioativos (BAPs), sequência de 2 AA a 20 AA, que são produzidos por protéases digestivas, sendo que estes podem constituir um benefício para a saúde – propriedades funcionais (Pimentel et al., 2019).

#### 2.2.1.5. Proteína de fermentação de precisão

Ao longo dos anos, a engenharia genética cresceu e contribuiu para uma produção de enzimas e proteínas mais eficiente, por meio da fermentação. Hoje, grande parte das enzimas comerciais são produzidas através de Organismos Geneticamente Modificados (OGM), leveduras ou fungos (Waschulin & Specht, 2018).

Uma alternativa à minimização de subprodutos é a criação de células sintéticas, onde toda a matéria-prima necessária apenas produz o que é desejado (Teng et al., 2021). Assim, nasceu a

fermentação de precisão (FP), que une a fermentação tradicional com a biologia de precisão (engenharia genética), permitindo a utilização de hospedeiros, tais como fungos e leveduras, para a produção de ingredientes funcionais específicos, tais como o perfil nutricional, a qualidade funcional e/ou estrutural, o sabor, a textura, entre outros (Teodoro, 2022).

A nível de processamento, este é composto por quatro etapas fundamentais. Iniciando-se pela seleção da molécula alvo a produzir, de forma a reproduzir as suas características funcionais. Segue-se para o desenvolvimento da estirpe e posterior fermentação em tanques fermentativos, onde, quando a molécula se encontra em quantidades suficientes, é isolada e filtrada. Por fim, procede-se à incorporação da mesma no produto final pretendido (Specht, 2021).

Apesar deste tipo de fermentação apresentar uma grande vantagem no que toca à quantidade de subprodutos formados, este não é ainda bem aceite, quer a nível do consumidor, quer a nível legal, uma vez que, apesar de não conter material genético, a engenharia genética está presente no processo produtivo, sendo que a regulamentação sobre Organismos Geneticamente Modificados ainda não se aplica em certas competências (Specht, 2021).

A FP é utilizada para produzir enzimas, agentes aromatizantes, vitaminas, gorduras e pigmentos naturais.

Alguns tipos de produtos que utilizam este tipo de fermentação são, por exemplo, os *Nick's Vegan*, que utilizam a proteína láctica *animal-free* da marca *Perfect Day*, sendo assim, 100 % veganos, através de fermentação com microflora (Nick's Ice Cream, 2022). Outro exemplo de produto é o MeliBio, que é um adoçante muito idêntico ao mel das abelhas (MeliBio, 2022).

### **2.3. Açúcares alternativos**

A procura de açúcares alternativos tem vindo a aumentar, sendo que os consumidores mostram um elevado interesse na sua substituição. As suas alternativas procuram reduzir o teor calórico dos alimentos e bebidas (Zeece, 2020). Na presente dissertação, é de elevado interesse a remoção/diminuição desse teor calórico no produto final obtido, sendo que, a procura de novas fontes alternativas é essencial.

Os açúcares são compostos doces, que se obtêm através de várias plantas, mas principalmente da cana-de-açúcar e da beterraba. O seu principal componente é a sacarose (EFSA, 2021).

A comercialização das alternativas do açúcar tem aumentado exponencialmente devido ao potencial de redução de sacarose e frutose, de forma a diminuir a doença Diabetes Tipo 2. No entanto, apesar dessa crescente comercialização, existem já dados que mostram que essas alternativas, apesar da produção de um sabor doce, podem sugerir também o aumento de apetite (Zeece, 2020).

### 2.3.1 Alternativas Diretas

Os edulcorantes são substâncias que conferem sabor doce, podendo apresentar-se na forma de ingredientes ou adoçante de mesa, possuindo um baixo valor calórico (Zeece, 2020).

Existem, no geral, dois tipos de adoçantes: naturais e sintéticos. Os primeiros, tal como o nome indica, são opções mais saudáveis do que o açúcar, uma vez que, se tratam de alternativas naturais. No entanto, estas alternativas, recorrem a um processamento e refino, que as tornam menos saudáveis. Alguns exemplos de adoçantes naturais reconhecidos como seguros para consumo são os sumos de fruta e o melado (Mayo Clinic, 2022).

Os adoçantes artificiais são alternativas sintéticas que podem provir das naturais, no entanto, possuem a vantagem de serem considerados adoçantes intensos, dado que, a maioria das vezes, são mais doces que o açúcar, sendo que não são necessários em grandes quantidades e podem adicionar menos calorias à dieta do consumidor (Mayo Clinic, 2022).

Sendo de interesse a utilização de alternativas aos açúcares, também é de interesse que estas sejam de baixas calorias. Adoçantes de baixas calorias (LCS) são adoçantes com poucas ou nenhuma calorias, mas que possuem uma maior intensidade no sabor. Na rotulagem dos alimentos com LCS, muitas vezes encontra-se o termo “sem açúcar” ou “*diet*” (Ahmed et al., 2022).

Outras alternativas existentes são, por exemplo, os açúcares raros. Os açúcares raros são monossacarídeos e derivados, que se encontram de forma reduzida na natureza. Estes apresentam diferenças mínimas, a nível estrutural, quando comparado com os açúcares



tradicionais. Podem ser encontrados no mel, em algumas frutas e vegetais, e em grãos, apresentando-se como alternativas benéficas a nível calórico e metabólico (Ahmed et al., 2022).

Alguns exemplos de açúcares raros que podem vir a ser interessantes, uma vez que oferecem benefícios fisiológicos e reduzem a resistência à insulina, são a alulose, L-arabinose, D-tagatose, trealose e a isomaltulose. No entanto, estes açúcares necessitam, ainda, de mais estudos e ensaios clínicos (Ahmed et al., 2022).

Outro exemplo são os álcoois de açúcar (SA), que são substitutos naturais. Apresentam propriedades de doçura e textura e pertencem à família dos polióis (álcoois polihídricos produzidos pela hidrogenação dos açúcares redutores correspondentes) (Godswill Awuchi, 2017).

Os SA são utilizados como aditivos alimentares, possuem um baixo teor calórico e a sua doçura aproxima-se à da sacarose. São empregues, muitas vezes, em combinações com adoçantes intensos, de forma a disfarçar sabores desagradáveis. A nível de sensibilidade, por parte do consumidor, estes apresentam uma sensação de frio na boca quando ingeridos, uma vez que, a sua dissolução se trata de uma reação endotérmica. Para além da sua aparência a nível de doçura com a sacarose, estes possuem também a vantagem de não serem metabolizados por bactérias orais, sendo benéficos para a saúde oral. Alguns exemplos de álcoois de açúcar são o sorbitol, o malitol, o manitol, o eritritol e o xilitol (Godswill Awuchi, 2017).

### 2.3.2 O recetor de sabor doce heterodimérico

O paladar é dos sentidos mais importantes para o consumidor, uma vez que, lhes permite saborear e determinar a qualidade dos alimentos/bebidas. Existem cinco gostos básicos perceptíveis: doce, amargo, azedo, salgado e umami. A conversão do sabor doce, amargo e umami é feita através de recetores acoplados à proteína G (GPCRs) (Cui et al., 2006).

Os GPCRs agem como recetores de mensagens e informam as células sobre a presença de luz e nutrientes ou transmitem informações enviadas por outras células (Cui et al., 2006).

É no epitélio da língua que se encontram as células recetoras de paladar. As proteínas que recebem, inicialmente, a informação do sabor, localizam-se nas microvilosidades das células recetoras. Existem dois tipos de recetor: T1Rs e T2Rs, que correspondem, respetivamente, ao sabor doce/umami e amargo (Cui et al., 2006).

Recentemente foi identificado um novo gene, T1R3, que se trata de um recetor doce. O heterodímero de T1R2 e T1R3 (T1R2/T1R3) é um recetor de sabor doce responsivo a açúcares naturais, adoçantes artificiais, D-aminoácidos e proteínas de sabor doce (Cui et al., 2006).

### 2.3.3 Diferenças de Ação dos Açúcares

#### 2.3.3.1 Moduladores

Moduladores de açúcar são ingredientes que proporcionam um sabor mais doce aos edulcorantes de elevada intensidade, aproximando-se do açúcar, eliminando certas adstringências (Sweetener R&D Academy, 2021).

Acontece que os edulcorantes de elevada intensidade possuem uma baixa solubilidade em água, migrando lentamente do alimento para o recetor, levando a uma percepção lenta da doçura. São também mais hidrofóbicos, levando a uma maior aderência às proteínas hidrofóbicas da boca do consumidor, dando uma percepção mais forte do seu sabor (Sweetener R&D Academy, 2021).

#### 2.3.3.2 Intensificadores

Os intensificadores têm vindo a ser utilizados como aditivos alimentares, sendo que a sua principal função é a de aumentar a percepção de doçura, uma vez que, se ligam a recetores de sabor doce (T1Rs) na língua e podem também ativar os recetores orais amargos (T2Rs) (Turner et al., 2020).

#### 2.3.3.3 Bloqueadores

Existe uma forte investigação, por parte das empresas, para o desenvolvimento de bloqueadores para remoção dos defeitos de sabor de determinados alimentos/compostos. Existem dois termos que se referem à modificação do sabor de um determinado produto. Um é o de “mascarar” o sabor, que fornece um atributo de aroma e/ou sabor, diminuindo a percepção do consumidor a sabores indesejáveis. Para mascarar sabores indesejados, são utilizados, por exemplo, adoçantes, ácidos e sais. Quando se utiliza o termo “bloqueio”, os atributos de sabor são alterados quimicamente (Mittelheuser, 2018).

## 2.4. Fermentado de leite: o iogurte

Um fermentado de leite é um produto láctico obtido através da coagulação das proteínas do leite. Esta fermentação permite o aumento de tempo de prateleira, bem como alterações consideráveis na textura e sabor do produto em questão (Baglio, 2014).

Dentro dos produtos lácticos fermentados, existe uma preferência, por parte do consumidor, pelos iogurtes. Aquando do seu consumo, são ingeridas bactérias com propriedades probióticas que aumentam a acidez da flora intestinal, inibindo a proliferação de microrganismos menos desejados, promovendo um melhor microbiota intestinal (Baglio, 2014).

No processo de produção do iogurte, são adicionadas ao leite, as bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, de forma a se produzir ácido láctico a partir da lactose do leite. Esta etapa faz com que ocorra um aumento da acidez do leite e uma diminuição do seu pH, induzindo assim, a coagulação das proteínas do leite, formando um gel ou coágulo (Baglio, 2014).

Para se obter um iogurte com a qualidade desejada, a seleção das matérias-primas é necessária. O processo de produção inicia-se assim pela receção do leite, que é submetido a tratamentos tecnológicos e logo após, ao armazenamento, a frio, de um leite desnatado e nata (Karam et al., 2013).

Segue-se a padronização, com recurso à adição de outros ingredientes. A etapa referida, permite que o leite adquira a quantidade requerida de gordura e outros sólidos não lípidos, de forma a aumentar o seu conteúdo de proteínas, promovendo a textura pretendida no iogurte final. É nesta etapa que podem ser adicionados açúcares e estabilizantes (Karam et al., 2013).

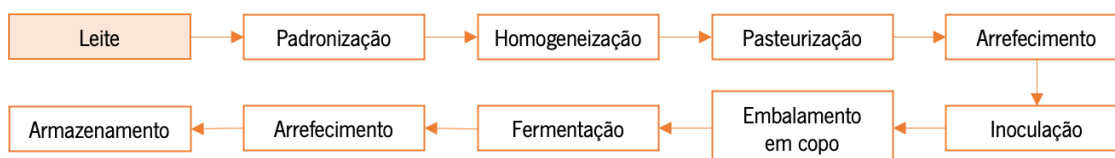
De seguida, dá-se a homogeneização, a pasteurização e arrefecimento. Na primeira, ocorre a redução dos glóbulos de gordura, bem como a mistura uniforme dos ingredientes, fornecendo estabilidade do coágulo (Portelinha et al., 2013). Na pasteurização, são eliminados os microrganismos presentes, dando-se, também o desnaturamento de enzimas e proteínas do soro de leite, permitindo uma ligação entre estas e as caseínas, melhorando a estabilidade do coágulo (Karam et al., 2013).

Após um arrefecimento, dá-se a inoculação das culturas *starter Streptococcus thermophilus* (ST) e de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LDB), iniciando-se assim a fermentação, que tem como objetivo a transformação da lactose em ácido láctico (Chandan et al., 2006).

A fermentação pode ocorrer dentro de um tanque de fermentação, onde são adicionados os restantes ingredientes, sendo depois embalado; ou pode ocorrer dentro da embalagem, onde são adicionados os aromas e/ou açúcares, antes da inoculação. A fermentação termina quando se atinge um pH perto de 4,5 (Portelinha et al., 2013).

Por fim, o iogurte é armazenado a 5 °C, para que não ocorra crescimento microbiano (Karam et al., 2013).

Na Figura 6 é possível observar, de forma sucinta, o processamento acima explicado.



**Figura 6.** Esquema sucinto do processamento do leite. Adaptado de: (Portelinha et al., 2013).

O iogurte pode ser sólido, líquido ou batido. O primeiro é coagulado nas embalagens de venda a retalho; o iogurte líquido é liquefeito após a sua coagulação e embalado posteriormente e o iogurte batido é previamente coagulado e depois embalado (Tamime & Robinson, 2000).

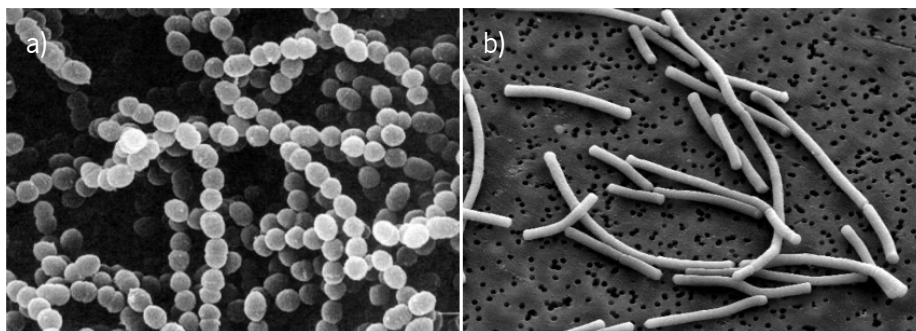
## 2.5. As bactérias lácticas

O iogurte é o produto obtido pela fermentação láctica através da ação das bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A bactéria *S. thermophilus* é uma *coccus*, Gram-positiva, com cerca de 0,7 µm a 0,9 µm de diâmetro e pode ser vista na Figura 7, a). Esta possui uma temperatura ótima de crescimento entre os 40 °C e os 45 °C e um pH ótimo entre 6,0 e 6,5. Trata-se de um organismo aeróbio e anaeróbio facultativo (Harnett et al., 2011).

Durante a fermentação, *S. thermophilus* cresce simbioticamente com a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, de forma a produzirem ácido láctico e acetaldeído, sendo elas responsáveis pelo sabor característico do iogurte (Gobbetti & Calasso, 2014).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* trata-se de uma bactéria também Gram-positiva, homofermentativa aeróbica a anaeróbica, que converte hexoses em ácido láctico pela via *Emden-Meyerhof*. As suas células são em forma de bastonete ( $0,5-0,8 \mu\text{m} \times 2,0-9,0 \mu\text{m}$ ) como se pode verificar na Figura 7, b) (Narvhus & Abrahamsen, 2022), e a sua temperatura ótima de crescimento encontra-se entre  $43 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $46 \text{ }^\circ\text{C}$  (Teixeira, 2014).

A temperatura a que o iogurte deve ser incubado situa-se nos  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo esta a temperatura benéfica para o crescimento e metabolismo de ambas as bactérias lácticas (Narvhus & Abrahamsen, 2022).



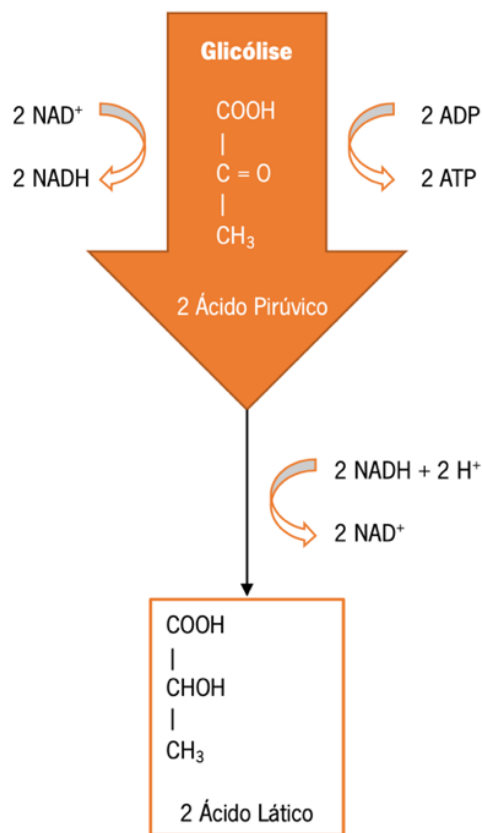
**Figura 7.** Streptococcus thermophilus; b) Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus. Fonte: (Narvhus & Abrahamsen, 2022).

Existe, como referido, uma relação de simbiose entre as duas bactérias lácticas supracitadas. *S. thermophilus* consegue diminuir o pH para os níveis que *L. bulgaricus* prefere, e, se diminuir demasiado, é capaz de produzir urease, libertando  $\text{NH}_3$ , fazendo o pH subir novamente. Por sua vez, quando o teor de aminoácidos de *S. thermophilus* é escasso, devido à sua baixa capacidade proteolítica, este beneficia das proteases que forem produzidas por *L. bulgaricus* (Narvhus & Abrahamsen, 2022).

### 2.5.1. Fermentação Lática

A fermentação é um processo a partir do qual se obtém ATP (trifosfato de adenosina) que armazena energia nas suas ligações químicas – na ausência de oxigénio através da glicólise (Soult, 2020).

No iogurte convencional, ambas as bactérias têm como função a produção de ácido láctico, exclusivamente, através da fermentação da lactose. Na Figura 8, é visível o processo homolático fermentativo.

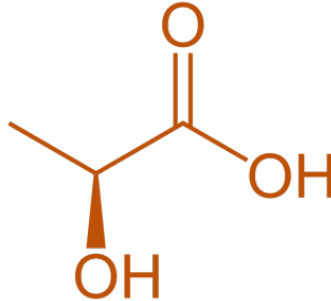


**Figura 8.** Fermentação homolática. Adaptado de: (Nobre, 2020).

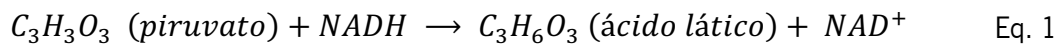
A glicólise trata-se de um processo onde, a partir da glicose, se formam duas moléculas de piruvato. Com este processo, são também geradas duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina), como se pode verificar pela Figura acima.

Tratando-se de um processo anaeróbio, é regenerado também  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH}$  oxidado), que permite que a glicólise continue a produzir ATP em condições baixas de oxigénio (Abdel-Rahman et al., 2013).

O NADH doa os seus eletrões a mais às moléculas de piruvato formadas ao longo da glicólise, formando-se NAD<sup>+</sup>, que fica novamente disponível para a glicólise. Assim, o ácido láctico produzido (Figura 9) é formado pela redução do piruvato (Equação 1) (Abdel-Rahman et al., 2013).



**Figura 9.** Ácido Láctico, C<sub>3</sub>O<sub>3</sub>H<sub>5</sub>. Adaptado de: (Wikipédia, 2017).



Na fermentação homolática, os açúcares são metabolizados, pela via glicolítica de *Embden-Myerhof*, em piruvato, que é depois convertido a lactato (National Center for Biotechnology, 2022).

Normalmente, os açúcares são transportados por um sistema de açúcar fosfotransferase, fosforilando o açúcar ao longo do seu transporte (National Center for Biotechnology, 2022).

Inicia-se pela fosforilação da glucose em β-D-glucose-6-fosfato, enquanto a D-frutose é fosforilada em β-D-frutofuranose-1-fosfato (National Center for Biotechnology, 2022).

O segundo mecanismo, menos usual, trata-se do transporte dos açúcares através de uma permease, caso estes não sejam fosforilados (National Center for Biotechnology, 2022).

Assim, todos os açúcares são ativados em β-D-frutofuranose-1,6-bifosfato, através de várias vias e dependendo da natureza do açúcar e da forma como este entra na célula (National Center for Biotechnology, 2022).

A frutose intracelular, após entrar através de uma permease, é fosforilada, primeiramente em frutose-6-fosfato e, posteriormente, em frutose-1,6-bifosfato. Da mesma forma, a glucose intracelular é fosforilada em glucose-6-fosfato, sendo depois isomerizada em frutose-6-fosfato e, por fim, em frutose-1,6-bifosfato (National Center for Biotechnology, 2022).

A frutose-6-fosfato e frutose-1-fosfato, que entram pelo sistema de açúcar fosfotransferase, são fosforilados em frutose-1,6-bifosfato e a glicose-6-fosfato é isomerizada em frutose-6-fosfato e, por fim, fosforilada em frutose-1,6-bifosfato (National Center for Biotechnology, 2022).

O produto final que têm em comum, frutose-1,6-bifosfato, processa-se via *Embden-Meyerhof*, que permite o uso metabólico da glicose para gerar ATP, NADH e vários precursores biossintéticos, tal como o piruvato, sendo o produto final o lactato (National Center for Biotechnology, 2022).

## 2.6. A dieta *plant-based*

O termo *plant-based* (PB), apesar de já ser utilizado há vários anos, ainda não possui uma definição clara. Não se trata, obrigatoriamente, de uma dieta vegetariana ou vegana. Assim, as definições mais conhecidas passam por uma dieta à base de fruta, vegetais, cereais, nozes e sementes (Colab4Food, 2022).

No entanto, esta dieta não exclui os laticínios, as carnes processadas e a de frango ou os produtos animais, tais como os ovos e o mel. Ou seja, os alimentos de origem animal podem e devem ser incluídos na dieta, em proporções preconizadas, tendo, por isso, um papel importante na dieta *plant-based* (Colab4Food, 2022).

