

Estudo da farinha do trigo Barbela para a produção de Pão

Diana Paulo Amendoeira

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de
Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Produtos
Naturais e Bioaplicações*

Orientado por
Professora Maria Leticia Estevinho
Professor Luís Avelino Guimarães Dias

Bragança
2024

Agradecimentos

E assim termina mais uma etapa da minha vida académica e gostava de expressar aqui o meu mais profundo agradecimento a todos os que tornaram isso possível.

Antes de mais, gostava de agradecer aos meus pais por me ensinarem a ser íntegra, pelo apoio incondicional, pelo conhecimento, a sabedoria e a excelência incansavelmente, a valorizar o trabalho duro e a dedicação.

Aos meus dois irmãos que me ajudaram a ultrapassar os momentos mais difíceis desta etapa e pela compaixão.

Aos meus avôs, por todos os conselhos dados, por todo o amor e compaixão presenteada.

Ao meu namorado, pelo apoio prestado ao longo deste período académico, pela sua paciência e compaixão.

A minha orientadora Professora Doutora Letícia Estevinho, pelos ensinamentos, pelos conhecimentos transmitidos, pelo seu empenho paciência a orientar esse trabalho desde o início demonstrando sempre boa vontade em esclarecer todas as dúvidas, fazendo sempre críticas construtivas que me permitiram avançar com clareza no trabalho.

Ao meu coorientador Professor Doutor Luís Dias pela colaboração, sugestões ao longo do trabalho e pela ajuda no tratamento estatísticos dos dados.

Sou grata a todos os meus colegas de trabalho, em especial a Alexandra Teixeira, Hellen Rodrigues, Lais Sene, e Natália Seixas, que estiveram sempre comigo nas horas difíceis e nas trocas de ideias.

A Doutora Vanessa Paula pelo apoio, troca de conhecimento e pela compaixão.

Aos meus amigos pelo apoio e encorajamento durante o meu percurso académico.

Por último gostaria de agradecer ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) por fornecer o laboratório e os equipamentos necessários para que este trabalho pudesse ser realizado.

Este trabalho foi em financiado pelo Projeto PRR (PRR-C05-I03-i-000161) com o título de “**Desenvolvimento de cadeias de valor de cereais tradicionais para uma alimentação sustentável em Portugal**”. O projeto está inserido na medida 12 - Alimentação sustentável e tem financiamento Nacional e Europeu. O projeto tem como objetivo promover a produção do cereal tradicional de Portugal e criar uma cadeia de valor que envolva os produtores, transformadores, comerciantes e consumidores.



Índice

Índice de Tabelas	V
Índice de Figuras	VI
Resumo	VIII
Abstract.....	X
Objetivo Geral:	XII
Objetivos específicos:.....	XII
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1. Trigo Barbela.....	2
1.2. Pão	2
1.2.1. Principais ingredientes.....	3
1.2.2. Processo de produção do pão.....	4
1.2.3. Composição nutricional do pão de trigo.....	6
1.2.4. Características tecnológicas do pão	6
1.3. Farinha de trigo.....	8
1.3.1. Características de composição das farinhas para panificação	9
1.4. Fermentação.....	10
Capítulo 2	12
Material e Métodos	12
2.1. Farinha de trigo Barbela	13
2.2. Preparação das amostras de massa fermentada	13
2.3. Preparação das amostras de pão	14
2.4. Análises microbiológicas.....	16
2.4.1. Preparação de amostras para análises microbiológicas	16
2.4.2. Contagem de Coliformes totais/ <i>Escherichia coli</i>	17
2.4.3. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos	17
2.4.4. Contagem total de bolores e leveduras	18
2.4.5. Contagem de esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores	19
2.4.6. Pesquisa e contagem de <i>Bacillus cereus</i>	19
2.5. Análises físico-químicas.....	19
2.5.1. Determinação do teor de humidade	19
2.5.2. Determinação do teor de cinzas	20
2.5.3. Determinação do teor de proteína.....	21
2.5.4. Determinação do pH.....	22
2.5.5. Determinação do teor de gordura total	23

2.5.6. Determinação de teor em hidratos de carbono e valor energético.....	24
2.5.7. Determinação do teor de glúten.....	24
2.5.8. Calibração e análise por HPLC	25
2.6. Análises químicas	26
2.6.1. Preparação dos extratos das amostras.....	27
2.6.2. Determinação dos compostos fenólicos totais.....	27
2.6.3. Determinação da atividade antioxidante.....	28
2.7. Atividade antimicrobiana	28
Capítulo 3	31
Resultados e Discussão	31
3.1. Análises à farinha de trigo Barbela.....	32
3.1.1. Análises microbiológicas.....	32
3.1.2. Análise físico-químicas	33
3.1.3. Análises químicas	35
3.1.4. Análise da atividade antimicrobiana.....	36
3.2. Otimização da MF	36
3.2.1. Crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.2.2. Calibração do HPLC.....	37
3.2.3. Análises físico-químicas e químicas	41
3.2.4. Modelos de RSM.....	44
3.3. Análises à massa fermentada nas condições ótimas	58
3.3.1. Análises microbiológicas.....	58
3.3.2. Análises físico-químicas e químicas	58
3.3.3. Atividade antimicrobiana	59
3.4. Análises ao pão preparado nas condições ótimas.....	59
3.4.1. Análises microbiológicas.....	59
3.4.2. Análises físico-químicas e químicas	60
3.4.3. Atividade antimicrobiana	63
Capítulo 4	64
Conclusão	64
Referências	67

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição média dos dois tipos de pão (por 100 g).....	7
Tabela 2: Composição nutricional e valor energético da farinha de trigo T150 e T55. ...	9
Tabela 3: Desenho experimental Plackett-Burman para a otimização das condições de fermentação.	14
Tabela 4: Composição da mistura dos ingredientes utilizados na produção dos pães. ..	15
Tabela 5: Resultados das análises microbiológicas da FTB.....	33
Tabela 6: Resultados das análises físico-químicas (humidade, cinzas, proteína total, glúten húmido, glúten seco, glúten total e pH) na FTB.....	34
Tabela 7: Resultados das análises químicas na FTB.	35
Tabela 8: Resultados das análises microbiológicas efetuadas no desenho experimental.	37
Tabela 9: Dados da calibração do HPLC para a análise de sacarose, glucose, frutose, glicerol, ácido acético e etanol.	39
Tabela 10: Resultados das análises físico-químicas e químicas efetuadas no desenho experimental.	42
Tabela 11: Significância dos termos presentes no modelo RSM para os vários parâmetros químicos analisados na MF que inclui 4 fatores, os respetivos termos quadráticos e as interações pareadas.	45
Tabela 12: Resultados do estudo do tempo de vida de prateleira do pão durante 6 dias (T0, T2, T4, T6).....	60
Tabela 13: Resultados das análises físico-químicas (humidade, cinzas, proteína total, pH, gordura, hidratos de carbono e valor energético) do pão.....	62

Índice de Figuras

Figura 1: Fluxograma do processo de panificação. (Adaptado de Vianna, 2018)	5
Figura 2: Amostras de massa fermentada.....	13
Figura 3: Ingredientes utilizados: farinha de trigo Barbela, água, sal e levedura.	15
Figura 4: Estudo do tempo de vida de prateleira.	16
Figura 5: Análise de Escherichia coli/ Coliformes Totais.....	17
Figura 6: Análise de Leveduras.....	18
Figura 7: Análise de cinzas.....	21
Figura 8: Análise do teor de proteína.	22
Figura 9: Análise de pH.....	23
Figura 10: Análise do teor de gordura por Soxhlet.	24
Figura 11: Preparação dos extratos.....	27
Figura 12: Análise de DPPH.	28
Figura 13: Análise da atividade antioxidante.	29
Figura 14: Retas de calibração obtidas para os compostos de fermentação analisados por HPLC: sacarose; glucose; frutose; glicerol; ácido acético e etanol.....	40
Figura 15: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a resposta "Proteína (%)".	47
Figura 16: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a resposta "Concentração de Cinzas (%)".	48
Figura 17: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para o crescimento de levedura Saccharomyces cerevisiae.	50
Figura 18: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a produção de glicerol, em g/L.....	52
Figura 19: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a produção de ácido acético, em g/L.	54
Figura 20: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a produção de etanol, em g/L.	56

Lista de abreviaturas:

AG - Ácido Gálico

ANOVA - Análise de Variância

AOAC - Associação de Químicos Analíticos Oficiais

CBM - Concentrações Mínima Bactericida

CIM - Concentrações Mínima Inibitória

DMSO - Dimetilsulfóxido

DGS - Direção Geral de Saúde

FTB - Farinha de trigo Barbela

GH - Glúten húmido

GS - Glúten seco

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

INSA - Instituto Nacional de Saúde

ISO - Organização Internacional de Normalização

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

MF - Massa Fermentada

NCV - Catálogo Nacional de Castas

RI - Índice de Refração

RSM - Modelo de Resposta por Superfície

SPCNA - Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

Resumo

A panificação é um processo industrial através do qual se realizam uma série de operações ordenadas e sequenciais, que conduzem à obtenção de um produto final - o pão. O Pão é um alimento fundamental para todas as classes sociais, tendo conseguido uma posição transversal no comportamento alimentar da sociedade. Por isso a indústria de panificação, alcançou uma posição de destaque a nível económico, visto ser, o pão, um dos alimentos fundamentais da dieta diária humana.