### 2.6.1. Sobremesa *plant-based* tipo iogurte

Ao longo dos anos, tem aumentado o interesse pelas alternativas ao leite de vaca. Este interesse está diretamente ligado a necessidades éticas e à saúde do consumidor no que concerne a problemas relacionados com a elevada ingestão de colesterol, a intolerância ou má absorção à lactose e a alergia às proteínas do leite. Assim, surgiu o termo *plant-based* que tem sido explorado de forma gradual (Montemurro et al., 2021).

Com o objetivo de se criar produtos similares ao iogurte convencional, surgiu o conceito de sobremesa *plant-based* tipo iogurte, um produto vegetal, semelhante ao iogurte convencional em termos de textura e propriedades sensoriais, com a capacidade de aumentar o tempo de prateleira do produto (Montemurro et al., 2021). As sobremesas *plant-based* tipo iogurte existentes atualmente no mercado são feitas com recurso a bebidas vegetais.



## 2.7. Análises físico-químicas

Para a caracterização das BTIL e comparação com o iogurte convencional, é importante caracterizar vários parâmetros. De seguida, vão ser apresentados, sucintamente, o fundamento teórico das análises que foram realizadas ao produto final.

### 2.7.1. pH e Acidez Titulável

A produção de ácido láctico resulta no aumento da acidez e diminuição do pH do meio. A acidificação é responsável pelo processo de coagulação das proteínas, sendo o mecanismo chave durante a fermentação láctica (De Brabandere & De Baerdemaeker, 1999).

Industrialmente, a medição do pH é uma ferramenta de controlo do processo e é realizada de forma descontínua, já que as sondas de pH são sensíveis ao depósito das proteínas. A sonda de pH deve ser regularmente limpa e calibrada a cada fermentação (De Brabandere & De Baerdemaeker, 1999).

Para determinar a concentração de ácido ou base é utilizado um método analítico intitulado de titulação ácido-base, onde ocorre a neutralização, com recurso a uma solução padrão de ácido ou base, com concentração conhecida, que tem o nome de titulante. O titulante é adicionado à solução da substância que está a ser estudada, o analito. Neste tipo de titulação, o titulante pode ser uma base ou ácido fortes e o analito é um ácido ou uma base, respetivamente (Key, 2021).

Quando o titulante e o analito estão presentes em quantidades estequiométricas, dá-se o ponto de equivalência, ou seja, o ponto utilizado como referência que identifica o final da titulação. Normalmente, é utilizado um indicador para o identificar ou um pH alvo (Popping & Diaz-Amigo, 2014).

No que se refere ao indicador, o mais utilizado é a fenolftaleína que permite a determinação da quantidade de titulante necessária para neutralizar o ácido. Esta permanece incolor quando misturada inicialmente com a solução ácida, mas adquire uma coloração rosa aquando da presença de um meio alcalino - ponto de viragem do indicador utilizado. Normalmente é utilizado hidróxido de sódio (NaOH) para neutralizar o ácido (Popping & Diaz-Amigo, 2014).

A acidez titulável (TA) é expressa em graus Dornic ou em percentagem de ácido láctico (Popping & Diaz-Amigo, 2014). O cálculo da percentagem de ácido láctico encontra-se representado na Equação 2 e também no Anexo C – Equação C.9 (Metrohm, n.d.). Sabe-se também que, segundo Robinson (1994), 0,01 % de ácido láctico corresponde a 1 grau Dornic.

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{\text{Volume (NaOH) gasto} \times \text{MM(ácido láctico)} \times 0,1}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

### 2.7.2. Viscosidade

A viscosidade é uma medida da resistência de um fluido ao fluxo que descreve o atrito existente entre moléculas de um fluido em movimento (Princeton, 2022).

Quando um fluido possui uma elevada viscosidade, ou seja, um fluido que resiste ao movimento, a sua composição molecular confere um elevado atrito interno; por sua vez, um fluido com baixa viscosidade possui uma composição molecular com uma alta fluidez (Princeton, 2022).

Nas sobremesas vegetais, a textura/viscosidade é um fator de elevada importância, dado que não é utilizado leite cujo contém caseína que, ao longo da fermentação, forma um coágulo. Um método *plant-based* utilizado para superar a baixa viscosidade das sobremesas vegetais é a utilização de espessantes.

### 2.7.3. Sinérese

Sinérese foi o nome dado pelo investigador Graham, em 1864. Este fenómeno foi descrito já nessa altura como sendo a quebra dos géis, após ocorrência de uma perturbação ou com o passar do tempo (Kunitz, 1928).

É o termo utilizado quando se descreve a separação do líquido da componente sólida. Esta trata-se de um limite superior da capacidade de retenção de líquidos nos alimentos, sendo também utilizada na determinação da atividade máxima de água (Mizrahi, 2010).

A nível estrutural, a sinérese pode ocorrer devido ao encolhimento do gel, levando à instabilidade estrutural ou a soro que pode ter sido expelido a partir da matriz. Pode também ser indicador de que as proteínas são incapazes de reter moléculas hidrofílicas (Magenis et al., 2006).

No iogurte, é um dos fatores de maior interesse para determinar a qualidade do mesmo, uma vez que, esta é uma característica indesejável na aparência do mesmo, ficando uma matriz de gel visível na superfície do iogurte. Em sobremesas *plant-based* tipo iogurte, o termo utilizado para esta matriz não é soro de leite, mas apenas soro (Magenis et al., 2006).

A utilização de espessantes, com adição de água, imobilizando-a, é também um método utilizado para se ultrapassar a sinérese. Esta pode também ser evitada com a utilização de outros estabilizantes (Magenis et al., 2006).

#### 2.7.4. O Sistema CIELab

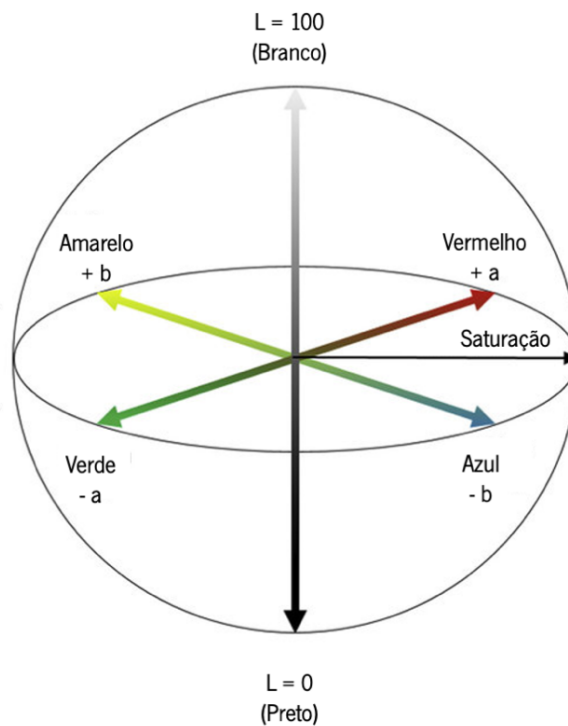
Existem várias formas de representar as cores, sendo que, para isso, existe o estudo da colorimetria, ou seja, a medição da cor. A colorimetria permite a caracterização das cores através de um sistema numérico objetivo (Gilchrist & Nobbs, 2017).

A forma como o Homem percebe a cor é conduzida por três fatores: a proveniência da luz, as propriedades óticas do objeto em questão e a resposta do olho humano (Gilchrist & Nobbs, 2017).

Assim, foi possível a criação de representações numéricas de cor, tais como o RGB (Red, Green e Blue), os valores tristimulares CIE (X, Y, Z), o espaço de cor  $L^*C^*h$  e o que vai ser utilizado neste estudo, o método espaço de cores CIELAB, ou  $L^*a^*b^*$ , entre outros métodos (Gilchrist & Nobbs, 2017).

O cone do olho são células que têm a capacidade de reconhecer as cores, sendo que estas são sensíveis à cor vermelha, verde e azul. Também, através de impulsos nervosos, enviados ao córtex visual, são recebidos sinais a nível da luminosidade (Gilchrist & Nobbs, 2017).

Foi assim que, em 1976, o sistema CIELAB, representado pela Figura 10, se tornou popular (Gilchrist & Nobbs, 2017).



**Figura 10.** O diagrama de espaço de cores CIELAB. Adaptado de: (Ly et al., 2020).

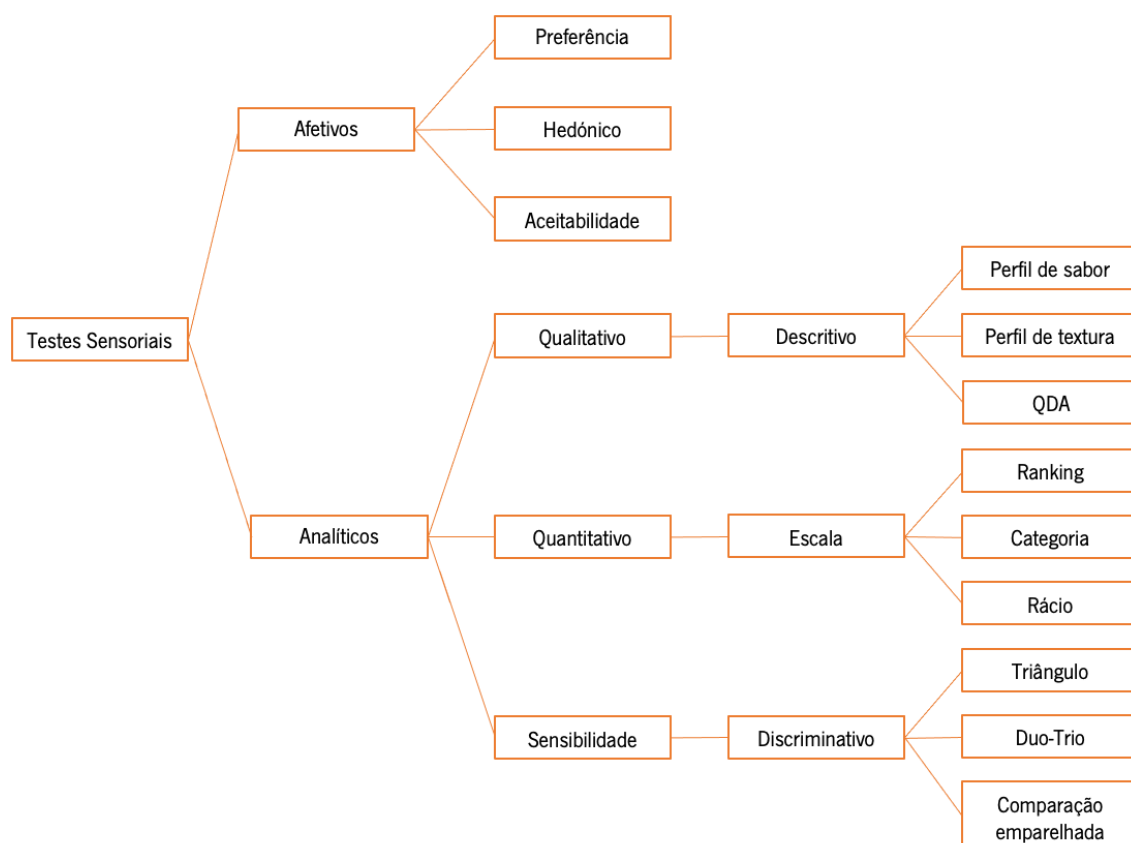
O valor  $L^*$  indica luminosidade e varia entre 100 (branco perfeito) e 0 (preto perfeito), definindo uma dimensão para a luminosidade. O valor de  $a^*$  e  $b^*$  são as coordenadas de cromaticidade, onde  $a^*$  se refere às cores opostas vermelho-verde, com valores positivos para os tons vermelhos e negativos para os verdes e  $b^*$ , ao amarelo (valores positivos) – azul (valores negativos). Na origem do plano é neutro ou acromático e a distância do eixo central representa a saturação da cor (Gilchrist & Nobbs, 2017).

O instrumento utilizado para a medição da cor é o colorímetro, que mede a luz refletida, quantificando os dados espectrais de forma a determinar as coordenadas de cor do produto no espaço de cor  $L^*a^*b^*$ , apresentando a informação em formato numérico (Gilchrist & Nobbs, 2017).

## 2.8. Análise Sensorial

A análise sensorial de novos alimentos é de extrema importância no possível lançamento do produto para o mercado. Trata-se de um estudo a várias variáveis, englobando a descrição do produto, a medição e a interpretação das características do mesmo, que podem ser avaliadas pelos órgãos sensoriais humanos. Assim, o ser humano serve como instrumento de medição, equiparado a outros aparelhos de laboratório (Agroscope, 2022).

Existem 2 modelos de análise sensorial. A análise sensorial analítica, que visa a geração de dados, o mais imparciais possível, que são depois utilizados como termo de comparação, com os dados obtidos química ou fisicamente, realizada por profissionais treinados; e a análise sensorial de componente afetiva, que se trata de uma análise mais pessoal e preferencial do consumidor em relação a um determinado produto. Exemplos de análises destes dois modelos podem ser observados na Figura 11 (Agroscope, 2022).



**Figura 11.** Exemplos de análises sensoriais associadas aos modelos afetivos e analíticos. Adaptado de: (Rodrigues, 2021).

A análise sensorial, trata-se da identificação, medição, análise, interpretação e/ou aceitabilidade das propriedades de um novo produto, sendo estas perceptíveis através dos cinco sentidos: olfato, paladar, tato, visão e audição (Rodrigues, 2021).

Esta responde às questões de qualidade sob quatro categorias: discriminação, descrição, preferência e/ou aceitabilidade. A discriminação é de elevada importância no que se refere ao controle e qualidade do produto, aos estudos sobre o tempo de vida do produto e à investigação de prováveis impurezas. A descrição é importante no sentido do desenvolvimento do produto, de forma a responder às necessidades do consumidor, sendo uma categoria em constante mudança. O teste de preferência é o teste que avalia o grau de preferência do consumidor, utilizando um produto como comparação. Por exemplo, é dado ao consumidor dois produtos idênticos, e ele deve escolher, entre os dois, qual o seu preferido. Por sua vez, o teste de aceitabilidade investiga o grau de aceitação de um produto, por exemplo, através da escala hedônica (Rodrigues, 2021), utilizada na Ficha de Avaliação Sensorial utilizada na presente dissertação.

A Análise Descritiva específica, detalhadamente, os atributos sensoriais do produto. Para esta análise, são requeridos avaliadores de Análise Descritiva de Perfil, que são pessoas selecionadas e treinadas, onde são estudadas as suas alergias, saúde, interesses e motivações, bem como a sua capacidade de detalhar, descrever e avaliar a acuidade sensorial (Rodrigues, 2021).

A *Tragon Corporation* desenvolveu a Análise Descritiva Quantitativa, QDA, uma marca registada, que utiliza vocabulário acordado pelos membros do painel e padrões de referência de avaliação (Rodrigues, 2021). Nesta análise participam, por norma, 6 a 12 avaliadores, treinados para avaliar o produto. Eles quantificam as características sensoriais selecionadas e analisam os resultados através de uma estatística paramétrica (Agroscope, 2022).

Os métodos de Escala são métodos onde é utilizada uma escala, como o próprio nome indica. Estes métodos dividem-se na Escala Ordinal, onde se especifica um atributo, como por exemplo, a ordem decrescente de doçura; a Escala Nominal, que se trata de uma escala descritiva, onde é pedido à pessoa que avalia, que faça a seleção de uma lista de descrições. Por exemplo, “a cor das bananas é: 1-verde, 2-amarela, 3-castanha, etc (Rodrigues, 2021).

Ainda nos métodos de Escala pode ser referenciada também a Categoria, onde é encontrada uma escala estruturada, que não contenha uma unidade básica. Um exemplo desta escala pode ser visto na Figura 12.



**Figura 12.** Escala Categoria. Adaptado de: (Rodrigues, 2021).

A escala acima referida é utilizada, por exemplo, para definir se um determinado produto é muito ou pouco doce, onde 1: não é doce, 2: é ligeiramente doce, 3: é moderadamente doce, 4: é muito doce, 5: é extremamente doce, e cabe ao provador definir o número que mais se adequa à sua percepção.

Um exemplo de teste discriminativo, apresentado na Figura 11, é o teste do Triângulo, onde em, por exemplo, três amostras, deve-se escolher a que é mais diferente das outras duas; no Duo-Trio, pode haver três amostras, sendo uma utilizada como referência; e a comparação emparelhada consiste na apresentação de duas amostras e faz-se, por exemplo, a pergunta “qual das duas amostras é mais ácida?” (Rodrigues, 2021).

### **3. Pesquisa e Planeamento para formulação do produto alimentar**

A seguinte secção refere-se à pesquisa bibliográfica realizada de forma a planear e preparar o trabalho prático efetuado.

A seguir encontra-se toda a informação necessária para o processamento genérico das BTIL, a formulação do líquido base das mesmas e a motivação pela escolha das proteínas selecionadas.

#### **3.1 Processamento genérico de uma sobremesa *plant-based* tipo iogurte**

Nas sobremesas *plant-based* tipo iogurte, a procura da textura ideal representa o maior desafio tecnológico, quer a nível da viscosidade, quer da perceção organolética. Esta tarefa é dificultada também pelo consumidor moderno, que procura produtos com menos aditivos, preferindo alternativas o mais naturais possíveis – *Clean Label*.

O termo *Clean Label* surgiu devido à procura, por parte do consumidor, de uma nutrição consciente, transparente e saudável. Assim, este termo responde às necessidades do consumidor moderno por alimentos “o mais naturais possíveis”, não processados e sem a adição de aditivos artificiais (Kerschbaumer, 2022).

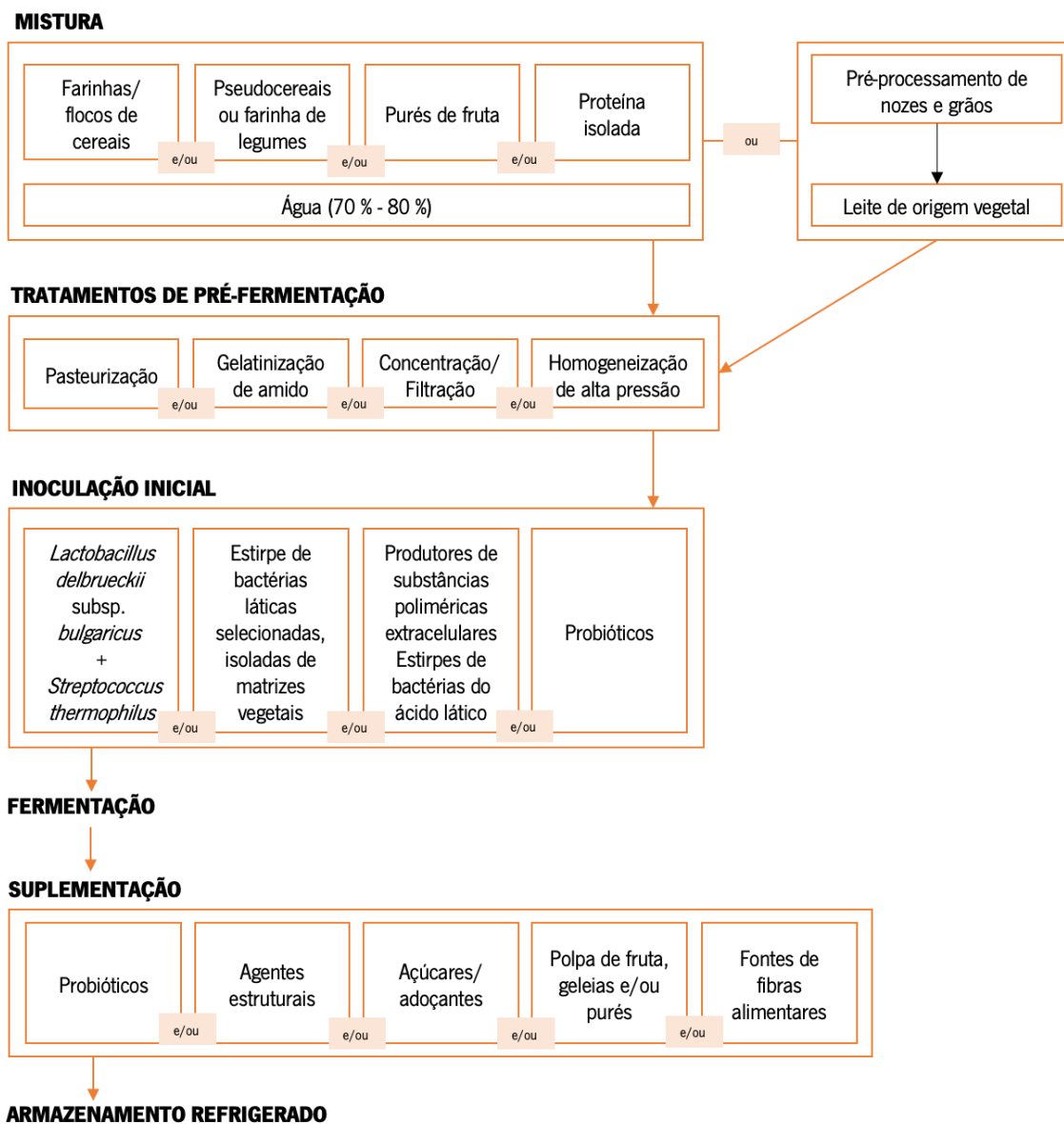
Com isto, são várias as opções tecnológicas que têm sido estudadas, de forma que as características das sobremesas PB se assemelhem às do iogurte convencional. Assim, a adição de isolados de proteínas alternativas na formulação têm sido investigadas.

Na realização da presente dissertação, contactaram-se diversos fornecedores, empresas nacionais e multinacionais com o intuito de se obterem bactérias lácticas em pó. No entanto, não foi possível a venda ou fornecimento da quantidade pretendida. Assim, foi necessária a utilização de iogurtes e sobremesas vegetais, os quais contêm ST e LDB, como ingredientes base para obtenção das culturas *starter* para as BTIL.



O processo de produção genérico de uma sobremesa PB tipo iogurte, pode ser observado na Figura 13, assim como algumas combinações que podem ser testadas.

O processo apresentado pela Figura é idêntico ao do iogurte convencional, mencionado na secção anterior.



**Figura 13.** Processo de produção genérico de uma sobremesa tipo iogurte *plant-based*. Adaptado de: (Montemurro et al., 2021).

### 3.2. Como substituir o leite de vaca nas BTIL

Sabe-se que o leite de vaca é um alimento natural, sem químicos ou aditivos adicionados (Real et al., 2016). No entanto, para a produção da BTIL, foi necessário substituir o leite utilizado nos iogurtes convencionais.