Neste trabalho estudou-se o trigo panificável Barbela que constitui uma variedade tradicional portuguesa antiga com boa produtividade em solos de baixa fertilidade em ambientes com alta acidez, além de se adaptar a diferentes condições ambientais. O objetivo foi desenvolver e caracterizar o pão produzido com farinha de trigo Barbela T150, analisando as suas características microbiológicas, físico-químicas, químicas, e atividade antimicrobiana.

A farinha de trigo Barbela apresentou teor de fenóis totais ($7,57 \pm 0,14$ mg eq. AG/g) e uma atividade antioxidante significativa ($32,49 \pm 0,57$ mg eq. Trolox/g), o que evidenciou o seu potencial como fonte de compostos bioativos. Em termos microbiológicos, a farinha não apresentou contaminações, garantindo a sua conformidade com os padrões de segurança alimentar. Nas análises físico-químicas, a farinha apresentou um teor de humidade de 11,12%, o que está dentro dos limites regulamentares, e um teor de cinzas de 1,58%, sugerindo riqueza em minerais. O conteúdo proteico foi de 12,65%, o teor de glúten húmido foi 35,05% e o glúten seco de 13,13%. Estas características são essenciais para a panificação, pois garantem a formação adequada de glúten.

Durante o processo de panificação, foram realizados ensaios para otimização das condições de fermentação. Para tal aplicou-se o desenho de Plackett-Burmann efetuando 18 ensaios, usando 3 níveis de 4 fatores: tempo de fermentação (1h; 3h ;5h), temperatura de fermentação (20°C; 30°C; 40°C), quantidade de sal (0,6; 1,0 e 4 g/L) e quantidade de levedura (1,0; 3,0 e 4,0 g/L). Com base nos resultados do desenho experimental selecionaram-se as seguintes condições ótimas para a preparação do pão: quantidade de água 70g/L, quantidade de farinha 100 g, 1h de fermentação, temperatura 25°C, e 1g de sal e levedura.

A massa fermentada ótima revelou resultados importantes, as análises físico-químicas, obtiveram-se os resultados: teor de cinzas foi de 1,39%, indicando a quantidade de material mineral presente na amostra, a proteína total 8,72%, um valor considerável

para garantir a qualidade do glúten e a formação da estrutura adequada do pão. O pH da massa foi de 6,9, essencial para a atividade enzimática e a produção de dióxido de carbono durante a fermentação. Em termos de análises químicas, o teor de fenóis totais foi de $8,81 \pm 0,44$ mg eq. AG/g, destacando a presença de compostos bioativos com propriedades antioxidantes. Além disso, a atividade antioxidante, medida pelo ensaio de DPPH, atingiu $29,57 \pm 0,65$ mg eq. Trolox/g, reforçando o potencial antioxidante da massa fermentada.

As análises microbiológicas indicaram uma contagem total de leveduras de $6,48 \pm 0,04$ log UFC/mL, o que reflete o desenvolvimento eficaz das leveduras, em particular *Saccharomyces cerevisiae*, responsáveis pela produção de dióxido de carbono, fundamental para a formação da rede de glúten. Estes resultados demonstram que a massa fermentada ótima possui um perfil equilibrado de composição mineral, proteínas e atividade antioxidante, o que contribui diretamente para a qualidade do pão final.

O teor de fenóis totais foi de $13,69 \pm 0,26$ mg eq de AG/ g por 100 g de pão, indicando uma presença relevante de compostos fenólicos, conhecidos pelos seus benefícios antioxidantes. Além disso, a capacidade antioxidante, medida através do ensaio DPPH, apresentou um valor de $59,09 \pm 2,00$ mg eq de Trolox/g, evidenciando a potencial.