Existem, atualmente, vários tipos de leite: de sabores, enriquecidos e reduzidos. Os primeiros, como o próprio nome indica, possuem sabores diferentes, por exemplo, de morango ou chocolate. Os leites enriquecidos são os leites aos quais se adicionam, por exemplo, fibras, minerais e vitaminas. Os últimos, os leites reduzidos, são feitos especialmente para os indivíduos com certas restrições alimentares, como, por exemplo, intolerância à lactose (Real et al., 2016).

A nível nutricional, o leite é composto por hidratos de carbono, proteína, gordura, cálcio, potássio, fósforo, vitaminas A, B2 e B12 (Real et al., 2016).

Como todos os compostos têm uma funcionalidade muito específica, que são determinantes nas características do iogurte tradicional, tentou-se proceder à sua substituição por alternativas não-animal. Como hidrato de carbono, de forma a substituir a lactose (dissacarídeo constituído pelos monossacarídeos glucose e galactose) presente no leite, utilizou-se a glucose; para substituir a caseína e as proteínas do soro, proteínas presentes no leite, utilizaram-se os vários concentrados de proteínas vegetais: concentrado de proteína de ervilha, concentrado de proteína de tremçoço, farinha de fava e proteína do fungo *Aspergillus oryzae*.

O teor de lípidos varia consoante seja leite gordo, meio gordo ou magro, sendo que o leite possui naturalmente triacilgliceróis de cadeia curta e média (Real et al., 2016).

Segundo Hickisch et al., (2016), Montemurro et al., (2021), Canon et al., (2022) e Boukid et al., (2021), o óleo de coco é uma boa alternativa para adicionar à emulsão. No entanto, este tem de ser previamente aquecido e homogeneizado, aplicando uma tensão de corte, de forma a quebrar as moléculas do óleo, sendo possível a sua homogeneização com água (Gunetileke & Laurentius, 1974).

Um outro óleo de interesse a explorar, aprovado enquanto *Novel Food*, é o óleo de colza que, para além de antioxidante, apresenta ser um óleo com uma composição rica em vitamina E e ómega-3, fornecendo benefícios à saúde do consumidor (Sachdev, 2021).

Na fermentação láctica dos iogurtes convencionais, a caseína, proteína presente no leite, é suficiente para que um coágulo seja formado, no entanto, nas sobremesas *plant-based* tipo iogurte, onde não são utilizados, por exemplo, leite de soja ou bebida de amêndoa, esse coágulo dificilmente se forma (Chandan et al., 2006).

As alternativas ao iogurte são emulsões de óleo-em-água, sendo, para tal, necessária a adição de espessantes e de ingredientes que fornecessem sabor a essa emulsão (Boukid et al., 2021). Como espessantes a utilizar no desenvolvimento da BTIL foram identificadas a goma xantana, o agar, o amido de milho e a fécula de batata e para disfarçar o sabor característico da proteína utilizada, a baunilha e a canela.

Nas amostras realizadas, os três ingredientes referidos (glucose, proteína e óleo), foram suficientes para a realização de um líquido base vegetal para posterior fermentação com culturas lácticas. Um passo seguinte seria o enriquecimento deste com vitaminas, minerais, fontes de cálcio, entre outros.

### 3.3. Escolha das Proteínas

Foi com recurso ao estudo detalhado da Ficha Técnica de cada concentrado de proteína fornecidos pela Universidade do Minho, bem como à análise da literatura, que sugeriram as proteínas de interesse, utilizadas na formulação das BTIL. Na Tabela 1, encontram-se apresentados os concentrados proteicos escolhidos para a realização das BTIL, bem como cada empresa que os cedeu ao CEB.

**Tabela 1.** Concentrados proteicos utilizados nas formulações

<b>Concentrado proteico</b>	<b>Empresa</b>
Pea protein 80	Aminola
Faba bean meal	Aminola
Lupine protein	Prolupin
Proteína de <i>Aspergillus oryzae</i>	Svampsson

De forma a agilizar o processo de desenvolvimento, estabeleceu-se uma formulação padrão que já tivesse fundamento teórico e/ou experimental na bibliografia. Assim, e com recurso à sua ficha técnica, foi decidido utilizar o concentrado de proteína de ervilha.

Os ingredientes proteicos utilizados nas outras três formulações foram o concentrado proteico de proteína de tremoço, o qual possui um elevado fundamento teórico sobre a utilização em sobremesas *plant-based* tipo iogurte; a farinha de fava, que representa uma das leguminosas com maior abundância no norte de Portugal e é também considerada uma fonte promitente de proteínas na dieta do Homem (Sharan et al., 2021) e o concentrado proteico do fungo *Aspergillus oryzae*, que representa uma proteína *novel*. Foi também testada a proteína de soja, apenas para se tentar reproduzir as sobremesas vegetais da marca *Alpro*.

O isolado de proteína de ervilha é um concentrado de proteína com um perfil rico em aminoácidos, sendo um excelente substituto à proteína de soja. É feito através das ervilhas verdes ou amarelas, sendo que estas passam pelos processos de limpeza e descascamento. De seguida, o componente de amido é removido através de processos de filtração, resultando numa proteína a 81,8 %, em base seca (Aminola, 2022a).

A farinha de fava é composta essencialmente por amido e apresenta apenas 20 % de proteína. Esta possui uma excelente capacidade de ligação devido ao seu teor em amilose. Após descascado e limpo, o feijão da fava passa pelo processo de moagem a seco, e, posteriormente, são separadas a parte rica em proteínas da parte rica em amido, resultando numa farinha amarelada (Aminola, 2022b).

A proteína de tremoço isolada, da marca *Prolupin*, contém cerca de 90 % de proteína na base seca, possuindo uma forte capacidade de emulsão e estabilidade. Em termos de sabor, esta proteína não é considerada como tendo um sabor e aroma fortes, sendo vantajosa a sua utilização (European Circular Bioeconomy Fund, 2022).

O fungo *Aspergillus oryzae*, utilizado como fonte de proteína, da companhia *Svampsson*, já foi testado e aprovado para alimentação. Trata-se de uma *Single-cell protein* e representa uma proteína *novel*. Sendo uma nova fonte de proteína, é ainda escassa a informação sobre a mesma, mas representa uma estratégia promissora de obtenção de fontes proteicas alternativas. Em termos de base seca, este fungo representa 37 % de teor em proteína (Rousta et al., 2021).

## 4. Materiais e Métodos para produção de uma BTIL *plant-based*

### 4.1. Materiais utilizados

Para a realização da parte experimental da presente dissertação, foi necessário o material comum para a execução de um iogurte convencional: uma iogurteira, 14 frascos de vidro com tampa, leite de vaca meio-gordo UHT, leite em pó, e, como cultura *starter*, iogurtes naturais sem açúcar. Tratando-se de uma experiência à base de plantas, foi necessário também bebida de soja e sobremesa de soja com as culturas lácticas desejadas.

Na realização das várias amostras, quer de iogurte convencional, quer da BTIL, foi necessário um conjunto de fontes de proteínas alternativas à animal: concentrado proteico de ervilha, tremoço e soja, farinha de fava e o fungo *Aspergillus oryzae*.

Para todas as amostras, sendo que se tratavam de quantidades de ingredientes diferentes em cada uma, foi necessária uma balança, espátulas, varetas de vidro, e, para a dissolução das proteínas, uma manta de aquecimento com agitador e um agitador magnético.

Para a determinação da acidez titulável foi necessária uma bureta (Anexo D – Figura D.15), uma solução de NaOH, e o indicador de fenolftaleína (Anexo D – Figura D.16). Por sua vez, para a determinação da quantidade de soro (sinérese), foram necessários uma centrífuga e tubos *falcon* de 13 mL (Anexo D – Figura D.17), bem como uma pipeta.

Também foram precisos, para a filtração a vácuo, filtros de microfibras (Anexo D – Figura D.18), um Funil de *Buchner*, um *Kitassato*, uma mangueira e uma bomba de vácuo (Figura 14).



**Figura 14.** Sistema utilizado na filtração a vácuo.

O equipamento utilizado, bem como as respetivas marcas, encontram-se apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Tipo e marca de material necessários para as tarefas experimentais

<b>Métodos</b>	<b>Material</b>	<b>Marca</b>
Fermentação	logurteira	Severin
Pesagem	Balança 1	VWR
	Balança 2	KERN
Medição do pH	Medidor de pH	HANNA instruments
Medição COLAB/cor	Colorímetro	Konica Minolta Inc.
Medição da viscosidade	Viscosímetro	FungiLab
Sinérese	Centrifuga	Hettich Zentrifugen
Peso Seco	Forno	WTC binder
Filtração a vácuo	Bomba de vácuo	-
	Filtros de microfibras	Whatman™

## 4.2. Metodologia

Todas as análises descritas na seguinte secção foram realizadas no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, no Laboratório de Indústria e Processos (LIP) – Figura 15.

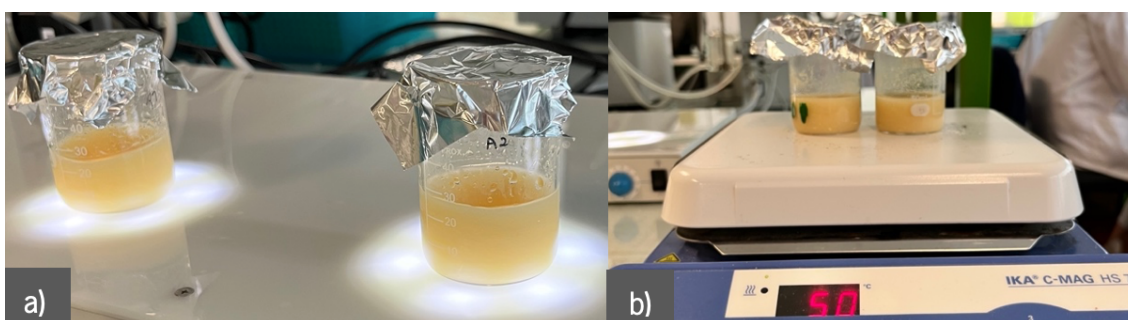


**Figura 15.** Laboratório utilizado na parte laboratorial - LIP.

#### 4.2.1. Análise à solubilidade da proteína através do peso seco

Após as primeiras fermentações, das emulsões óleo-em-água (amostras 4 e 5, referidas nas secções 4.2.3.1. e 4.2.3.2.), percebeu-se que, nem todas as proteínas dissolviam, dificultando a fase da coagulação da proteína. Assim, analisou-se a solubilidade do concentrado proteico de ervilha e fúngico.

Para isso, procedeu-se a uma homogeneização, a 10 % (p/v), da proteína de ervilha. Preparou-se a solução e manteve-se, numa amostra, o pH a 7 e noutra, o pH sem alteração. Prepararam-se 2 ensaios em duplicado: um à temperatura ambiente e outro a 50 °C, com homogeneização, através de agitadores magnéticos, durante 4 horas, como se verifica na Figura 16. Logo após, transferiu-se 3 mL (parte líquida), para um cadinho, o qual se pesou vazio e, posteriormente, com a solução referida.



**Figura 16.** Ensaios realizados em agitação, à temperatura ambiente (a) e a 50 °C (b)).

Essa solução foi mantida a 105 °C, num forno, sendo que, de hora a hora, foi pesada, até o peso se manter constante, constituindo assim, o peso seco, que corresponde à quantidade do concentrado de proteína que solubilizou.

Para a proteína fúngica, procedeu-se de igual forma, alterando apenas a quantidade de proteína utilizada. Neste caso, procedeu-se a uma homogeneização, a 4 % (p/v). Seguiu-se depois o procedimento descrito acima.

#### 4.2.2. Formulação de iogurtes convencionais e sobremesas vegetais

Inicialmente, realizaram-se 3 amostras, duas de iogurte convencional e uma de sobremesa vegetal. Nas amostras 1 e 2, foi estudado o comportamento dos iogurtes com a adição de glucose e lactose. Na amostra 3, que se tratava de uma sobremesa vegetal com recurso à bebida e sobremesa vegetal da marca *Alpro*, foram também testados diferentes tipos de espessante: amido de milho, gelatina em pó e fécula de batata.

Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

##### 4.2.2.1. Preparação da amostra 1

Para a preparação da amostra 1, pesou-se, para cada frasco, 1,7 g de leite em pó.

A cada frasco, foram adicionados 83,0 mL de leite de vaca UHT, e, no ensaio 1B, foi também adicionado 3,5 g de glucose.

##### 4.2.2.2. Preparação da amostra 2

Para a preparação da amostra 2, adicionou-se, em cada frasco, 150,0 mL de leite de vaca meio-gordo UHT. No ensaio B foram adicionadas 0,75 g de glucose e no ensaio C, foram adicionadas 0,75 g de lactose.

##### 4.2.2.3. Preparação da amostra 3

Para a preparação de uma sobremesa vegetal, recorreu-se a uma bebida e a uma sobremesa de soja (como culturas *starter*) da marca *Alpro* (Anexo D, Figura D.14). Misturou-se 600,0 mL de bebida de soja com 100,0 g de iogurte de soja. Dividiu-se a mistura em 4 frascos de vidro.

No ensaio B adicionou-se 3,0 g de amido de milho, no ensaio C, 3,0 g de gelatina em pó incolor, e no ensaio D, 5,0 g de fécula de batata. Ao ensaio A não se adicionou qualquer tipo de espessante.



Todas as amostras referidas (amostras 1 a 3) foram, de seguida, homogeneizadas com recurso a uma vareta de vidro.

Na Tabela 3 é possível ver o resumo dos ingredientes utilizados, bem como a quantidade dos mesmos referentes às amostras 1, 2 e 3.

**Tabela 3.** Ingredientes utilizados nas amostras 1, 2 e 3

Ensaio	Leite (mL)	Bebida vegetal (mL)	Leite em pó (g)	Glucose (g)	Lactose (g)	Amido de Milho (g)	Gelatina em pó (g)	Fécula de batata (g)
1A	82,8	-	1,7	-	-	-	-	-
1B	82,8	-	1,7	3,5	-	-	-	-
1C	82,8	-	1,7	-	-	-	-	-
1D	82,8	-	1,7	-	-	-	-	-
2A	150,0	-	-	-	-	-	-	-
2B	150,0	-	-	0,75	-	-	-	-
2C	150,0	-	-	-	0,75	-	-	-
3A	-	150,0	-	-	-	-	-	-
3B	-	150,0	-	-	-	3,0	-	-
3C	-	150,0	-	-	-	-	3,0	-
3D	-	150,0	-	-	-	-	-	5,0

#### 4.2.3. Formulação e pré-tratamento do líquido base das BTIL

##### 4.2.3.1. Preparação da amostra 4

Para a preparação da amostra 4, pesou-se, para cada frasco, 4,0 g de proteína de ervilha. Nos ensaios B e C, adicionou-se 2,0 g de glucose e 2,0 g lactose, respetivamente.

Ao ensaio A não se adicionou qualquer tipo de açúcar.

##### 4.2.3.2. Preparação da amostra 5

Foram preparados 3 ensaios para a amostra 5, ao qual, para cada um, se adicionou 6,5 g de proteína de ervilha. No ensaio B utilizou-se 4,0 g de glucose e no ensaio C, 4,0 g de lactose.

Ao ensaio A não se adicionou qualquer tipo de açúcar.

#### 4.2.3.3. Preparação da amostra 6

A amostra 6 tratou-se da primeira experiência com três concentrados proteicos diferentes (soja, tremoço e fava). Foram testadas 6 formulações, uma adaptada aos ingredientes da bebida de soja da marca Alpro, outra baseada em Hickisch et al. (2016), e as restantes, meramente a título experimental.

No ensaio A, baseado na bebida de soja, foram adicionadas 4,5 g de proteína de soja, 4,0 g de glucose monoidratada, 3,0 g de óleo de colza e 0,1 g de sal convencional.

No ensaio B, baseado em Hickisch et al. (2016), adicionou-se 3,0 g de concentrado de proteína de tremoço, 3,0 g de glucose monoidratada, 3,0 g de lactose e 7,0 g de óleo de coco

No ensaio C foram misturados, 4,0 g de farinha de fava, 3,0 g de lactose e 3,0 g de óleo de colza.

No ensaio D, foram dissolvidos, 5,0 g de farinha de fava e 4,0 g de glucose.

No ensaio E, 5,0 g de farinha de fava e 3,0 g de óleo de colza.

No último ensaio, F, foram dissolvidas 5,0 g de farinha de fava, 2,0 g de lactose e 3,0 g de óleo de coco.

#### 4.2.3.4. Preparação da amostra 7

No primeiro ensaio da amostra 7, adicionou-se 6,0 g de concentrado de proteína de tremoço, 6,0 g de glucose e 6,0 g de óleo de coco.

No segundo ensaio, B, juntou-se 6,0 g de farinha de fava, 3,0 g de glucose, 3,0 g de óleo de colza e 1,0 g de goma xantana.

No ensaio C, foram misturados 5,0 g de farinha de fava, 4,0 g de glucose e 3,0 g de fécula de batata.

Ao último ensaio, D, foi adicionado 3,0 g de concentrado de proteína de tremoço, 6,0 g de glucose, 6,0 g de óleo de coco e 3,0 g de amido de milho

#### 4.2.3.5. Preparação da amostra 8

Na amostra 8 foram realizados 2 ensaios, A e B.

No primeiro, A, testou-se o aumento da quantidade de concentrado proteico. Assim, juntou-se 12,0 g de concentrado de proteína de tremço, 8,0 g de glucose, 3,0 g de óleo de colza e 1,0 g de aroma de baunilha.

No ensaio B, juntou-se 6,0 g de concentrado de proteína de tremço, 8,0 g de glucose, 7,0 g de óleo de coco, 0,5 g de agar-agar e 1,0 g de aroma a baunilha.

O ensaio B, que continha agar-agar, foi previamente aquecido, de acordo com as indicações presentes na embalagem do agar-agar.

#### 4.2.3.6. Preparação da amostra 9

No ensaio A da amostra 9, foram misturados 6,0 g de farinha de fava, 5,0 g de glucose, 3,0 g de óleo de colza, 0,7 g de agar-agar e 1,0 g de aroma de baunilha.

No ensaio B, foram adicionados 7,0 g de farinha de fava, 5,0 g de glucose, 7,5 g de óleo de coco, 4,0 g de amido de milho e 1,0 g de aroma de baunilha.

Ambas as amostras, após adição de água, foram aquecidas até 30 °C.

#### 4.2.3.7. Preparação da amostra 10 e 11

As amostras 10 e 11 foram preparadas nas mesmas quantidades, sendo que apenas se alterou o tipo de proteína, que foi o concentrado de proteína de tremço e a farinha de fava, respetivamente. Para cada amostra, realizaram-se 2 ensaios, sendo que um era para análise física e química e outro para análise sensorial.

Assim, adicionou-se 6,0 g de proteína, 6,5 g de óleo de coco, 8,0 g de glucose, 4,0 g de amido, 3,0 g de agave, 0,5 g de canela e 0,1 g de sal.

#### 4.2.3.8. Preparação do concentrado de proteína para as amostras 12 e 13

Foi preparada uma solução 10 % (p/v) de proteína de ervilha e uma 3,3333 % (p/v) de proteína fúngica. Ambas as amostras foram homogeneizadas a 50 °C durante 2 h.

De seguida, de forma a utilizar apenas a quantidade de proteína que solubilizou, realizou-se uma filtração a vácuo a cada amostra.

Após a filtração, retirou-se 120 mL da amostra de cada solubilização de concentrado de proteína para se realizar os procedimentos descritos em 4.2.3.9 e 4.2.3.10, para cada amostra. Retirou-se também 3 mL da amostra da proteína de ervilha e 1 mL da proteína fúngica de forma a estudar-se a sua solubilização.

#### 4.2.3.9. Preparação da amostra 12

À preparação descrita em 4.2.3.8, de concentrado proteico de ervilha, foram adicionados 6,5 g de óleo de coco, 8,0 g de glucose, 4,0 g de amido, 2,5 g de agave, 0,5 g de canela e 0,1 g de sal.

#### 4.2.3.10. Preparação da amostra 13

À preparação descrita em 4.2.3.8, para o concentrado proteico fúngico, foram adicionados 8 g de glucose, 6,5 g de óleo de coco e 4,0 g de amido.

Às amostras 4 a 11, foi adicionada água de modo a perfazer um volume de líquido base de 150 mL.

Todas as amostras (4 a 13) foram homogeneizadas com recurso a uma vareta de vidro, após adição de todos os componentes.

Conforme referido na secção 3.2 da presente dissertação, as amostras com óleo de coco, foram homogeneizadas, com recurso a aquecimento e agitação, antes de ser adicionada a proteína.

Na Tabela 4, encontra-se apresentado o resumo das formulações acima referidas (amostra 4 a 13).

**Tabela 4.** Ingredientes utilizados nas amostras 4 a 13

	Ensaio	Proteína (g)	Açúcar		Hidrato de carbono		Espessante				Sabor/Aroma			Sal (g)
			Glucose (g)	Lactose (g)	Óleo de coco (g)	Óleo de colza (g)	Amido de Milho (g)	Fécula de Batata (g)	Goma Xantana (g)	Agar-agar (g)	Baunilha (g)	Canela (g)	Agave (g)	
Proteína de ervilha	4A	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4B	4,0	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4C	4,0	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteína de ervilha	5A	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5B	6,5	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5C	6,5	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteína de soja	6A	4,5	4,0	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Proteína de tremoço	6B	3,0	3,0	3,0	7,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Farinha de fava	6C	4,0	-	3,0	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	6D	5,0	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6E	5,0	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	6F	5,0	-	2,0	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteína de tremoço	7A	6,0	6,0	-	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Farinha de fava	7B	6,0	3,0	-	-	3,0	-	-	1,0	-	-	-	-	-
Farinha de fava	7C	5,0	4,0	-	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-
Proteína de tremoço	7D	3,0	6,0	-	6,0	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-
Proteína de tremoço	8A	12,0	8,0	-	-	3,0	-	-	-	-	1,0	-	-	-
	8B	6,0	8,0	-	7,0	-	-	-	-	0,5	1,0	-	-	-
Farinha de fava	9A	6,0	5,0	-	-	3,0	-	-	-	0,7	1,0	-	-	-
	9B	7,0	5,0	-	7,5	-	4,0	-	-	-	1,0	-	-	-
Proteína de tremoço	10A	6,0	8,0	-	6,5	-	4,0	-	-	-	-	0,5	3,0	0,1
Farinha de fava	11A	6,0	8,0	-	6,5	-	4,0	-	-	-	-	0,5	3,0	0,1
Proteína de ervilha	12A	10 % (p/v)	8,0	-	6,5	-	4,0	-	-	-	-	0,5	2,5	0,1
Proteína fúngica	13A	3,3333 % (p/v)	8,0	-	6,5	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.2.4. Fermentação

Após a dissolução de todos os componentes, foi adicionada a cultura *starter*.