Em termos físico-químicos, o pão apresentou um teor de humidade de 36,64%, teor de cinzas de 1,69% e proteína total de 9,80%, teor de gordura 1,02%, um valor de pH 5,98, teor em hidratos de carbono 50,84 g/100g e valor energético entre 251,82 Kcal/100g. Verificou-se uma atividade antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, embora não tenha sido verificada inibição contra *Escherichia coli*, sugerindo uma ação seletiva. No estudo do tempo de vida de prateleira, observou-se ausência de microrganismos até ao T2. No entanto, a partir do T4, registou-se um aumento progressivo na contagem de microrganismos mesófilos totais, bem como de bolores e leveduras. Esta tendência culminou numa degradação significativa ao T6, com a presença de *Bacillus cereus*.

Palavras-chave: Trigo Barbela, pão, microbiológicas, compostos fenólicos, atividade antioxidante, físico-químicas.

Abstract

Breadmaking is an industrial process involving a series of ordered and sequential operations that lead to the production of a final product—bread. Bread is a fundamental food for all social classes, having achieved a transversal position in the dietary behavior of society. For this reason, the baking industry has reached a prominent economic position, as bread is one of the staple foods of the human daily diet. In this study, the focus was on the bread wheat variety Barbela, a traditional Portuguese cultivar known for its good productivity in low-fertility soils in highly acidic environments and its adaptability to different environmental conditions. The aim was to develop and characterize bread made with Barbela wheat flour T150, analyzing its microbiological, physicochemical, chemical properties, and antimicrobial activity. Barbela wheat flour showed a total phenolic content of 7.57 ± 0.14 mg GAE/g and significant antioxidant activity (32.49 ± 0.57 mg Trolox equivalent/g), demonstrating its potential as a source of bioactive compounds. Microbiological analysis revealed no contamination, ensuring compliance with food safety standards. Regarding physicochemical analysis, the flour had a moisture content of 11.12%, within regulatory limits, and an ash content of 1.58%, indicating a richness in minerals. The protein content was 12.65%, with a wet gluten content of 35.05% and dry gluten of 13.13%. These characteristics are essential for breadmaking, ensuring the proper gluten formation.

During the breadmaking process, experiments were conducted to optimize fermentation conditions. A Plackett-Burman design was applied with 18 trials, testing 4 factors at 3 levels: fermentation time (1h, 3h, 5h), fermentation temperature (20°C, 30°C, 40°C), salt content (0.6, 1.0, and 4 g/L), and yeast content (1.0, 3.0, and 4.0 g/L). Based on the experimental results, the following optimal conditions were selected for bread preparation: 70 g/L of water, 100 g of flour, 1h fermentation at 25°C, and 1 g of salt and yeast.

The optimized fermented dough yielded important results. Physicochemical analysis showed an ash content of 1.39%, indicating the mineral content of the sample, and a total protein content of 8.72%, a significant value to ensure gluten quality and proper bread structure formation. The dough's pH was 6.9, critical for enzymatic activity and carbon dioxide production during fermentation. Chemically, the total phenolic content was 8.81 ± 0.44 mg GAE/g, highlighting the presence of bioactive compounds with antioxidant properties. Furthermore, antioxidant activity measured by the DPPH

assay reached 29.57 ± 0.65 mg Trolox equivalent/g, reinforcing the dough's antioxidant potential. Microbiological analysis showed a total yeast count of 6.48 ± 0.04 log CFU/mL, reflecting the effective development of yeasts, particularly *Saccharomyces cerevisiae*, responsible for carbon dioxide production, essential for gluten network formation. These results demonstrate that the optimized fermented dough has a balanced profile of mineral composition, proteins, and antioxidant activity, directly contributing to the final bread's quality. The bread showed a total phenolic content of 13.69 ± 0.26 mg GAE/100 g, indicating a significant presence of phenolic compounds known for their antioxidant benefits. Additionally, antioxidant capacity measured by the DPPH assay reached 59.09 ± 2.00 mg Trolox equivalent/g, highlighting its potential.

Physicochemically, the bread had a moisture content of 36.64%, ash content of 1.69%, total protein content of 9.80%, fat content of 1.02%, pH of 5.98, carbohydrate content of 50.84 g/100 g, and an energy value of 251.82 kcal/100 g. Significant antimicrobial activity was observed against Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, although no inhibition was noted against *Escherichia coli*, suggesting selective action. In the shelf-life study, no microorganisms were detected until T2. However, from T4 onward, there was a progressive increase in the total mesophilic microorganism count, as well as molds and yeasts. This trend culminated in significant degradation at T6, with the presence of *Bacillus cereus*.