Na Tabela 5, verifica-se a quantidade de iogurte/sobremesa/amostra utilizada, bem como a sua fonte.

**Tabela 5.** Quantidade e fonte de cultura *starter* utilizada para cada amostra

<b>Amostra</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Fonte</b>	
1	15,5	iogurte natural convencional sem açúcar	
2	22	Amostra 1, ensaio A	
3	28,5	iogurte natural convencional sem açúcar	
4	A	20	Amostra 3, ensaio A e B
	B	30	
	C	40	
5	25	Sobremesa da marca Alpro de soja	
6	30	Amostra 3, ensaio D	
7	38	Amostra 6, ensaio B e F	
8	20	Amostra 7, ensaio D	
9	20	Amostra 7, ensaio B	
10	25	Amostra 8, ensaio B	
11	25	Amostra 9, ensaio A	
12	25	Sobremesa da marca Alpro de soja	
13	25	Sobremesa da marca Alpro de soja	

De seguida, mediu-se o pH e incubaram-se os frascos na iogurteira da marca *Severin* durante 18 h. Deu-se assim, o início da fermentação. Mediu-se o pH após cada fermentação.

Após a medição do pH, o iogurte/sobremesa/BTIL foi armazenado a 5 °C durante 24 horas.

#### 4.2.5. Medição da acidez titulável

A medição da acidez titulável deu-se 24 horas após o armazenamento das BTIL a 5 °C.

Antes de começar a titulação, pesou-se 10 g de iogurte/sobremesa/BTIL, em duplicado, e adicionaram-se três gotas do indicador fenolftaleína.

Seguiu-se a titulação, que consistiu em adicionar uma solução básica de NaOH 0,1 M, com recurso a uma bureta, até que o iogurte/sobremesa/BTIL mudasse de cor, passando de branco para cor-de-rosa. Registou-se o volume da solução utilizado em cada titulação.

A preparação das diluições de NaOH e fenolftaleína necessárias encontram-se no Anexo C – Equação C.1, Equação C.2 (NaOH) e Equação C.3 (fenolftaleína).

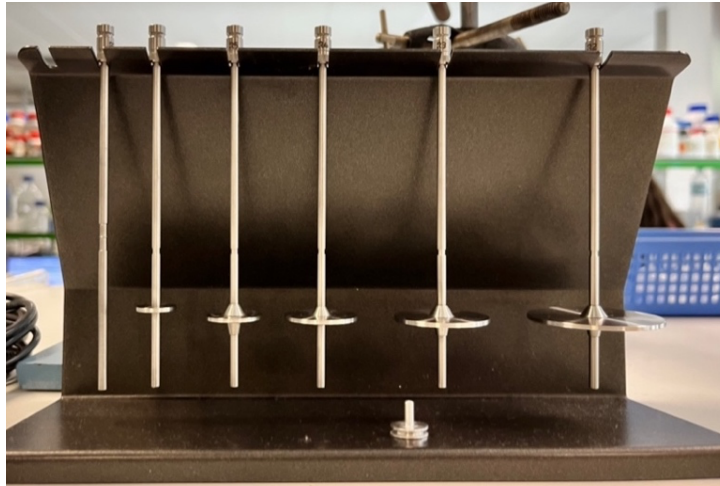
#### 4.2.6. Medição da viscosidade

A viscosidade foi medida através de viscosímetro da marca *FungiLab Expert*. Este foi colocado numa mesa plana e, de seguida, foi ajustado o ângulo e inclinação do mesmo, alinhando-o (Figura 17).



**Figura 17.** Ângulo e inclinação do viscosímetro ajustados.

Nos primeiros ensaios, foi necessário determinar o *spindle* (Figura 18) a utilizar. Para isso, teve de se realizar ensaios, até que a percentagem de torque fosse superior a 15 %, conforme descrito no manual de instruções do viscosímetro utilizado.



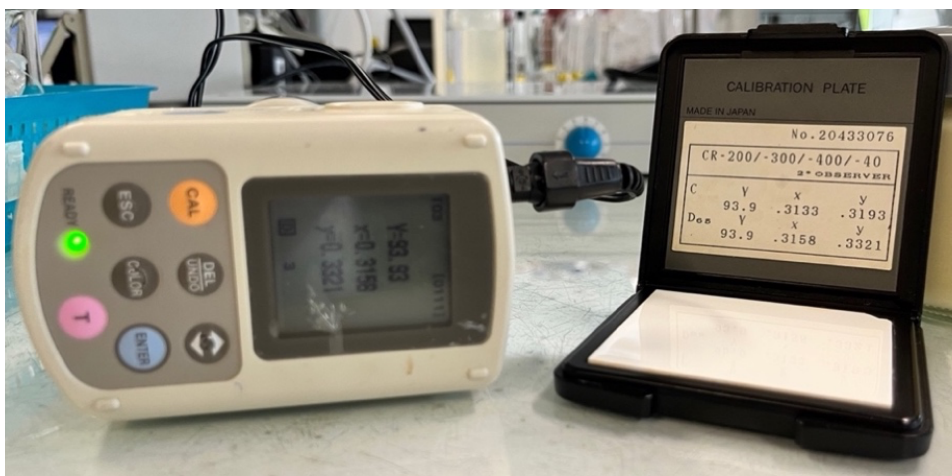
**Figura 18.** *Spindles* disponíveis no LIP, do R7 ao R2, da esquerda para a direita, respetivamente.

Depois de determinado o *spindle*, ligou-se o viscosímetro e esperou-se 10 minutos. Após esse tempo, os valores de temperatura, torque e viscosidade foram retirados, a 10 rpm e 20 rpm.

#### 4.2.7. Análise à cor da bebida tipo iogurte líquido

Em primeiro lugar, calibrou-se o colorímetro da marca *Konica Minolta Inc.* A 8203029, com o mesmo apontado para a caixa branca.

O colorímetro utilizado, bem como a sua caixa branca, podem ser vistos na Figura 19.



**Figura 19.** Colorímetro calibrado e respetiva caixa branca.



Após calibração, envolveu-se o iogurte/sobremesa/BTIL, uniformizando a cor e colocou-se o colorímetro na extremidade aberta de cada frasco de vidro. Retirou-se os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

#### 4.2.8. Determinação da percentagem de sinérese

Pesaram-se os tubos de centrifugação (*falcon* de 13 mL) e transferiu-se, para estes, 7 mL de iogurte/sobremesa/BTIL homogeneizado, em duplicado, para cada amostra realizada.

Centrifugou-se as amostras, durante 5 minutos, com duas velocidades de centrifugação diferentes, 1000 rpm e 5000 rpm. De seguida, descartou-se o soro libertado, com auxílio de uma pipeta, e pesaram-se os tubos novamente.

Anotou-se o peso dos tubos vazios, com o iogurte/sobremesa/BTIL e com o iogurte/sobremesa/BTIL sem soro.

## 5. Resultados e Discussão

Foram realizadas diversas análises às amostras obtidas de forma a estudar-se o seu comportamento.

As análises foram realizadas para as diferentes amostras desenvolvidas, de 1 a 13 (com exceção das amostras 4, 5, 6A e 6E). Registos das diferentes amostras podem ser encontradas no Anexo D, Figura D.1 a D.13.

Para as amostras 4 e 5 observou-se separação de fases, pelo que foi estudada a solubilização do concentrado de proteína de ervilha, não se efetuando outro tipo de análises a essas amostras. Foi também realizado este estudo ao concentrado proteico fúngico. Os resultados obtidos no estudo à solubilização dos concentrados encontram-se na secção 5.1.1.

As amostras 6A e 6E, mostraram-se também com separação de fases. No caso da amostra 6A, esse facto pode dever-se à utilização do concentrado de proteína de soja, cuja não se conhece a sua composição. Como a amostra 6A era apenas a título de experiência, para se reproduzir a sobremesa vegetal da marca *Alpro*, não se realizaram mais ensaios ou testes. No que concerne à amostra 6E, apesar de conter farinha de fava, o óleo utilizado foi o de colza. No ensaio 6C, cuja formulação era idêntica, a fermentação resultou numa BTIL, talvez devido à adição de lactose, que contribuiu para que a fermentação ocorresse, formando um coágulo, ao contrário da amostra 6E, que não possuía nenhum tipo de açúcar, ocorrendo a precipitação do concentrado proteico.

No presente capítulo, nas secções 5.1.2 a 5.1.6, apresentam-se os resultados das análises realizadas às amostras 6 a 13, uma vez que, visualmente, estas consistiram nas amostras mais semelhantes a iogurtes líquidos.

Ainda assim, os resultados obtidos para as amostras 1, 2 e 3 são igualmente apresentados no Anexo B – Tabela B.1 a Tabela B.4, dado que se tratam de iogurtes convencionais (amostras 1 e 2) e sobremesas vegetais (amostra 3).

## 5.1. Apresentação e discussão dos resultados obtidos

### 5.1.1. Solubilização da proteína de ervilha e proteína fúngica

Foi realizado um estudo à solubilização da proteína de forma a perceber se, os concentrados de proteína de ervilha e de proteína fúngica, a diferentes condições de temperatura e pH, solubilizariam mais facilmente.

As amostras A1 e A2 são aquelas que foram homogeneizadas à temperatura ambiente, sendo que a amostra A1 possuía um pH de 5,5 e a amostra A2 um pH mais neutro, de 7,23. Por sua vez, as amostras B1 e B2 foram homogeneizadas a 50 °C, sendo que a primeira (B1) possuía um pH neutro de 7,07 e a segunda (B2), um pH de 5,44. Os resultados obtidos para o concentrado de proteína de ervilha, encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Percentagem de concentrado proteico de ervilha solubilizado

<b>Amostra</b>	<b>Percentagem de concentrado proteico solubilizado (%)</b>
A1	0,4857
A2	0,7616
B1	0,6608
B2	1,2760

Observando a Tabela acima, facilmente se verifica que a amostra B2 foi a que melhor solubilizou, mesmo que numa quantidade muito reduzida (1,2760 %, a pH de 5,44 e 50 °C). Seguida pela amostra à temperatura ambiente com pH neutro, A2 (0,7616 %, a pH de 7,23 e 22,5 °C).

Os resultados obtidos não se mostraram claros, talvez devido a algum erro que tenha ocorrido ao longo das 4 horas de solubilização, por exemplo, alguém, por engano, ter desligado um dos homogeneizadores.

Para a proteína fúngica, foram preparados dois ensaios em duplicado, ambos com pH neutro. As amostras A1 e A2, tinham um pH de 6,96, tendo sido homogeneizadas a 50 °C. As amostras B1 e B2, com um pH de 7,05, foram homogeneizadas à temperatura ambiente, a 22,5 °C.

Na Tabela 7, é possível observar a porcentagem de concentração do concentrado proteico fúngico solubilizado .

**Tabela 7.** Percentagem de concentrado proteico fúngico solubilizado

<b>Ensaio</b>	<b>Concentração do concentrado proteico solubilizado (%)</b>
A1	1,0906
A2	1,4849
B1	3,4651
B2	1,3534

Mais uma vez, os resultados obtidos são um pouco díspares, sendo que a amostra B1 foi a que se mostrou com maior taxa de solubilização, seguida pela amostra A2.

Uma tentativa de melhorar os resultados obtidos passaria, por exemplo, por aumentar o tempo de homogeneização (12 horas ou 24 horas, por exemplo) ou a escolha de outro pH, uma vez que, o pH escolhido poderá ter sido muito perto do ponto isoelétrico da proteína e esta ter precipitado em vez de solubilizado.

### 5.1.2. Medição do pH e da Acidez Titulável

O pH foi utilizado como indicador de fermentação, uma vez que este tem tendência a diminuir à medida que a fermentação ocorre. A acidez titulável está associada ao metabolismo das bactérias lácticas cuja função é a de converter lactose em ácido láctico, diminuindo, por sua vez, o pH do meio. Portanto, o pH e a acidez titulável estão relacionados diretamente.

A acidez titulável, ou acidez total, mede a quantidade de ácido presente num alimento. Neste projeto em específico, a acidez titulável foi medida baseando-se apenas no ácido láctico, que é o ácido com maior relevância na produção de iogurte (ou sobremesas fermentadas).

Os valores de pH obtidos, antes e após a fermentação, bem como os valores de percentagem de ácido láctico e acidez titulável, em graus *Dornic*, encontram-se apresentados a seguir, na Tabela 8.

**Tabela 8.** pH antes e depois de incubar, percentagem de ácido láctico e acidez titulável em graus *Dornic*

<b>Amostra</b>		<b>pH antes de incubar</b>	<b>pH depois de incubar</b>	<b>% ácido láctico</b>	<b>Acidez titulável (°D)</b>
6	B	5,67	4,14	0,5490	54,90
	C	4,98	4,17	0,4815	48,15
	D	5,34	4,20	0,4995	49,95
	F	5,30	4,30	0,5220	52,20
7	A	6,11	5,26	0,4185	41,85
	B	5,37	4,95	0,2970	29,70
	C	4,95	4,71	0,4095	40,95
	D	5,97	4,95	0,4725	47,25
8	A	6,52	5,62	0,5850	58,50
	B	6,55	5,51	0,5490	54,90
9	A	6,34	5,15	0,6705	67,05
	B	6,16	5,10	0,4185	41,85
10	A	6,30	4,91	0,7296	72,90
11	A	6,20	4,61	0,4410	44,10
12	A	5,86	4,60	0,4455	44,55
13	A	5,39	4,27	0,7200	72,00

Através da análise da Tabela acima apresentada, é possível reparar que o pH, após a fermentação da bebida, baixou, mesmo que, em alguns casos, tenha sido uma diferença muito reduzida. A diminuição de pH vai ao encontro do esperado dado que, na fermentação láctica, a secreção do ácido láctico pelas bactérias causa uma diminuição do mesmo (Hetényi et al., 2011).

Para iogurtes convencionais, o valor ideal de pH seria 4,5, ou próximo (Tamime & Robinson, 2000). No entanto, e apesar dos valores obtidos não se encontrarem muito afastados desse ideal, é normal que variem, dado que a sua composição é feita através de diversas tentativas, com recurso a proteínas alternativas e outros agentes espessantes e adoçantes, sem leite.

Segundo a análise de Grasso et al., (2020), o pH das sobremesas *plant-based* varia entre 3,99 e 4,56. Seria de esperar que o pH das BTIL, fosse mais baixo do que o do iogurte convencional analisado (pH = 4,40). Tal não aconteceu e, isso, pode derivar de vários fatores tais como a quantidade de ácido láctico produzido, a quantidade de culturas adicionadas antes da fermentação, o pH de cada proteína utilizada, bem como o dos restantes componentes utilizados nas diferentes formulações.

Analisando a Tabela 8, verifica-se que os valores de acidez, em percentagem de ácido láctico, variam entre 0,2970 % e 0,7290 %. De acordo com Tamime & Robinson (2000), é desejável que a percentagem de ácido láctico varie entre 0,72 % e 1,17 %. No entanto, apenas duas amostras se encontram dentro desta gama de valores (10A e 13A).

A acidez, tal como o pH, pode variar conforme as condições de trabalho e de armazenamento.

São vários os fatores que afetam a análise da acidez titulável, como por exemplo, o facto de que ainda não existem muitos estudos às análises destas sobremesas vegetais, uma vez que as comparações são ainda feitas com recurso aos valores dos iogurtes convencionais produzidos através de leite. Outro fator relevante é a questão da lactose: estas sobremesas vegetais são isentas de leite, portanto as bactérias lácticas são forçadas a concretizar a fermentação com recurso à glucose, e não à lactose. Também a ausência do controlo de temperatura ao longo do processo de refrigeração, após fermentação, pode afetar a AT.

Esta análise é de extrema importância, dado que influencia a qualidade do iogurte, e, neste caso, das BTIL, sendo que há autores que consideram que valores de acidez titulável superiores a 1,17 %, já não deviam ser aceites, sendo sinal de que ocorre pós-acidificação (Tamime & Robinson, 2000).

### 5.1.3. Viscosidade

Sabe-se que a formação de um coágulo, ou seja, a consistência de um iogurte é diretamente proporcional à quantidade de proteína presente (Rani & Singh, 2012).

Até à amostra 7, não se conseguiu determinar a viscosidade das BTIL, uma vez que, com nenhum *spindle* disponível, se obteve uma percentagem de torque superior a 15 %. A partir desta, começou-se a experimentar vários tipos de espessantes e o aumento da quantidade de proteína, obtendo-se os resultados apresentados na Figura 20, construída com recurso à Tabela B.5 do Anexo B.

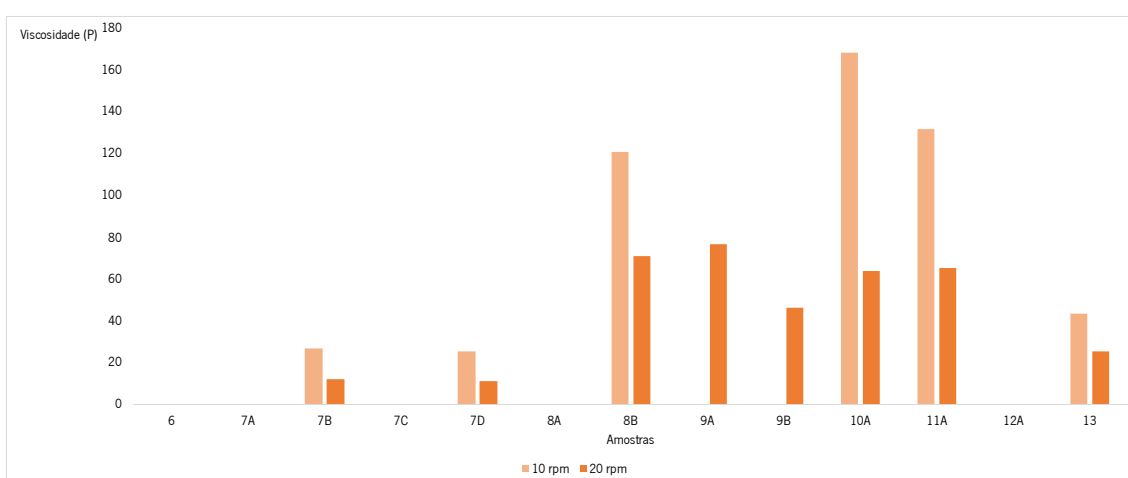


Figura 20. Viscosidade das amostras 6 a 13.

Os valores de viscosidade apresentados encontram-se na unidade poise (P), que se trata de uma unidade de viscosidade dinâmica no sistema CGS (centímetro–grama–segundo) de unidades (Boardman, 2006).

Quando se analisou o iogurte convencional líquido, este não apresentou valores de viscosidade. Isto poderá dever-se ao tipo de *spindle* disponível (a percentagem de torque foi inferior a 15 %).

A amostra 7B e 7D foram aquelas que lhes foi adicionada goma xantana e amido de milho, respetivamente, daí ser possível estudar a sua viscosidade, embora mais baixa em relação às amostras 8B a 13 (exceto 12A), dado que estas últimas sofreram um aumento da quantidade de proteína, para se atingir a textura pretendida.

Os valores mais altos de viscosidade pertencem às amostras finais de viscosidade pretendida (10A e 11A a 20 rpm), que também sofreram um aumento da quantidade de amido de milho que,

por sua vez, resultou num aumento de viscosidade, em relação à amostra 7D, já os valores intermédios pertencem às amostras onde se adicionou agar.

Existe alguma divergência nos valores de viscosidade a 10 rpm e 20 rpm, por exemplo, o facto de não se ter conseguido medir a viscosidade na amostra 9, a 10 rpm. Esse erro pode dever-se ao momento de limpeza do *spindle*, entre amostras, que após se introduzir novamente no viscosímetro, pode ter-se desviado do ângulo do mesmo, o qual deve estar sempre ajustado.

#### 5.1.4. A cor da BTIL

A cor do produto é uma das considerações mais importantes que levam à aceitabilidade por parte do consumidor. Os valores obtidos, com recurso ao colorímetro, de L\*, a\* e b\*, estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores do espaço de cor das diferentes amostras

Amostra		L*	a*	b*
6	B	71,17	-1,33	8,24
	C	77,78	-2,85	9,12
	D	77,16	-3,09	6,82
	F	69,10	-1,02	7,58
7	A	84,49	-0,09	8,66
	B	79,46	-2,34	6,77
	C	81,58	-2,14	5,33
	D	84,12	-0,08	6,48
8	A	79,00	-1,70	18,98
	B	86,05	-1,12	14,29
9	A	83,98	-2,44	12,20
	B	80,85	-1,72	7,54
10	A	76,20	3,37	14,54
11	A	74,89	3,41	13,08
12	A	70,65	2,16	12,49
13	A	65,89	-0,37	15,92

Segundo Milovanovic et al. (2020), a cor dos iogurtes convencionais possui valores de L\* entre 86,2 e 84,8, valores de a\* entre -1,1 e -0,0 e valores de b\* entre 12,1 e 8,1.



Observando a Tabela 9, verifica-se que os valores obtidos se encontram muito próximos, tendo em conta que todas as proteínas utilizadas possuíam uma cor amarelada. Daí o valor positivo de  $b^*$ , uma vez que os valores mais altos de  $b^*$  aproximam-se à cor amarelada; no entanto, a grande maioria dos valores obtidos encontram-se dentro da faixa de valores do iogurte convencional.

Os valores de  $L^*$  correspondem à luminosidade ou brilho. Na amostra 6, a justificação encontrada para que esses valores fossem ligeiramente mais baixos, poderá ser o facto de que nessas amostras ainda não teriam sido adicionados espessantes, os quais fornecem uma maior opacidade às BTIL.

Nas amostras 10, 11 e 12, não só o valor de  $L^*$  diminui ligeiramente, como também são as únicas amostras com  $a^*$  positivo. Tal facto, poderá ser justificado pela adição de canela, como forma de aroma e sabor para as amostras, dado que este ingrediente fornece um tom acastanhado à emulsão.

A amostra 13, que se tratava da amostra com proteína fúngica, a olho nu era apenas ligeiramente mais escura, daí possuir um valor de  $L^*$  mais baixo.

### 5.1.5. Sinérese

Na Tabela 10 está representada a percentagem de sinérese (PS) das amostras 6 (exceto 6A e 6E) a 13, bem como a amostra de comparação que se trata do iogurte convencional, da marca Continente.

**Tabela 10.** Percentagem de sinérese a 1000 rpm e a 5000 rpm das amostras 6 a 13 e da amostra de comparação

Amostra	1000 rpm		5000 rpm	
	% Sinérese média	Desvio Padrão	% Sinérese média	Desvio Padrão
6B	30,9	2,16	69,9	0,19
6C	48,0	2,87	70,4	2,84
6D	53,7	0,57	69,8	1,99
6F	38,4	0,36	72,9	0,17
7A	44,8	1,41	68,0	2,58
7B	13,8	0,13	61,7	2,39
7C	40,8	2,96	69,9	3,32
7D	33,5	1,52	61,0	0,97
8A	41,1	0,48	36,7	0,73
8B	50,0	1,79	39,1	1,30
9A	2,7	2,09	39,2	0,00
9B	13,3	1,89	42,5	0,53
10A	37,4	0,60	52,3	0,35
11A	22,8	2,11	42,8	0,93
12A	30,4	1,79	50,9	0,42
13A	15,6	1,27	55,9	0,33
Amostra de comparação	50,0	2,72	66,0	0,91

Ao observar a Tabela acima, verifica-se que, quanto maior a velocidade de rotação, maior a quantidade de soro libertada, o que vai ao encontro do esperado, sendo que, quanto maior a

velocidade de rotação, maior a força centrífuga associada, provocando assim uma maior colisão entre as moléculas presentes, com uma conseqüente separação de fases (Dönmez et al., 2017).

O exemplo das amostras 6 e 7A, em todos os ensaios, mostram ser as que possuem maiores quantidades de soro liberto (6B, 6C, 6D, 6D e 7A a 30,9 %, 48,0 %, 53,7 %, 38,4 % e 44,8 %, a 1000 rpm e 69,9 %, 70,4 %, 69,8 %, 72,9 % e 68,0 %, a 5000 rpm, respetivamente). Nessas amostras, ainda nenhum espessante tinha sido testado, havendo uma maior quantidade de componentes líquidos e, por sua vez, uma maior quantidade de soro liberto.

Quando se começou a testar os diferentes espessantes, a partir da amostra 7, vários foram os comportamentos a nível da viscosidade é claro, mas também a nível da sinérese, o que faz sentido, uma vez que, o tipo de goma ou farinha utilizados influenciam a formação do gel e a coesão das moléculas (Kunitz, 1928).

Na Tabela 11 está apresentada a forma como variou a percentagem de sinérese, conforme o tipo de espessante e proteína utilizados.

**Tabela 11.** Percentagem de sinérese de acordo com o tipo de espessante e de proteína utilizado

<b>Espessante utilizado</b>	<b>Tipo de proteína</b>	<b>Amostra</b>		<b>% de sinérese a 1000 rpm</b>	<b>% de sinérese a 5000 rpm</b>
Goma Xantana	Fava	7	B	13,8	61,7
Fécula de Batata	Fava	7	C	40,8	69,9
Agar-agar	Tremoço	8	B	50,0	39,1
	Fava	9	A	2,7	39,2
Amido de Milho	Tremoço	7	D	33,5	61,0
	Fava	9	B	13,3	42,5
	Tremoço	10	A	37,4	52,3
	Fava	11	A	22,8	42,8

Examinando a Tabela acima, facilmente se verifica que a percentagem de sinérese da farinha de fava, principalmente a 1000 rpm, é muito inferior à de tremoço. Como referido na secção 3.3 da dissertação, intitulado por “Escolha das Proteínas”, o concentrado de proteína de fava utilizada, trata-se, na realidade de um amido de feijão fava. A libertação mais reduzida de soro vai ao encontro do esperado, dado que esta proteína possui um alto teor em amilose, cuja possui excelentes propriedades de ligação entre as moléculas (Aminola, 2022b). Assim, pode-se

considerar que as amostras com farinha de fava, reagem como se a sua composição incluísse dois tipos de espessantes: a farinha em si e o espessante utilizado.

No que toca aos espessantes utilizados, começando pela goma xantana, esta levou a uma baixa percentagem de sinérese. Segundo Arocas et al., (2009), esta goma é conhecida pela sua capacidade de controlar a sinérese, melhorando a estabilidade do produto a que é adicionada. É também muito utilizada para uma melhor retenção de água e menor firmeza. Assim, a goma xantana é muito utilizada devido à sua alta viscosidade e à sua capacidade de redução da separação de fases (Norton et al., 2011).

De acordo com o estudo feito por Mohamed et al., (2022), a fécula de batata foi dos amidos que, nesse estudo, apresentou menor percentagem de sinérese numa mistura binária de amido com gomas, o que vai contra os resultados obtidos experimentalmente com a amostra 7C. Mesmo tendo sido utilizada a farinha de fava, a amostra com fécula de batata apresentou uma elevada percentagem de sinérese, muito próxima dos limites superiores obtidos. Isto pode ter ocorrido devido, por exemplo, à má dissolução dos componentes, à falta de um maior aquecimento durante a mistura ou também à não utilização de óleo nessa amostra, em relação às outras, cujo poderia ser um bom ponto de ligação dos componentes. É de notar que essa amostra possuía grãos de farinha muito finos, mas visíveis a olho nu, evidenciando uma possível falha na junção dos ingredientes.

O ágar é feito a partir dos polissacarídeos agarose e agarpectina, cujo último pode conter grupos sulfato, facto esse que faz com que, quanto maior for a pressão osmótica do ágar, menor o seu grau de sinérese. À amostra 8B foi adicionado 0,55 g de ágar e à amostra 9A, 0,70 g, sendo que esta última, é também a amostra com farinha de fava que diminui por si só a sinérese. Assim, os valores obtidos na utilização desta goma, vão ao encontro do esperado, uma vez que, uma maior quantidade de ágar adicionado, corresponde a uma menor libertação de soro (Mizrahi, 2010).

A amilopectina é uma molécula abundante nos amidos. Com o passar do tempo, a água que é absorvida pela amilopectina, aquando da emulsão, começa a ser libertada, ocorrendo assim a sinérese (WordPress, 2006). Como se pode observar na Tabela 11, as amostras com amido de milho possuem uma percentagem de sinérese moderada, quando comparadas com a amostra da fécula de batata e de agar-agar.

Em todos os iogurtes convencionais, uma pequena quantidade de soro de leite é visível a olho nu. Por isso, pode-se considerar que a presença de soro não é totalmente indesejada, por parte do consumidor. Assim, pondera-se que as amostras com amido de milho, que apesar de mostrarem uma quantidade razoável de percentagem de sinérese, são as que apresentavam uma textura mais idêntica à do iogurte, uma vez que o agar-agar e a goma xantana se assemelhavam mais a uma textura tipo pudim e a fécula de batata, apresentava uma textura muito farinhada.

#### 5.1.6. Avaliação sensorial

Nos países onde existe uma elevada abundância de alimentos, o consumidor tem direito ao poder de escolha entre esses alimentos. Essa escolha vai ao encontro dos seus desejos, sustentando-se de forma consciente ou inconsciente, nas propriedades apresentadas pelos alimentos: cor, sabor, aroma, textura, entre outros (Rodrigues, 2021).

A avaliação sensorial às BTIL foi realizada através da Ficha de Análise Sensorial, presente no Anexo E da atual dissertação.

Cada amostra foi apresentada a 10 provadores não treinados de diferentes áreas, sendo que, foram sempre as mesmas pessoas a provar/responder nas 6 provas realizadas.

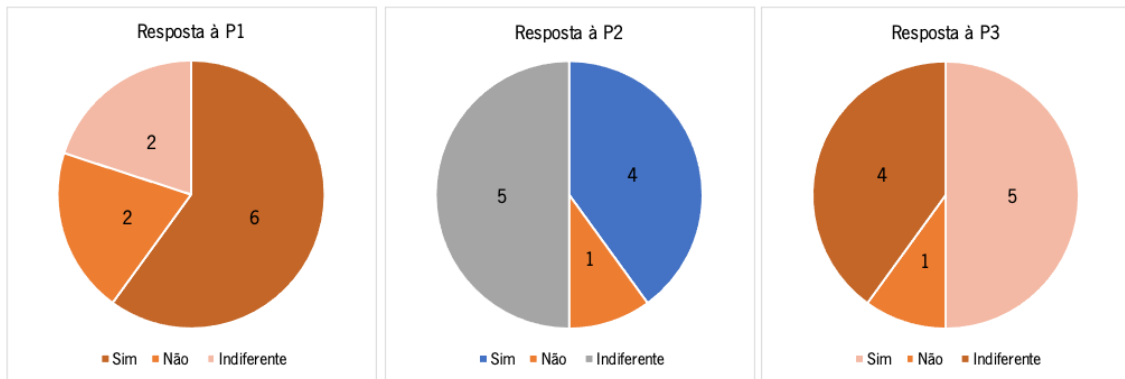
Não se realizou um estudo mais alargado dado que as provas foram realizadas ainda num período pós-pandémico, não sendo possível a junção de muitas pessoas. Adicionalmente, o equipamento disponível para a produção das BTIL não permitia a execução de mais do que 1 L de produto, aproximadamente, por fermentação.

Cada amostra que foi dada a experimentar, encontrava-se descrita por um código de 3 dígitos aleatórios de forma a não influenciar o consumidor. Foram realizadas seis provas e, na Tabela 12, é possível verificar a que código corresponde cada amostra.

**Tabela 12.** Código utilizado para cada amostra à qual foi realizada a análise sensorial

<b>Amostra</b>	7A	7D	8B	9B	10A	11A
<b>Código</b>	234	590	344	845	948	464

A primeira questão feita ao consumidor foi “Gosta de iogurtes líquidos?”.



**Figura 21.** Resposta dos consumidores à pergunta 1 (Resposta à P1), 2 (Resposta à P2) e 3 (Resposta à P3) da Ficha de Análise Sensorial.

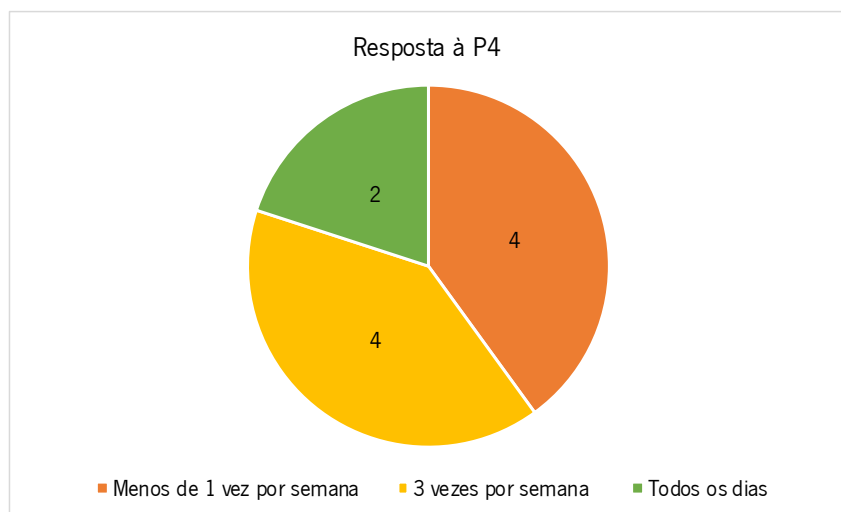
Como se pode verificar na Figura 21 – Resposta à P1, seis pessoas responderam que sim, duas responderam que não e outras duas, que lhes era indiferente. Pode-se concluir que, apesar de ser um estudo muito reduzido, a maioria das pessoas inquiridas gosta de iogurtes líquidos.

Ainda em análise à Figura 21, respondendo à pergunta 2: “Gosta de bebidas vegetais?”, a opinião de cada pessoa variou um pouco, sendo que 5 pessoas disseram que era indiferente, 4 pessoas disseram que sim, e apenas 1 disse que não gosta de bebidas vegetais, sendo um aspeto positivo, uma vez que apenas 10 % dos consumidores do presente estudo não aprecia bebidas vegetais e as BTIL são feitas à base de proteínas vegetais, tentando, com elas, realizar uma bebida vegetal que, após fermentação, seja considerada “tipo iogurte”.

Respondendo à pergunta 3: “É uma pessoa preocupada com o consumo de proteínas animal?”, em análise à Figura 21 - Resposta à P3, 5 pessoas responderam que sim, 4 pessoas disseram que era indiferente e apenas uma disse que não.

Pode-se concluir que, apesar de ser um estudo muito reduzido, a maioria das pessoas poderá ser apreciadora deste tipo de bebidas fermentadas.

A pergunta 4 questionou os consumidores sobre qual a sua frequência de consumo de iogurte líquido. As respostas estão apresentadas na Figura 22.

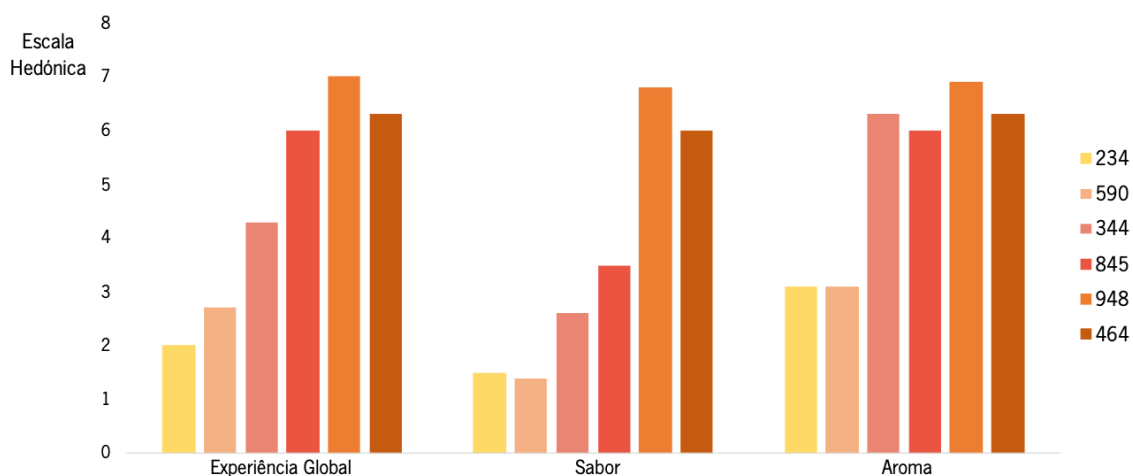


**Figura 22.** Resposta dos consumidores à pergunta 4 da Ficha de Análise Sensorial.

Verifica-se que 40 % das pessoas inquiridas consomem iogurte líquido menos de uma vez por semana, 40 %, pelo menos 3 vezes por semana e 20 % todos os dias.

Através de uma escala hedónica de 8 pontos, que pode ser verificada na Ficha de Análise Sensorial presente no Anexo E, inquiriu-se os consumidores acerca da experiência global de cada BTIL, o seu sabor e o seu aroma.

As médias dos resultados obtidos através da escala hedónica, para as 6 amostras realizadas, encontram-se na Figura 23.

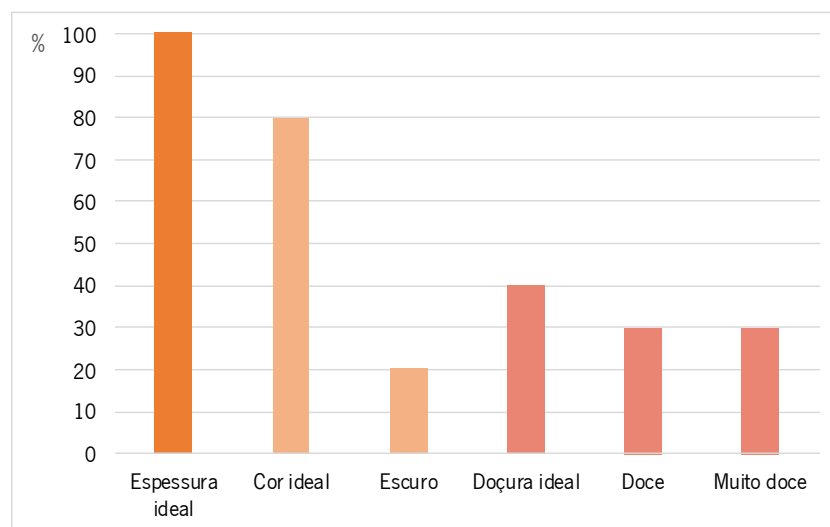


**Figura 23.** Resposta dos consumidores às perguntas 5 (experiência global), 7 (sabor) e 8 (aroma).

Com a análise à Figura anterior, facilmente se verifica que as amostras 234, 590, 344 e 845 não foram apreciadas. O que vai ao encontro do previsto, uma vez que essas, também em estudo à análise sensorial, à textura e à doçura, não obtiveram uma boa classificação, como se pode verificar no Anexo B, Tabela B.9, sendo consideradas muito ou pouco espessas, e muito pouco doces ou pouco doces. Assim, a partir deste ponto, apenas vão ser apresentadas as análises feitas à textura, cor e doçura das duas últimas amostras (948 e 464), dado que obtiveram, na escala hedónica, nos três atributos acima apresentados, um valor superior a 6, revelando serem as amostras para as quais os consumidores demonstraram maior aceitabilidade.

Nas perguntas 6.1, 6.2 e 6.3, foi utilizada a escala JAR (*Just About Right*), a qual mede a adequação do nível de um atributo específico e são usadas para determinar os níveis ótimos de atributos nos produtos, sendo o ponto central da escala o nível ideal para o atributo em análise. Por exemplo, na pergunta 6.1 a escala é: muito pouco espesso – pouco espesso – espessura ideal – espesso – muito espesso.

Assim, para a amostra 948, na Figura 24, estão apresentadas as respostas dos consumidores inquiridos.

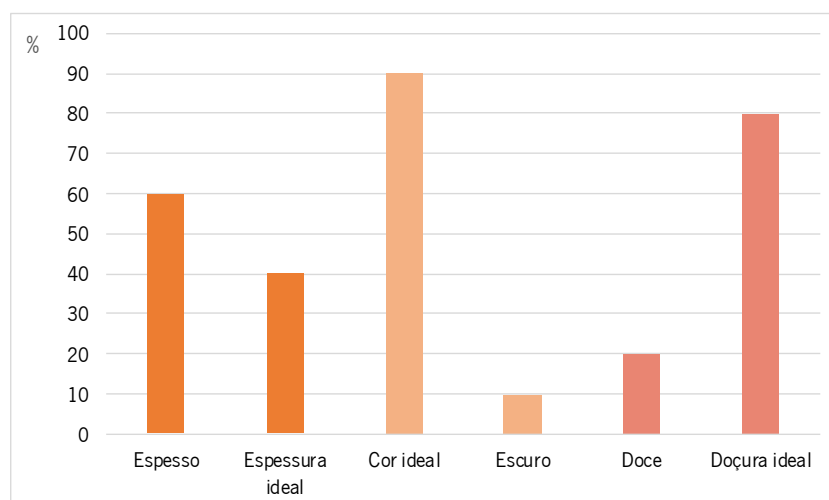


**Figura 24.** Resposta dos consumidores às perguntas 6.1, 6.2 e 6.3 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 948.

Fazendo uma análise à Figura acima, verifica-se que 100 % dos consumidores considerou que esta amostra possuía a espessura ideal e 80 %, a cor ideal. No que se refere à doçura, houve uma certa disparidade de opiniões. Este parâmetro, que se encontra dentro do sabor e aroma, é sempre alvo de discussão, uma vez que, é dos mais subjetivos, dependendo da perceção e preferência de cada individuo e também de fatores culturais (Rodrigues, 2021).



Na Figura 25 estão apresentadas as respostas às perguntas 6.1, 6.2 e 6.3 dos consumidores inquiridos relativos à amostra 464.



**Figura 25.** Resposta dos consumidores às perguntas 6.1, 6.2 e 6.3 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 464.

A textura são as sensações obtidas, neste caso, pela língua, palato e dentes (Rodrigues, 2021). Para esta amostra (amostra 464), já não houve tanta concordância no que se refere à textura.

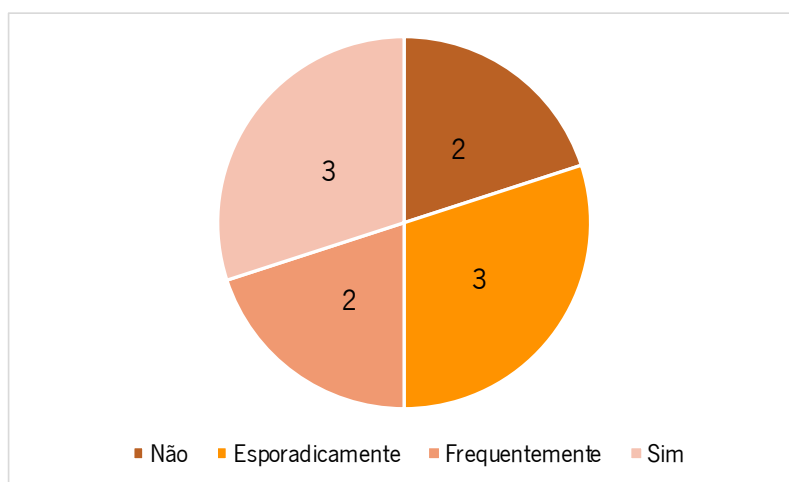
Na amostra 464, 60 % dos inquiridos consideraram a amostra espessa e apenas 40 % a consideraram na espessura ideal. Tais resultados vão ao encontro do expectável, dado que para ambas as amostras (948 e 464) foi utilizada a mesma quantidade de amido de milho. No entanto, esta última, trata-se da amostra que contém a farinha de fava que, como já foi discutido nas secções acima da presente dissertação, se trata de um amido do feijão da fava, alterando, por isso, a textura da amostra.

No que se refere à cor, 90 % dos inquiridos consideram que a BTIL possuía a cor ideal e apenas 10 % a considerou escura. A estas duas últimas amostras foi-lhes adicionada canela, o que interfere com a cor do produto final. Talvez por isso, em ambas as análises, existe 10 % (amostra 464) a 20 % (amostra 948) de inquiridos a referir-se à amostra como sendo escura.

Quanto à doçura, 80 % considerou a amostra 464 como tendo a “doçura ideal”. O facto de possuir mais quantidade de amido (milho e fava), poderá ajudar a disfarçar a doçura “a mais”, considerada na amostra 948, dado que ambas as amostras possuíam a mesma quantidade de glucose.

Poder-se-á dizer que a glucose, não só serviu como arranque para as bactérias lácticas iniciarem a fermentação, mas também “mascararam” o sabor forte da proteína, em todas as amostras experimentadas, diminuindo essa percepção indesejável ao consumidor, sendo por isso, considerada um açúcar com função bloqueadora.

Analisando a pergunta 9, que pergunta ao consumidor se tornaria, ou não, o produto experimentado, parte da sua alimentação, obtiveram-se as respostas apresentadas na Figura 26, para a amostra 948.

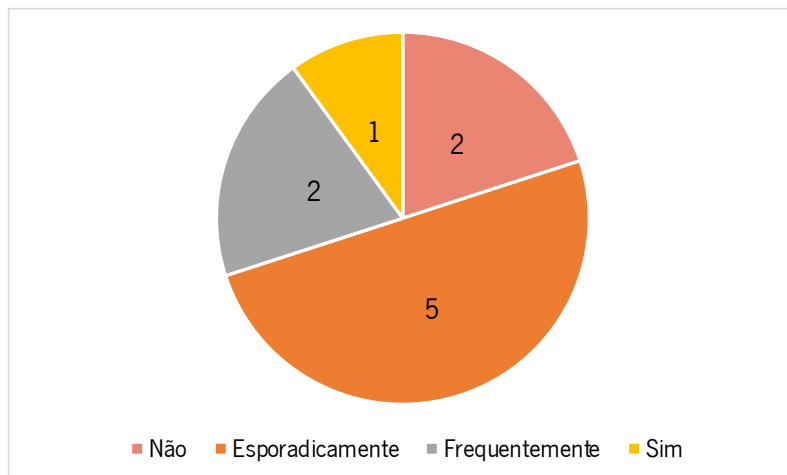


**Figura 26.** Resposta dos consumidores à pergunta 9 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 948.

Através da Figura, verifica-se que três pessoas tornariam esta BTIL apenas esporadicamente parte da sua alimentação habitual e também três pessoas a tornariam, respondendo que sim à pergunta. Duas pessoas responderam que a tornariam frequentemente e outras duas pessoas, que não a tornaria.

É de notar que as duas pessoas que responderam “não”, adicionaram um comentário na questão 10 da Ficha de Análise Sensorial, afirmando que não gostam ou não apreciam o sabor/aroma a canela.

Na Figura 27 encontra-se a resposta à pergunta 9 da Ficha de Análise Sensorial para a amostra 464.



**Figura 27.** Resposta dos consumidores à pergunta 9 da Ficha de Análise Sensorial – amostra 464.

Cinco inquiridos tornariam esporadicamente o produto da amostra 464, parte da sua alimentação, dois frequentemente e um tornaria. Novamente, os mesmos dois inquiridos referidos acima, não o tornariam parte da sua alimentação, dado que não apreciam canela. Foi feito um terceiro comentário à amostra 464, cujo referiu que se tratava de uma amostra muito “farinhada”. Esta justificação também vai ao encontro do que se referiu acima, na discussão da Figura 25, sobre se tratar de dois amidos.

Pode-se concluir então que a amostra 948 foi a que mais sucesso apresentou nestas experiências ao longo de um mês e meio, sendo que, caso houvesse mais tempo, esta seria a amostra a aperfeiçoar e a fazer mais tipos de análises.

## 6. Conclusões

Com o término do estágio curricular e da escrita da presente dissertação, é possível concluir que todos os objetivos foram alcançados, bem como a realização dos *milestones* e *deliverables* propostos inicialmente.

Sendo que o estágio foi, maioritariamente, em escritório, pode-se concluir que, ter um fundamento teórico bem assente e estudado, é meio caminho andado para o sucesso laboratorial. A nível teórico, conseguiu-se organizar cerca de 130 novos alimentos contidos na Lista da União, em três categorias: produtos mais saudáveis, *clean label* e proteínas alternativas, sendo esta última, estudada com mais afinco. Foi também possível fazer uma investigação mais alargada sobre iogurtes e sobremesas vegetais, desde a sua formulação até ao seu embalamento.

As BTIL realizadas laboratorialmente, foram sujeitas a diversas análises: medição de pH, determinação da acidez titulável, da viscosidade, da sinérese e da cor. Por fim, foi praticada uma análise sensorial, realizada por um painel sensorial não treinado.

Todo o produto foi alvo de mudança ao longo do tempo, sendo que a amostra 10A, que continha concentrado de proteína de tremoço e amido de milho, já era considerada agradável, a nível organolético, para alguns provadores. Esta também já possuía a textura ideal, a cor quase ideal, tendo em conta que os concentrados proteicos utilizados possuíam uma cor amarelada, e a doçura e aromas ideais.

Pode-se concluir que, apesar de poder ser ainda alvo de melhoria, o principal objetivo foi alcançado com sucesso! Deu-se a criação de um novo produto alimentar saudável com recurso a proteínas e fontes de açúcar alternativas.

Todo o projeto contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal, social e profissional, mostrando ser uma mais-valia a possibilidade de trabalhar numa empresa como a MC e num centro de investigação tão distinto como o CEB. É sem dúvida um prazer dizer que beneficiei da oportunidade de trabalhar nestes dois locais, que tanto me ensinaram, quer a trabalhar em equipa, quer a “desenrascar” à engenharia.

*Enquanto houver recursos, a indústria alimentar encontrar-se-á sempre em estado de aprendizagem e mudança.*

## 6.1. Sugestão de trabalho futuro

São várias as sugestões de trabalho futuro que podem ser tomadas, de forma a melhorar as BTIL.

Quanto à sua produção, poder-se-ão realizar mais ensaios, tentando acertar a 100 % nas características sensoriais desejadas. Seria também de interesse fazer algumas amostras com fruta ou frutos secos, diferenciando o tipo de sabor/aroma oferecido ao consumidor.

A realização de inquéritos sobre as preferências do consumidor seria também importante para definir os próximos ingredientes a ser utilizados.

Para melhor se controlar as condições de fermentação, seria interessante a utilização de bactérias lácticas liofilizadas.

Seria relevante determinar, nas BTIL realizadas, a quantidade real de proteína solubilizada, por exemplo, com recurso ao método de *Kjeldhal*, segundo a Norma Portuguesa NP 1986-1991, e, com base nos resultados obtidos, tentar melhorar a quantidade de proteína solubilizada, dado que, em alguns casos, apenas o amido poderá ter sido solubilizado.

Outras análises que poderiam ser realizadas são a determinação da matéria gorda pelo método de *Gerber*, segundo a Norma Portuguesa NP 469-1983, a contagem de microrganismos, segundo a Norma Portuguesa NP 1864-1987, a determinação da humidade, do teor de sólidos totais, do teor de cinzas e do teor em lípidos e a determinação dos hidratos de carbono e dos sólidos solúveis.

Um outro estudo a analisar seria a verificação da estabilidade das BTIL, com o passar do tempo, de forma a perceber o tempo de prateleira do produto final.

Numa fase final, seria também vantajoso alargar a análise sensorial realizada, de forma a fazer um estudo de mercado das BTIL, podendo-se depois determinar a viabilidade económica conforme os interesses da população portuguesa.

## Referências Bibliográficas

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 6, pp. 877–902). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Agroscope. (2022). *Sensory Analysis of Food*. <https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/en/home/topics/food/sensory-analysis.html>
- Ahmed, A., Khan, T. A., Dan Ramdath, D., Kendall, C. W. C., & Sievenpiper, J. L. (2022). Rare sugars and their health effects in humans: a systematic review and narrative synthesis of the evidence from human trials. *Nutrition Reviews*, *80*(2), 255–270. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUAB012>
- Aminola. (2022a). *Faba bean starch*. <https://www.aminola.com/en/products/faba-bean-starch/>
- Aminola. (2022b). *Pea protein isolate 80*. <https://www.aminola.com/en/products/pea-protein-isolate-80/>
- Amlund, H., Sele, V., & Sloth, J. J. (2019). Arsenic Exposure from Seafood Consumption. *Encyclopedia of Environmental Health*, 147–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10929-7>
- Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. (2021). *What are novel foods and food ingredients?* <https://www.anses.fr/en/content/what-are-novel-foods-and-food-ingredients>
- Arocas, A., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2009). Improving effect of xanthan and locust bean gums on the freeze-thaw stability of white sauces made with different native starches. *Food Hydrocolloids*, *23*(8), 2478–2484. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2009.08.001>
- Asgar, M. A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., & Karim, A. A. (2010). Nonmeat protein alternatives as meat extenders and meat analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(5), 513–529. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00124.x>
- Baglio, E. (2014). *Chemistry and Technology of Yoghurt Fermentation*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07377-4>

- Berghout, J. A. M., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2015). Understanding the differences in gelling properties between lupin protein isolate and soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 43, 465–472. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.07.003>
- Boardman, R. (2006). *CGS and SI (MKS) unit systems*. <https://www.southampton.ac.uk/~rpb/thesis/node102.html>
- Boukid, F., Lamri, M., Dar, B. N., Garron, M., & Castellari, M. (2021). Vegan alternatives to processed cheese and yogurt launched in the european market during 2020: A nutritional challenge? *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112782>
- Bragazzi, N. L., Martini, M., Saporita, T. C., Nucci, D., Gianfredi, V., Maddalo, F., di Capua, A., Tovani, F., & Marensi, L. (2017). Nutraceutical and functional food regulations in the European Union. *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, 309–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802780-6.00017-1>
- Brito, C. (2021). *Iodo: qual o seu papel no organismo e como obtê-lo*. <https://www.lusiadas.pt/blog/prevencao-estilo-vida/nutricao-dieta/iodo-qual-seu-papel-organismo-como-obte-lo>
- Canon, F., Maillard, M. B., Famelart, M. H., Thierry, A., & Gagnaire, V. (2022). Mixed dairy and plant-based yogurt alternatives: Improving their physical and sensorial properties through formulation and lactic acid bacteria cocultures. *Current Research in Food Science*, 5, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.03.011>
- Centro de Engenharia Biológica. (2022). *Sobre o CEB*. <https://www.ceb.uminho.pt/About>
- Chandan, R. C., White, C. H., Kilara, A., & Hui, Y. H. (2006). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Blackwell Publishing.
- Colab4Food. (2022). *Dieta Plant-Based / 2ª parte*. [https://www.linkedin.com/posts/colab4food\\_food4nutrition-dieta-plant-based-2%C2%AA-activity-6949648359729074176-K\\_4A?utm\\_source=linkedin\\_share&utm\\_medium=member\\_desktop\\_web](https://www.linkedin.com/posts/colab4food_food4nutrition-dieta-plant-based-2%C2%AA-activity-6949648359729074176-K_4A?utm_source=linkedin_share&utm_medium=member_desktop_web)
- Cui, M., Jiang, P., Maillet, E., Max, M., Margolskee, R. F., & Osman, R. (2006). The Heterodimeric Sweet Taste Receptor has Multiple Potential Ligand Binding Sites. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 12).

- de Brabandere, A. G., & de Baerdemaeker, J. G. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of Food Engineering*, 41(3), 221–227. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00096-5)
- de Vries, H., Mikolajczak, M., Salmon, J. M., Abecassis, J., Chaunier, L., Guessasma, S., Lourdin, D., Belhabib, S., Leroy, E., & Trystram, G. (2018). Small-scale food process engineering – Challenges and perspectives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 46, 122–130. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2017.09.009>
- DGAV. (2014). *Novos Alimentos*. <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/generos-alimenticios/garantir-a-seguranca-dos-alimentos/novos-alimentos-2/>
- Dönmez, Ö., Mogol, B. A., & Gökmen, V. (2017). Syneresis and rheological behaviors of set yogurt containing green tea and green coffee powders. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 901–907. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11262>
- EFSA. (2021). *Sweeteners / EFSA*. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/sweeteners>
- EFSA. (2022). Protocol on hazard identification and characterisation of sweeteners. *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.20YY.NNNN>
- European Circular Bioeconomy Fund. (2022). *Prolupin - ECBF*. <https://www.ecbf.vc/prolupin>
- Fasolin, L. H., Pereira, R. N., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Andrade, C. C. P., Ramos, O. L., & Vicente, A. A. (2019). Emergent food proteins – Towards sustainability, health, and innovation. In *Food Research International* (Vol. 125). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>
- Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional. (2017). *Alternative Proteins: The Current Situation*.
- Gilchrist, A., & Nobbs, J. (2017). Colorimetry, Theory. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 328–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00124-2>
- Gobbetti, M., & Calasso, M. (2014). STREPTOCOCCUS | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 535–553. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00324-4>
- Godswill Awuchi, C. (2017). *Sugar Alcohols: Chemistry, Production, Health Concerns and Nutritional Importance of Mannitol, Sorbitol, Xylitol, and Erythritol Article*. [www.ijaar.org](http://www.ijaar.org)



- Grasso, N., Alonso-Miravalles, L., & O'Mahony, J. A. (2020). Composition, Physicochemical and Sensorial Properties of Commercial Plant-Based Yogurts. *Foods*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/FOODS9030252>
- Gunetileke, K. G., & Laurentius, S. F. (1974). Conditions for the separation of oil and protein from coconut milk emulsion. *Journal of Food Science*, *39*(2), 230–233. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1974.TB02863.X>
- Harnett, J., Davey, G., Patrick, A., Caddick, C., & Pearce, L. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Streptococcus thermophilus*. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 143–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00268-5>
- Harrysson, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N. G., Toth, G. B., & Undeland, I. (2018). Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützing, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. *Journal of Applied Phycology*, *30*(6), 3565–3580. <https://doi.org/10.1007/S10811-018-1481-7/TABLES/4>
- Hartmann, C., & Siegrist, M. (2016). Becoming an insectivore: Results of an experiment. *Food Quality and Preference*, *51*, 118–122. <https://doi.org/10.1016/J.FOODQUAL.2016.03.003>
- Hendrich, S. (2016). Novel Foods. *Encyclopedia of Food and Health*, 79–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00486-4>
- Hetényi, K., Németh, Á., & Sevela, B. (2011). Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *50*(3), 293–299. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2011.01.008>
- Hickisch, A., Beer, R., Vogel, R. F., & Toelstede, S. (2016). Influence of lupin-based milk alternative heat treatment and exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the physical characteristics of lupin-based yogurt alternatives. *Food Research International*, *84*, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.037>
- Karam, M. C., Gaiani, C., Hosri, C., Burgain, J., & Scher, J. (2013). Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review. *Journal of Dairy Research*, *80*(4), 400–409. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000514>

- Kerschbaumer, C. (2022). *What is Clean Label?* Austria Juice. <https://www.austriajuce.com/news-blog/what-is-clean-label>
- Key, J. A. (2021). *Acid-Base Titrations – Introductory Chemistry – 1st Canadian Edition*. <https://opentextbc.ca/introductorychemistry/chapter/acid-base-titrations/>
- Kojima, G., Avgerinou, C., Iliffe, S., Jivraj, S., Sekiguchi, K., & Walters, K. (2018). Fruit and Vegetable Consumption and Frailty: A Systematic Review. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 22(8), 1010–1017. <https://doi.org/10.1007/S12603-018-1069-6/FIGURES/1>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. In *Food Science and Human Wellness* (Vol. 8, Issue 1, pp. 16–24). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Kunitz, M. (1928). SYNERESIS AND SWELLING OF GELATIN. *Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research*, 1–3. <http://rupress.org/jgp/article-pdf/12/2/289/1223007/289.pdf>
- Lähteenmäki-Uutela, A., Rahikainen, M., Lonkila, A., & Yang, B. (2021). Alternative proteins and EU food law. *Food Control*, 130, 108336. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108336>
- Lamsal, B., Wang, H., Pinsirodom, P., & Dossey, A. T. (2019). Applications of Insect-Derived Protein Ingredients in Food and Feed Industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(2), 105–123. <https://doi.org/10.1002/AOCS.12180>
- Laurens, L. M. L., Markham, J., Templeton, D. W., Christensen, E. D., Wychen, S. van, Vadelius, E. W., Chen-Glasser, M., Dong, T., Davis, R., & Pienkos, P. T. (2017). Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction. *Energy Environ. Sci*, 10, 1716–1738. <https://doi.org/10.1039/c7ee01306j>
- Ly, B. C. K., Dyer, E. B., Feig, J. L., Chien, A. L., & del Bino, S. (2020). Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(1), 3-12.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2019.11.003>

- Lynch, H., Johnston, C., & Wharton, C. (2018). Plant-Based Diets: Considerations for Environmental Impact, Protein Quality, and Exercise Performance. *Nutrients* 2018, Vol. 10, Page 1841, 10(12), 1841. <https://doi.org/10.3390/NU10121841>
- Magenis, R. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Cerqueira, N. G., Oliveira, R. V. B., Soldi, V., & Benedet, H. D. (2006). Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(5), 560–568. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2005.01100.X>
- Mayo Clinic. (2022). *Artificial sweeteners and other sugar substitutes*. <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/artificial-sweeteners/art-20046936>
- MC. (2022a). *Eixos Estratégicos - MC*. <https://mc.sonae.pt/eixos-estrategicos/>
- MC. (2022b). *História - MC*. <https://mc.sonae.pt/historia/>
- MC. (2022c). *Valores - MC*. <https://mc.sonae.pt/valores/>
- MC, & Lima, P. (2022). *ONBOARDING Sonae MC - Welcome People*.
- MeliBio. (2022). *Our Why — MeliBio - Better for humans. Better for bees*. <https://www.melibio.com/our-why>
- Metrohm. (n.d.). *Analysis of dairy products - Application Bulletin*.
- Millward, D. J. (2012). Identifying recommended dietary allowances for protein and amino acids: A critique of the 2007 WHO/FAO/UNU report. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1017/S0007114512002450>
- Milovanovic, B., Djekic, I., Miocinovic, J., Djordjevic, V., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Mörlein, D., & Tomasevic, I. (2020). What is the color of milk and dairy products and how is it measured? *Foods*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/FOODS9111629>
- Mittelheuser, J. (2018). *Masking & Blocking: A Tale of Two Technologies*. <https://www.fona.com/articles/2018/04/masking-blocking-a-tale-of-two-technologies>

- Mizrahi, S. (2010). Syneresis in food gels and its implications for food quality. In *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* (pp. 324–348). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9781845699260.2.324>
- Mohamed, A., Hussain, S., Alamri, M. S., Ibraheem, M. A., Abdo Qasem, A. A., & Ababtain, I. A. (2022). Physicochemical Properties of Starch Binary Mixtures with Cordia and Ziziphus Gums. *Processes* 2022, Vol. 10, Page 180, 10(2), 180. <https://doi.org/10.3390/PR10020180>
- Montemurro, M., Pontonio, E., Coda, R., & Rizzello, C. G. (2021). Plant-based alternatives to yogurt: State-of-the-art and perspectives of new biotechnological challenges. In *Foods* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10020316>
- Mwangi, M. N., Oonincx, D. G. A. B., Stouten, T., Veenenbos, M., Melse-Boonstra, A., Dicke, M., & van Loon, J. J. A. (2018). Insects as sources of iron and zinc in human nutrition. *Nutrition Research Reviews*, 31(2), 248–255. <https://doi.org/10.1017/S0954422418000094>
- Narvhus, J. A., & Abrahamsen, R. K. (2022). Yogurt: Role of Starter Culture. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 496–501. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00226-9>
- National Center for Biotechnology. (2022). *Homolactic fermentation / Pathway*. BioCyc. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pathway/BioCyc:METANAEROFrucat-PWY>
- Nick's Ice Cream. (2022). *Meet Nick, the Swede behind the ice cream*. <https://nicks.com/pages/our-story>
- Norton, I. T., Spyropoulos, Fotios., & Cox, Philip. (2011). *Practical food rheology: an interpretive approach*. Blackwell.
- Pimentel, F. B., Alves, R. C., Harnedy, P. A., FitzGerald, R. J., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Macroalgal-derived protein hydrolysates and bioactive peptides: Enzymatic release and potential health enhancing properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 106–124. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.09.006>
- Popping, B., & Diaz-Amigo, C. (2014). pH and Tritable Acidity. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 2931.
- Portelinha, D., António, V., & Costa, M. (2013). *Valorização do soro para produção de iogurte*. Universidade do Minho.

- Princeton. (2022). *DEFINITION OF VISCOSITY*. [https://www.princeton.edu/~gasdyn/Research/T-C\\_Research\\_Folder/Viscosity\\_def.html](https://www.princeton.edu/~gasdyn/Research/T-C_Research_Folder/Viscosity_def.html)
- Rani, R., & Singh, B. (2012). *Factors Affecting Syneresis in Yoghurt: a review* (Vol. 23).
- Real, H., Barbosa, M., & Carvalho, T. (2016). *Conhecer o leite*. [www.apn.org.pt](http://www.apn.org.pt)
- Robinson, R. K. (1994). *Modern Dairy Technology*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2057-3>
- Rodrigues, L. (2021). *Apontamentos teóricos das aulas de Ciência e Engenharia dos Alimentos: Análise sensorial*.
- Rousta, N., Hellwig, C., Wainaina, S., Lukitawesa, L., Agnihotri, S., Rousta, K., & Taherzadeh, M. J. (2021). Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* for Food: From Submerged Cultivation to Fungal Burgers and Their Sensory Evaluation—A Pilot Study. *Foods*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/FOODS10112774>
- Sachdev, P. (2021). *What is rapeseed oil and what are the benefits and risks of using it?* <https://www.webmd.com/diet/what-to-know-about-rape-seed-oil>
- Sexton, A. E., Garnett, T., & Lorimer, J. (2019). Framing the future of food: The contested promises of alternative proteins. *Environment and Planning E: Nature and Space*, *2*(1), 47–72. <https://doi.org/10.1177/2514848619827009>
- Sharan, S., Zanghelini, G., Zotzel, J., Bonerz, D., Aschoff, J., Saint-Eve, A., & Maillard, M. N. (2021). Fava bean (*Vicia faba* L.) for food applications: From seed to ingredient processing and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(1), 401–428. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12687>
- Soult, A. (2020). Lactic Acid Fermentation. *LibreTexts*.
- Specht, L. (2021). *The science of fermentation*. <https://gfi.org/science/the-science-of-fermentation/>
- Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., You, L., Zhang, J., Liu, Y., Ma, L., Gao, J., & Dong, Y. (2016). Transforming insect biomass into consumer wellness foods: A review. *Food Research International*, *89*, 129–151. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.10.001>

- Sweetener R&D Academy. (2021). *Clean Label Sweetness Modulators - Sweetener Systems Conference*. <https://sweeteners.globalfoodforums.com/sweetener-systems-articles/clean-label-sweetness-modulators/>
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2000). *Yoghurt: Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited.
- Tarhini, M., Greige-Gerges, H., & Elaissari, A. (2017). Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *International Journal of Pharmaceutics*, 522(1–2), 172–197. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.01.067>
- Teixeira, P. (2014). LACTOBACILLUS | *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 425–431. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00177-4>
- Teng, T. S., Chin, Y. L., Chai, K. F., & Chen, W. N. (2021). Fermentation for future food systems. *EMBO Reports*, 22(5). <https://doi.org/10.15252/embr.202152680>
- Teodoro, M. (2022). *The Future of Ingredients - 2022: Consumer market research report*. <https://store.mintel.com/report/the-future-of-ingredients-market-report>
- Turner, A., Veysey, M., Keely, S., Scarlett, C. J., Lucock, M., & Beckett, E. L. (2020). Intense sweeteners, taste receptors and the gut microbiome: A metabolic health perspective. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 11, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114094>
- União Europeia. (2008). Regulamento (CE) N.º 1331/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- União Europeia. (2011). Regulamento (CE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- União Europeia. (2015). Regulamento (CE) N.º 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de novembro de 2015. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- União Europeia. (2017). Regulamento de Execução (UE) 2017/ 2470 da Comissão de 20 de dezembro de 2017. *Jornal Oficial Da União Europeia*.

- van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 58, 563–583. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-120811-153704>
- Vieira de Mendonça, H., Assemany, P., Abreu, M., Couto, E., Maciel, A. M., Duarte, R. L., Barbosa dos Santos, M. G., & Reis, A. (2021). Microalgae in a global world: new solutions for old problems? *Renewable Energy*, 165, 842–862. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2020.11.014>
- Waschulin, V., & Specht, L. (2018). *Cellular agriculture: An extension of common production methods for food*.
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A. G., Camire, M. E., & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 949–982). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>
- Wikipédia, a enciclopédia livre. (2017). *Acidose láctica*. [https://pt.wikipedia.org/wiki/Acidose\\_l%C3%A1ctica](https://pt.wikipedia.org/wiki/Acidose_l%C3%A1ctica)
- WordPress. (2006). *Starch / Lab Cat*. <https://cdavies.wordpress.com/2006/10/05/starch/>
- Zeece, M. (2020). Flavors. *Introduction to the Chemistry of Food*, 213–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809434-1.00006-2>
- Zielińska, E., Baraniak, B., Karaś, M., Rybczyńska, K., & Jakubczyk, A. (2015). Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*, 77, 460–466. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.09.008>

# Anexos

## Anexo A – Mapeamento *Novel Foods*

Nas Figuras a seguir, está representado um exemplo do mapeamento feito da Lista da União, que foi posteriormente organizado em três categorias. Numa primeira etapa, reuniu-se toda a informação sobre todos os ingredientes/alimentos contidos na Lista (Figura A.1), dividindo-a em três categorias: produtos mais saudáveis (Figura A.2), *Clean Label* (Figura A.3) e proteínas alternativas (Figura A.4).

Novo Alimento Autorizado	Para que serve?	Bibliografia	Forma de obtenção	Bibliografia
Ácido N-acetil-D-neuramínico	O ácido N-acetilneuramínico é um ácido N-acilneuramínico onde o grupo N-acil é especificado como acetil. Tem um papel como <u>antioxidante</u> , um EC 3.2. 1.18 (exo-alfa-sialidase) <u>inibidor</u> , um <u>metabólito bacteriano</u> , um <u>metabólito humano</u> e um <u>metabólito de rato</u> .	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Acetyl-Neuraminic-Acid">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Acetyl-Neuraminic-Acid</a>	O ácido neuramínico é um componente importante das cadeias de polissacarídeos nas glicoproteínas e glicolipídios das membranas celulares. Este composto de nove carbonos é formado pelo amino-açúcar manosamina e ácido pirúvico; geralmente o N é acilado, formando ácidos sílicos.	<a href="https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/neuraminic-acid">https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/neuraminic-acid</a>
Polpa seca do fruto de <i>Adansonia digitata</i> (embondeiro)	Composição fenólica, vitamina C e actividade <u>antioxidante</u> , emulsionante	<a href="https://acrfp.food.gov.uk/sites/default/files/mmt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/baobabapplicationfinal.pdf">https://acrfp.food.gov.uk/sites/default/files/mmt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/baobabapplicationfinal.pdf</a>	Os frutos são apanhados das árvores, e as cascas duras são partidas e a polpa separada das sementes e da casca. Este é moído, separado em lotes claros e finos (tamanho de partícula 3-600µ) e então embalado. Durante o processamento, o teor de humidade cai de um valor já baixo para um material resultante que é de cerca de 10 % a 13 % quando embalado.	<a href="https://acrfp.food.gov.uk/sites/default/files/mmt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/baobabapplicationfinal.pdf">https://acrfp.food.gov.uk/sites/default/files/mmt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/baobabapplicationfinal.pdf</a>
Extrato de <i>Ajuga reptans</i> de culturas de células	<u>Antioxidante</u> .	<a href="https://incbeauty.com/ingredients/198-ajuga-reptans-cell-culture-extract">https://incbeauty.com/ingredients/198-ajuga-reptans-cell-culture-extract</a> ; <a href="https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4081/ijas.2009.42.655?readAccess=true">https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4081/ijas.2009.42.655?readAccess=true</a>	Folhas jovens de <i>Ajuga reptans</i> são desidratadas e esterilizadas por NaOCl e Polisorbato 20. A linhagem de células vegetais IRBN22 foi utilizada para os fermentadores de cultura Industrial A. <i>reptans</i> e as culturas de células IRBN22 obtidas no final do processo de fermentação foram armazenadas, homogeneizadas, separadas por centrifugação e o resíduo sólido descartado.	<a href="https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006295208007923?token=56778848380AD7BF212657C94F80489031819F72D5849B0F36F6D90D113720AC21A295D7C1930395F28FA444F2F227082&amp;origin=elsevier.com-west-3&amp;originCreation=20220323100633">https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006295208007923?token=56778848380AD7BF212657C94F80489031819F72D5849B0F36F6D90D113720AC21A295D7C1930395F28FA444F2F227082&amp;origin=elsevier.com-west-3&amp;originCreation=20220323100633</a>
L-Alanil-L-glutamina	A L-Alanil-L-glutamina também é empregada como <u>fonte de proteína na alimentação especial</u> como a <u>alimentação parentérica</u> , já que parece reduzir as complicações infecciosas e a tolerância à glicose em pacientes em estado crítico; Isso reduz a translocação bacteriana, o risco de infecção, danos inflamatórios induzidos por infecção e sintomas associados à infecção, como diarreia, desidratação, má absorção e desequilíbrios eletrolíticos	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Alanyl-L-glutamine">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Alanyl-L-glutamine</a>	Produção fermentativa de L-alanil-L-glutamina por uma cepa de <i>Escherichia coli</i> geneticamente modificada expressando L-aminoácido alfa-ligase; Engenharia metabólica de <i>Escherichia coli</i> para produção eficiente de L-alanil-L-glutamina; Produção enzimática de L-alanil-L-glutamina por <i>E. coli</i> recombinante que expressa α-aminoácido éster aciltransferase de <i>Sphingobacterium siyangensis</i> ; Produção de L-alanil-L-glutamina pela reciclagem de <i>E. coli</i> expressando α-aminoácido éster aciltransferase	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720844/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720844/</a> ; <a href="https://link.springer.com/article/10.1186/12934-020-01369-2">https://link.springer.com/article/10.1186/12934-020-01369-2</a> ; <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417308957">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417308957</a>
Óleo da microalga <i>Ulkenia</i> sp.	Fonte de ômega-3.	artigo: Development Prospect and Preparation Technology of Edible Oil From Microalgae	O método mais comum e simples para extrair óleo de microalgas de células quebradas é a extração com solvente orgânico. Atualmente, hexano e etanol têm sido amplamente utilizados na extração de óleo comestível, mas cloroformo, metano, benzeno e outros solventes orgânicos são tóxicos e, portanto, não aplicáveis.	artigo: Development Prospect and Preparation Technology of Edible Oil From Microalgae

Figura A. 1. Exemplo de uma parte do mapeamento geral dos alimentos contidos na Lista da União.



		Legislação Novel Foods					Literatura				
Responde à temática	Sub-tema(s)	Novo alimento autorizado	Obtenção	Condições em que o novo alimento pode ser utilizado		Requisitos específicos de rotulagem adicionais	Outros requisitos	Proteção de Dados	Usabilidade/interesse do novo ingrediente	Implicações de aplicação (alinhado com categorias aprovadas)	Aplicações perante a literatura
				Categoria especificada de alimentos	Níveis máximos						
Produtos mais saudáveis	Gordura, funcionalização	Óleo da microalga <i>Ulkenia</i> sp.	O método mais comum e simples para extrair óleo de microalgas de células quebradas é a extração com solvente orgânico. Atualmente, hexano e etanol têm sido amplamente utilizados na extração de óleo comestível, mas cloroformio, metano, benzeno e outros solventes orgânicos são tóxicos e, portanto, não aplicáveis.	Produtos de panificação (pães, pãesinhos e bolachas e biscoitos adicionados de edulcorantes)	200 mg/100 g	A designação do novo alimento a utilizar na rotulagem dos géneros alimentícios que o contêm deve ser «óleo da microalga <i>Ulkenia</i> sp.»	—	—	gordura "mais saudável" - aporte de ácidos gordos omega-3, em específico DHA	sabor	alimentos enriquecedores ou como suplementos nutricionais
				Barras de cereais	500 mg/100 g						
				Bebidas não alcoólicas (incluindo bebidas lácteas)	60 mg/100 ml						
Produtos mais saudáveis	Gordura, funcionalização	Óleo de semente de <i>Allanblackia</i>	obtido a partir de métodos de prensagem bruta e de extração com solvente	Produtos gordos para barrar de cor amarela e pastas para barrar à base de natas.	20 g/100 g	A designação do novo alimento a utilizar na rotulagem dos géneros alimentícios que o contêm deve ser «óleo de semente de <i>Allanblackia</i> »	—	—	óleo vegetal	sabor, textura	alternativa à manteiga de cacau
Produtos mais saudáveis	Gordura	Óleo de krill-do-antártico de <i>Euphausia superba</i>	Extração do crustáceo <i>Euphausia superba</i> (Krill Antártico) com acetona. As proteínas e o material de krill são removidos do extrato lipídico por filtração. A acetona e a água residual são removidas por etapas de evaporação subsequentes. Óleo obtido por extração do crustáceo <i>Euphausia superba</i> (Krill Antártico) com acetona.	Produtos lácteos, exceto bebidas lácteas	200 mg/100 g ou, para produtos de queijo, 600 mg/100 g	A designação do novo alimento a utilizar na rotulagem dos géneros alimentícios que o contêm deve ser «extrato lipídico do crustáceo krill-do-antártico ( <i>Euphausia superba</i> )»	—	—	nova fonte alternativa e sustentável para PUFA de cadeia longa n-3. O óleo de Krill também contém antioxidantes como astaxantina e vitaminas A e E		
				Sucedâneos de produtos lácteos, exceto bebidas	200 mg/100 g ou, para sucedâneos de produtos de queijo, 600 mg/100 g						
				Bebidas não alcoólicas; bebidas lácteas; bebidas de sucedâneos de produtos lácteos	80 mg/100 ml						
				Gorduras para barrar e guarnições	600 mg/100 g						
				Gorduras para cozinhar	360 mg/100 ml						
				Cereais para pequeno-almoço	500 mg/100 g						
				Produtos de panificação (pães, pãesinhos e bolachas e biscoitos adicionados de edulcorantes)	200 mg/100 g						
				Barras nutritivas/barras de cereais	500 mg/100 g						
				Suplementos alimentares, tal como definidos na Diretiva 2002/46/CE	3 000 mg/dia para a população em geral 450 mg/dia para mulheres grávidas e lactantes						
				Alimentos destinados a fins medicinais específicos, tal como definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013	Em conformidade com as necessidades nutricionais específicas das pessoas a que os produtos se destinam						
Substitutos integrais da dieta para controlo do peso, tal como definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013 e substitutos de refeição para controlo do peso	250 mg/refeição										
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças pequenas abrangidos pelo Regulamento (UE) n.º 609/2013	200 mg/100 ml										
Alimentos adaptados a um esforço muscular intenso, sobretudo para os desportistas											
Alimentos que ostentam menções sobre a ausência ou a presença reduzida de glúten em conformidade com os requisitos do Regulamento de Execução (UE) n.º 828/2014 da Comissão											

Figura A. 2. Exemplo de uma parte da folha Excel com os produtos mais saudáveis.

Responde à temática	Sub-tema(s)	Novo alimento autorizado	Obtenção	Legislação Novel Foods				Literatura			
				Condições em que o novo alimento pode ser utilizado		Requisitos específicos de rotulagem adicionais	Outros requisitos	Proteção de Dados	Usabilidade/interesse do novo ingrediente	Implicações de aplicação (alinhado com categorias aprovadas)	Aplicações perante a literatura
				Categoria especificada de alimentos	Níveis máximos						
Clean label	Antioxidante	Ácido N-acetil-D-neuramínico	O ácido neuramínico é um componente importante das cadeias de polissacarídeos nas glicoproteínas e glicolipídios das membranas celulares. Este composto de nove carbonos é formado pelo amino-açúcar manosamina e ácido pirúvico; geralmente o N é acliado, formando ácidos siálicos.	Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, tal como definidas no Regulamento (UE) n.º 609/2013	0,05 g/l de fórmula reconstituída	A designação do novo alimento a utilizar na rotulagem dos géneros alimentícios que o contenham deve ser «ácido N-acetil-D-neuramínico». Os suplementos alimentares que contêm ácido N-acetil-D-neuramínico devem ostentar uma menção que indique que o suplemento alimentar não deve ser ministrado a lactentes, crianças pequenas e crianças com menos de 10 anos caso consumam, no mesmo período de vinte e quatro horas, leite materno ou outros alimentos com adição de ácido N-acetil-D-neuramínico. Outros requisitos	—	—	Antioxidante e inibidor		
				Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças pequenas, tal como definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013	0,05 g/kg para alimentos sólidos						
				Alimentos destinados a fins medicinais específicos para lactentes e crianças pequenas, tal como definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013	Em conformidade com as necessidades nutricionais específicas dos lactentes e crianças pequenas a que os produtos se destinam mas, em qualquer caso, não superiores aos níveis máximos especificados no quadro relativamente à categoria correspondente aos produtos						
				Substitutos integrais da dieta para controlo do peso, tal como definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013	0,2 g/l (bebidas) 1,7 g/kg (barras)						
				Alimentos que ostentam menções sobre a ausência ou a presença reduzida de glúten em conformidade com os requisitos do Regulamento de Execução (UE) n.º 828/2014 da Comissão	1,25 g/kg						
				Produtos à base de leite pasteurizados e esterilizados (incluindo ultrapasteurizados – UHT) não aromatizados	0,05 g/l						
				Produtos à base de leite fermentados não aromatizados, tratados termicamente após a fermentação, produtos lácteos fermentados aromatizados, incluindo os produtos tratados termicamente	0,05 g/l (bebidas) 0,4 g/kg (sólidos)						
				Sucedâneos de produtos lácteos, incluindo branqueadores para bebidas	0,05 g/l (bebidas) 0,25 g/kg (sólidos)						
				Barras de cereais	0,5 g/kg						
				Edulcorantes de mesa	8,3 g/kg						
				Bebidas à base de fruta e de produtos hortícolas	0,05 g/l						
				Bebidas aromatizadas	0,05 g/l						
				Café especial, chá, infusões de plantas e de frutos, chicória; extratos de chá, de infusões de plantas e de frutos e de chicória; preparações à base de chá, plantas, frutos e cereais para infusões	0,2 g/kg						
Suplementos alimentares, tal como definidos na Diretiva 2002/46/CE	300 mg/dia para a população em geral com mais de 10 anos 55 mg/dia para lactentes 130 mg/dia para crianças pequenas 250 mg/dia para crianças entre os 3 e os 10 anos										

Figura A. 3. Exemplo de uma parte da folha Excel com os produtos *Clean Label*.

Responde à temática	Sub-tema(s)	Novo alimento autorizado	Obtenção	Legislação Novel Foods					Literatura			
				Condições em que o novo alimento pode ser utilizado		Requisitos específicos de rotulagem adicionais	Outros requisitos	Proteção de Dados	Usabilidade/interesse do novo ingrediente	Implicações de aplicação (alinhado com categorias aprovadas)	Aplicações perante a literatura	
				Categoria especificada de alimentos	Níveis máximos							
Proteína Alternativa		L-Alanil-L-glutamina	Produção fermentativa de L-alanil-L-glutamina por uma cepa de <i>Escherichia coli</i> geneticamente modificada expressando L- aminoácido alfa ligase; Engenharia metabólica de <i>Escherichia coli</i> para produção eficiente de L-alanil-L-glutamina; Produção enzimática de L-Alanil-L-glutamina por <i>E. coli</i> recombinante que expressa o aminoácido éster aciltransferase de <i>Sphingobacterium syngansis</i> ; Produção de al-anil-l-glutamina pela reciclagem de <i>E. coli</i> expressando o aminoácido éster aciltransferase	Suplementos alimentares, tal como definidos na Diretiva 2002/46/CE	Alimentos destinados a fins medicinais específicos, tal como definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013, exceto alimentos destinados a lactentes e crianças pequenas	—	—	—	—	fonte de proteína na alimentação especial como a alimentação parentérica		
PA e CL		Extrato de folha de Aloe macroclada Baker		Suplementos alimentares, tal como definidos na Diretiva 2002/46/CE	De acordo com a utilização normal nos suplementos alimentares do gel semelhante derivado de Aloe vera (L.) Burm.	—	—	—	—			
Proteína Alternativa		Extrato de soja preta fermentada	O processo de fermentação envolve fermentação fúngica em estado sólido (fermentação) com microrganismos (por exemplo, <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , bactérias), seguido de salga e maturação (pós-fermentação)	Suplementos alimentares, tal como definidos na Diretiva 2002/46/CE	4,5 g/dia	A designação do novo alimento a utilizar na rotulagem dos géneros alimentícios que o contêm deve ser «extrato de soja preta fermentada» ou «extrato de soja fermentada»	—	—	—	Rica fonte de proteína e também é usado como ingrediente aromatizado para cozinhar; Pó rico em proteínas		
Proteína Alternativa	Glicoproteína	Lactoferrina bovina	Ocorre naturalmente no leite de vaca; É uma das principais proteínas do soro do leite humano e também é relativamente abundante no colostro bovino.	Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, tal como definidas no Regulamento (UE) n.º 609/2013 (prontas a beber)	100 mg/100 ml	A designação do novo alimento a utilizar na rotulagem dos géneros alimentícios que o contêm deve ser «lactoferrina de leite de vaca»	—	—		"EP23339581 European Patent Office"		
			Alimentos lácteos destinados a crianças pequenas (prontos a comer/beber)	200 mg/100 g								
			Alimentos à base de cereais transformados (polidos)	670 mg/100 g								
			Alimentos destinados a fins medicinais específicos, tal como definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013	Dependendo das necessidades do indivíduo, até 3 g/dia								
			Bebidas lácteas	200 mg/100 g								
			Misturas em pó para bebidas lácteas (prontas a beber)	330 mg/100 g								
			Bebidas à base de leite fermentado (incluindo bebidas à base de iogurte)	50 mg/100 g								
			Bebidas não alcoólicas	120 mg/100 g								
			Produtos à base de iogurte	80 mg/100 g								
			Produtos à base de queijo	2 000 mg/100 g								
			Gelados	120 mg/100 g								
			Bolos e produtos de pasteleria	1 000 mg/100 g								
			Rebuçados	750 mg/100 g								
			Gomas de mascar	3 000 mg/100 g								

Figura A. 4. Exemplo de uma parte da folha Excel com as proteínas alternativas.

Anexado à presente dissertação, seguem-se as Folhas Excel completas, acima referidas, intituladas por “Mapeamento\_Novel\_Foods\_Joana\_Soares”.

## Anexo B – Tabelas e gráficos auxiliares

Na Tabela B.1 encontra-se representado o pH antes e depois de incubar, bem como a percentagem de ácido láctico e a acidez titulável para as amostras 1, 2 e 3.

Tabela B. 1. pH antes e depois de incubar, bem como a percentagem de ácido láctico e a acidez titulável para as amostras 1, 2 e 3

<b>Amostra</b>		<b>pH antes de incubar</b>	<b>pH depois de incubar</b>	<b>% ácido láctico</b>	<b>Acidez titulável (°D)</b>
1	A	5,96	4,58	-	-
	B	5,94	4,35	-	-
	C	5,9	4,38	-	-
2	A	5,81	4,59	0,945	94,5
	B	5,92	4,53	0,8775	87,75
	C	5,92	4,59	0,837	83,7
3	A	7,65	5,97	0,612	61,2
	B	7,05	6,04	0,504	50,4
	C	6,78	5,74	0,72	72
	D	6,23	5,68	0,8145	81,45

A viscosidade das amostras 1, 2 e 3 encontram-se representadas na Tabela B.2.

Tabela B. 2. Viscosidade das amostras 1, 2 e 3

<b>Amostra</b>		<b>10 rpm</b>	
		<b>Viscosidade (P)</b>	<b>± Desvio Padrão</b>
1	A,B,C e D	-	-
2	A	18,10	0,14
	B	17,80	0,71
	C	19,67	1,57
3	A	13,3	-
	B	11,1	-
	C	54,4	-
	D	19,4	-

A cor das amostras 1, 2 e 3 encontram-se representadas na Tabela B.3.

Tabela B. 3. Cor das amostras 1, 2 e 3

<b>Amostra</b>		<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
1	A	82,48	-1,12	10,41
	B	82,28	-1,1	10,41
	C	81,77	-1,24	9,81
	D	83,31	-1,72	9,38
2	A	65,28	-2,22	6,11
	B	89,18	-2,59	7,61
	C	81,14	-2,10	6,88
3	A	86,49	-4,03	17,42
	B	79,21	3,84	16,54
	C	71,05	-2,82	14,00
	D	76,49	-3,14	14,25

A sinérese das amostras 1, 2 e 3 encontra-se representada na Tabela B.4, bem como o desvio-padrão associado.

Tabela B. 4. Sinérese das amostras 1, 2 e 3

		<b>500 rpm</b>		<b>1000 rpm</b>		<b>5000 rpm</b>	
		<b>% Sinérese média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>% Sinérese média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>% Sinérese média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
1	B	3,8	2,40	-	-	-	-
	C	3,8	2,51	-	-	-	-
	D	5,9	2,52	-	-	-	-
	F	5,0	2,56	-	-	-	-
2	A	-	-	8,78	1,04	61,14	1,92
	B	-	-	6,42	0,67	56,43	2,98
	C	-	-	8,69	1,96	57,98	0,88
3	A	-	-	16,4	2,02	55,1	0,71
	B	-	-	5,9	2,72	56,4	0,00
	C	-	-	6,4	1,36	24,1	3,89
	D	-	-	7,4	2,58	55,9	1,75

Na Tabela B.5 pode-se observar a tabela utilizada para construção do gráfico da Figura 20, sobre a viscosidade das BTIL.

Tabela B. 5. Viscosidade apresentada pelo viscosímetro das amostras 6 a 13

<b>Amostra</b>	<b>Viscosidade a 10 rpm (P)</b>	<b>Viscosidade a 20 rpm (P)</b>
6	-	-
7	A	-
	B	26,7
	C	-
	D	25,4
8	B	120,5
9	A	-
	B	-
10	A	76,6
11	A	46,3
13	A	43,4

Na Tabela B.6, encontra-se a análise às perguntas 1, 2 e 3 da Ficha de Avaliação Sensorial, que serviu de apoio à construção da Figura 21 da presente dissertação. Cada valor apresentado corresponde ao número de pessoas que respondeu “sim”, “não” ou “indiferente”.

Tabela B. 6. Resposta às perguntas 1, 2 e 3

	<b>Pergunta 1</b>	<b>Pergunta 2</b>	<b>Pergunta 3</b>
Sim	6	4	5
Não	2	1	1
Indiferente	2	5	4

Na Tabela B.7 é apresentado o número de pessoas que respondeu “Menos de 1 vez por semana”, “1 vez por semana”, “2 vezes por semana”, “3 vezes por semana” e “todos os dias”, à pergunta 4. A Figura 22 da presente dissertação foi construída com base na Tabela abaixo.

Tabela B. 7. Resposta à pergunta 4

	<b>Pergunta 4</b>
Menos de 1 vez por semana	4
1 vez por semana	0
2 vezes por semana	0
3 vezes por semana	4
Todos os dias	2

Para apresentar as respostas das perguntas 5, 7 e 8, na Figura 23 da dissertação, que se tratava de uma escala hedónica, procedeu-se ao cálculo da média desta escala, obtendo-se a Tabela B.8.

Tabela B. 8. Resposta às perguntas 5, 7 e 8

<b>Código nº</b>	<b>234</b>	<b>590</b>	<b>344</b>	<b>845</b>	<b>948</b>	<b>464</b>
<b>Pergunta 5</b>	2	2,7	4,3	6	7	6,3
<b>Pergunta 7</b>	1,5	1,4	2,6	3,5	6,8	6
<b>Pergunta 8</b>	3,1	3,1	6,3	6	6,9	6,3

Para as perguntas 6.1, 6.2 e 6.3, contou-se o número de pessoas que assinalaram cada resposta, passando esse valor para percentagem.

Na Tabela B.9, está representada a resposta às perguntas 6.1 e 6.3, das amostras com os seguintes códigos: 234, 590, 344 e 845. A Tabela representa o número de provadores que consideraram as amostras desde muito pouco espesso a muito espesso e muito pouco doce a doçura ideal.

Tabela B. 9. Resposta às perguntas 6.1 e 6.3 das amostras 234, 590, 344 e 845

<b>Código nº</b>	<b>234</b>	<b>590</b>	<b>344</b>	<b>845</b>
Muito espesso	0	0	9	0
Espesso	0	0	1	0
Espessura ideal	0	3	0	10
Pouco espesso	5	7	0	0
Muito pouco espesso	5	0	0	0
Doçura ideal	0	2	2	6
Pouco doce	6	5	7	4
Muito pouco doce	4	3	1	0

Apenas se estudou a análise às amostras que se mostraram mais viáveis para consumo (amostra 10 e 11). Os valores obtidos, que ajudaram na construção dos gráficos da Figura 24 e da Figura 25, podem ser vistos na Tabela B.10.

Tabela B. 10. Resposta às perguntas 6.1, 6.2 e 6.3 para as amostras 948 e 464

<b>Código nº</b>	<b>948</b>	<b>Código nº</b>	<b>464</b>
Espessura certa	100	Espesso	60
Cor certa	80	Espessura certa	40
Escuro	20	Cor certa	90
Doçura certa	40	Escuro	10
Doce	30	Doce	20
Muito doce	30	Doçura certa	80



Por fim, sobre a pergunta 9, voltou-se a contar o número de pessoas que responderam “não”, “esporadicamente”, “frequentemente” e “sim”, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela B.11. As Figuras 26 e 27 foram construídas com base na Tabela abaixo.

Tabela B. 11. Resposta à pergunta 9

<b>Código nº</b>	<b>948</b>	<b>464</b>
Não	2	2
Esporadicamente	3	5
Frequentemente	2	2
Sim	3	1

## Anexo C – Exemplos de cálculo

Para a parte laboratorial foram realizadas diversas análises. No presente Anexo, vão ser apresentados os exemplos de cálculo, que foram necessários realizar para a discussão dos resultados.

Foram realizados cálculos para a solubilização da proteína, para a preparação de NaOH e da fenolftaleína, para a acidez titulável e para a sinérese.

No exemplo de cálculo da solubilização da proteína, vai ser utilizada a solubilização de proteína de ervilha 10 % (p/v), amostra A1, presente na Folha 2 do Excel referido no Anexo F.

Para os exemplos de cálculo da acidez titulável e sinérese, vai ser utilizada a Amostra 10, ensaio A.

- Preparação da solução de NaOH 0,1 M

Para a preparação das diluições de NaOH 0,1 M foi necessário recorrer a equações simples de concentração.

Para um volume total de 250 mL de solução (V) e uma concentração de 0,1 mol/L (C), determinou-se primeiramente, o número de moles da solução (n), com recurso à Equação C.1.

$$C \left( \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{n \text{ (mol)}}{V(\text{L})} \Leftrightarrow 0,100 \left( \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{n \text{ (mol)}}{0,250 \text{ (L)}} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow n \text{ (mol)} = 0,100 \left( \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) \times 0,250 \text{ (L)} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow n = 0,025 \text{ mol}$$

Equação C.1

De forma a determinar a massa (m) em gramas, necessária para a solução, sabendo que a massa molar do NaOH é de 39,997 g/mol, recorreu-se à equação C.2.

$$\begin{aligned} m \text{ (g)} &= n \text{ (mol)} \times MM \left( \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow m \text{ (g)} &= 0,0250 \text{ (mol)} \times 39,997 \left( \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \Leftrightarrow && \text{Equação C.2} \\ \Leftrightarrow m &= 1,000 \text{ g de NaOH} \end{aligned}$$

Onde C é a concentração desejada, n é o número de moles e V, o volume da solução.

Nota: procedeu-se ao mesmo cálculo para a preparação de solução de NaOH 0,5 M, onde apenas se alterou o valor da concentração de 0,1 mol/L para 0,5 mol/L.

- Preparação da solução de fenolftaleína

A preparação da fenolftaleína, baseada na literatura, foi preparada a 1 % (p/v) – 1 g de fenolftaleína para 100 mL de solução. Assim, com recurso à Equação C.3, calculou-se a massa necessária de fenolftaleína para 250 mL de solução em etanol absoluto PA, da marca Panreac.

$$m \text{ (g)} = \frac{250 \text{ (mL)} \times 1 \text{ (g)}}{100 \text{ (mL)}} \Leftrightarrow m = 2,5 \text{ g de fenolftaleína} \quad \text{Equação C.3}$$

- Solubilização da proteína: cálculo da percentagem de peso seco

O cálculo da percentagem de peso seco fez-se com recurso à massa do cadinho, após secagem no forno e confirmação de peso constante (19,2066 g), a massa do cadinho vazio (19,1926 g) e a massa do cadinho com 3 mL de solução (22,0750 g).

Assim, com recurso à Equação C.4., calculou-se a percentagem de peso seco da amostra.

$$\begin{aligned} \% \text{ de peso seco} &= \frac{A - B}{C - B} \times 100 \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \% \text{ de peso seco} &= \frac{19,2066 - 19,1926}{22,0750 - 19,1926} \times 100 \Leftrightarrow && \text{Equação C.4} \\ \Leftrightarrow \text{Peso seco} &= 0,4857 \% \end{aligned}$$

Onde A - massa do cadinho, após secagem no forno e confirmação de peso constante; B - massa do cadinho vazio; C - massa do cadinho com 3 mL de solução.

- Acidez Titulável: cálculo da percentagem de ácido láctico

A acidez titulável foi determinada com recurso às preparações de NaOH 0,1 M e de fenolftaleína. A titulação dá-se até ao ponto de viragem, onde a solução de BTIL se torna rosa (Anexo D, Figura D.16). A percentagem de ácido láctico é dada pela Equação C.5.

O volume de NaOH gasto até ao ponto de viragem de fenolftaleína é de 8,10 mL = 0,0081 L; a massa molar do ácido láctico é de 90,08 g/mol; o peso da amostra é 10,00 g e 0,1 é o fator de correção do NaOH 0,1 N.

$$\begin{aligned} \% \text{ ácido láctico} &= \frac{\text{Volume (NaOH) gasto} \times MM(\text{ácido láctico}) \times 0,1000}{\text{Peso da amostra}} \times 10 \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \% \text{ ácido láctico} &= \frac{0,0081 \times 90,08 \times 0,1000}{10,00} \times 100 \Leftrightarrow && \text{Equação C.5} \\ \Leftrightarrow \% \text{ ácido láctico} &= 0,7296 \% \end{aligned}$$

- Acidez Titulável: cálculo da acidez titulável em graus *Dornic*

Sabe-se que 0,01 % de ácido láctico corresponde a 1 grau *Dornic*. Assim, para se obter a acidez titulável em graus *Dornic*, recorreu-se a essa relação, e através da Equação C.6, obteve-se o resultado.

$$\begin{aligned} AT &= \frac{\% \text{ ácido láctico}}{0,01} \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow AT &= \frac{0,7296}{0,01} \Leftrightarrow && \text{Equação C.6} \\ \Leftrightarrow AT &= 72,96^\circ \text{ D} \end{aligned}$$

- Sinérese: cálculo da massa de soro

Para o exemplo de cálculo da massa de soro vai-se utilizar a amostra 10A, a 1000 rpm.

Calculou-se, primeiramente, através da Equação C.7, a massa de BTIL no tubo quando foram adicionados 7 mL de BTIL. Para este cálculo foram necessárias a massa do tubo vazio (6,90 g) e a massa do tubo com 7 mL de BTIL (14,2 g).

$$\text{Massa de BTIL} = F - E \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa BTIL} = 14,20 - 6,90 \Leftrightarrow \text{Equação C.7}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa BTIL} = F = 7,30 \text{ g}$$

Com recurso à massa do tubo vazio (6,90 g), à massa de BTIL (7,30 g) e à massa do tubo após centrifugação, com a remoção do soro (11,50 g), calculou-se a massa de soro, como se verifica pela Equação C.8.

$$\text{Massa de soro} = (E + F) - G \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa de soro} = (6,90 + 7,30) - 11,50 \Leftrightarrow \text{Equação C.8}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa de soro} = 2,70 \text{ g}$$

Onde E é a massa de tubo vazio, F a massa do tubo com BTIL e G a massa do tubo após centrifugação, com a remoção do soro.

- Sinérese: cálculo da percentagem de sinérese

Através da divisão da massa de soro, calculada acima, pela massa do tubo com BTIL antes da centrifugação (F), multiplicando-se por 100, obtém-se a percentagem de sinérese, como se pode confirmar pela Equação C.9.

$$\% \text{ de sinérese} = \frac{\text{massa de soro}}{F} \times 100 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ de sinérese} = \frac{2,70}{7,30} \times 100 \Leftrightarrow$$

Equação C.9

$$\Leftrightarrow \% \text{ de sinérese} = 37,00 \%$$

Este cálculo foi efetuado para todas as amostras realizadas a 1000 e 5000 rpm.

## Anexo D – Fotografias tiradas às formulações experimentadas

A primeira amostra realizada, de iogurte convencional, pode ser verificada na Figura D.1.



Figura D. 1. Amostra 1.

A amostra 2 encontra-se na Figura D.2.



Figura D. 2. Amostra 2.

Na Figura D.3. é possível verificar a amostra 5, cuja se trata de uma sobremesa feita à base de leite de soja e sobremesa de soja, ambas da marca Alpro.



Figura D. 3. Amostra 3.

A amostra 4, que pode ser vista na Figura D.4., mostrou-se inválida, sendo que não se fizeram análises à mesma, sem ser a medição do pH.

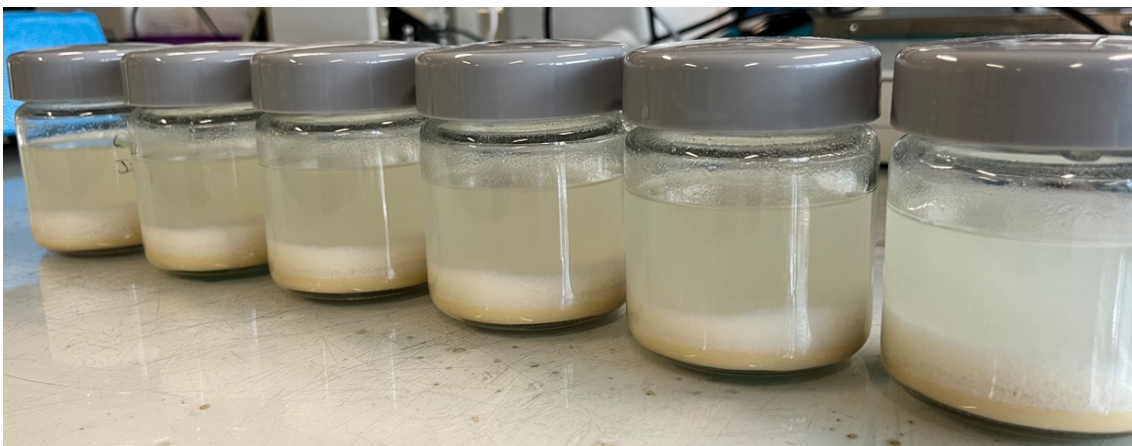


Figura D. 4. Amostra 4.



A amostra 5, pela falta de solubilidade da proteína, mostrou-se também inválida. Esta está representada na Figura D.5.



Figura D. 5. Amostra 5.

A amostra 6, tratou-se de 6 diferentes tipos de receita. Na Figura D.6., é possível observar que as amostras A e E, não formaram o leite, nem coagularam ao ponto de ser uma bebida tipo iogurte, como as restantes.



Figura D. 6. Amostra 6.

A amostra 7 encontra-se na Figura D.7. Os ensaios A e D foram os primeiros a ser experimentados.



Figura D. 7. Amostra 7.

As amostras 8 e 9 encontram-se apresentadas na Figura D.8 e Figura D.9, respetivamente. Foi feita a análise sensorial aos ensaios B de cada amostra.



Figura D. 8. Amostra 8.

Figura D. 9. Amostra 9.

As últimas amostras realizadas, 10, 11, 12 e 13 estão apresentadas a seguir, nas Figuras D.10, D.11, D.12 e D.13.



Figura D. 10. Amostra 10.



Figura D. 11. Amostra 11.

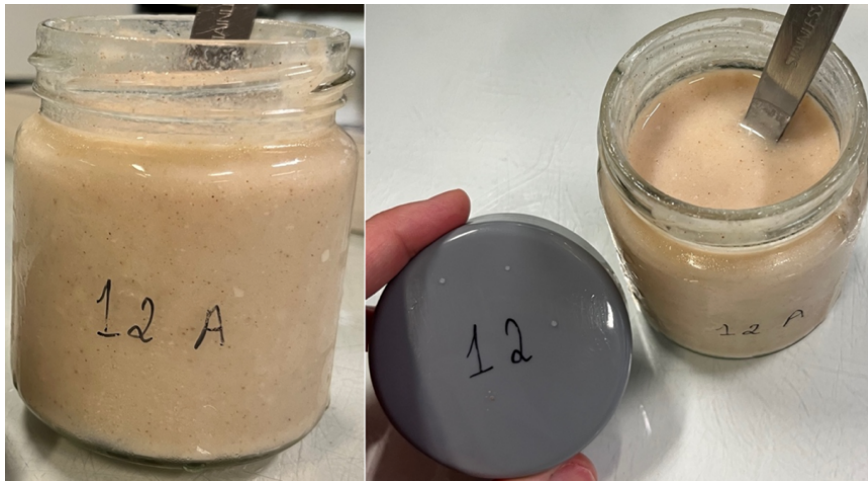


Figura D. 12. Amostra 12.



Figura D. 13. Amostra 13.

Na Figura D.14 encontra-se a bebida e sobremesa de soja utilizados na amostra 5.



Figura D. 14. Bebida e sobremesa de soja utilizados na amostra 5.

Na Figura D.15 verifica-se o sistema utilizado para análise á acidez titulável.



Figura D. 15. Sistema utilizado na acidez titulável.

Na Figura D.16 está apresentada o ponto de viragem de fenolftaleína de uma das amostras.



Figura D. 16. Ponto de viragem de fenolftaleína.

A centrífuga e os tubos falcon de 13 mL, utilizados na análise da sinérese, encontram-se apresentados na Figura D.17.

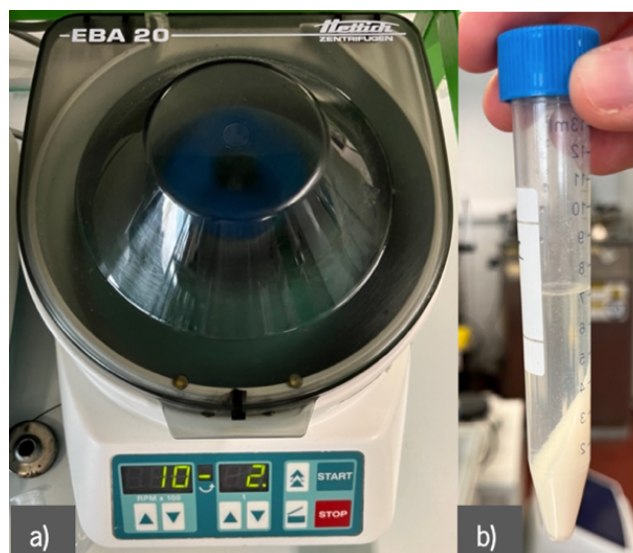


Figura D. 17. Centrífuga (a) e tubo falcon de 13 mL (b).

Os filtros de microfibras utilizados na filtração a vácuo encontram-se apresentados na Figura D.18.



Figura D. 18. Caixa dos filtros utilizados na filtração a vácuo.

Na Figura D.19 é possível observar os cadinhos utilizados para a proteína fúngica, após uma hora de secagem.

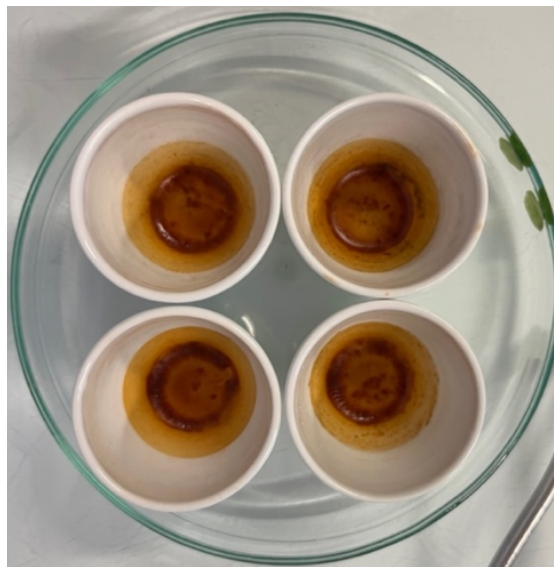


Figura D. 19. Cadinhos, após uma hora de secagem, da proteína fúngica.

## Anexo E – Ficha de Análise Sensorial



### Análise Sensorial à Bebida tipo iogurte Líquido

Desenvolvido por: Joana Soares

Amostra n°: \_\_\_\_\_

Sexo:  Feminino  Masculino

Idade: \_\_\_\_\_

Ocupação: \_\_\_\_\_

1 – Gosta de iogurtes líquidos?

Sim

Não

Indiferente

2 – Gosta de bebidas vegetais?

Sim

Não

Indiferente

3 – É uma pessoa preocupada com o consumo de proteínas animal?

Sim

Não

Indiferente

4 – Qual a sua frequência de consumo de iogurte líquido?

Menos de 1 vez por semana

1 vez por semana

2 vezes por semana

3 vezes por semana

Todos os dias

5 – Sobre a amostra analisada, classifique a sua experiência global:

1

2

3

4

5

6

7

8

Desgostei extremamente

Gostei extremamente

Nota: para a realização da Pergunta 5, ver classificação da escala na página a seguir.

Figura E. 1. Página 1 da Ficha de Análise Sensorial realizada.





## **Anexo F – Excel utilizado para os cálculos realizados**

Anexado à presente dissertação seguem-se as Folhas Excel intituladas de “Excel\_Dissertacao\_Joana\_Soares”, utilizadas para a análise e discussão dos resultados obtidos laboratorialmente.