Keywords: Barbela wheat, bread, microbiological, phenolic compounds, antioxidant activity, physicochemical.

Objetivo Geral:

Avaliar as potencialidades da farinha de trigo Barbela para produção de pão, considerando a sua composição nutricional, segurança microbiológica e qualidade funcional ao longo do tempo.

Objetivos específicos:

- Analisar as características microbiológicas da farinha de trigo Barbela;
- Analisar as características físico-químicas da farinha de trigo Barbela;
- Avaliar as características químicas da farinha de trigo Barbela;
- Realizar um desenho experimental com 18 ensaios, variando 4 fatores (temperatura de fermentação, tempo de fermentação, quantidade de sal e levedura), para avaliar o impacto dessas variáveis na qualidade final da massa fermentada;
- Identificar através do desenho experimental quais os parâmetros ideais que maximizem as características funcionais da massa fermentada;
- Avaliar as características físico-químicas, químicas e a qualidade microbiológica do pão produzido nas condições ótimas com farinha de trigo Barbela.

Capítulo 1

Introdução



1.1. Trigo Barbela

O trigo panificável Barbela (*Triticum aestivum* L.em. Thell) constitui um agregado de variedades crioulas portuguesas antigas com boa produtividade em condições de baixa fertilidade frequentemente associadas a solos ácidos, e ampla adaptação a diferentes ambientes (Bernard & Guedes-Pinto, 1983). As populações de trigo Barbela são altamente variáveis tendo sido reconhecidas diversas variantes morfológicas (Vasconcellos, 1933).

Na década de 1930, o Barbela era o trigo mais cultivado em Portugal apresentando robustez invernal no interior Norte, e tolerância à seca nas regiões semi-áridas e quentes do Sul (Monteiro, 1935; Castilho, 1954). Nas últimas décadas, o Barbela é cultivado principalmente no Nordeste de Portugal, na região de Trás-os-Montes, devido ao seu valor na produção de pães e biscoitos tradicionais. Devido à sua elevada variabilidade, o Barbela foi excluído do Catálogo Nacional de Castas (NCV).

O trigo desempenha um papel fundamental na nutrição humana. Além de ser uma fonte importante de energia, é rico em vitaminas e minerais essenciais, como potássio, vitaminas do complexo B, fósforo e magnésio (Rosell, 2012). É um cereal da família das gramíneas, sendo a espécie mais cultivada a *Triticum aestivum* L, utilizada na produção de farinhas.

O grão de trigo, é constituído por três partes: embrião, endosperma e casca. O embrião representa cerca de 2% a 4% do seu peso. A casca é formada por várias camadas representando cerca de 7% a 8% do peso do grão. O endosperma que constitui aproximadamente 81% a 84% do peso do grão, é utilizado na produção de farinha.

1.2. Pão

O processo de panificação é um dos processos tecnológicos mais antigos do mundo. Alguns registos mencionam que o pão na Grécia, Egito, Babilônia e Roma já fazia parte da dieta em períodos antes de Cristo. De facto, o pão é um dos alimentos mais consumido em todo o mundo (Chavan & Chavan, 2011; Teixeira et al., 2020).

O conceito de “pão” engloba uma diversidade de produtos que diferem no formato, tamanho, textura, crocância, cor, propriedades nutricionais e sabores.

De acordo com a Portaria nº 52/2015, o pão é definido como “o produto obtido a partir da mistura, fermentação e cozimento, adequado, utilizando exclusivamente farinhas de trigo, centeio, triticale ou milho, ou da mistura de duas ou mais destas farinhas”. O processo envolve o uso de água potável e fermento (levedura) sendo permitido também o uso de sal e de outros ingredientes, nomeadamente aditivos e auxiliares tecnológicos, como enzimas.

Na referida Portaria são admitidos os diferentes tipos de pão:

- “Pão de trigo” – Pão produzido com farinha de trigo dos tipos 45, 55, 65, 80 ou 110, juntamente com água potável, sal e fermento (levedura);
- “Pão de centeio” – Pão fabricado com farinha de centeio dos tipos 70, 85 ou 130, ou misturado com farinha de trigo dos tipos 45, 55, 65, 80, 110 ou 150, desde que a farinha de centeio represente mais de 50 % da mistura;
- “Pão integral” – Pão produzido com farinha de centeio do tipo 170 ou farinha de trigo do tipo 150;
- “Pão de triticale” – Pão elaborado com farinha de triticale, seguindo as mesmas normas aplicáveis ao pão de centeio;
- “Pão de mistura” – Pão produzido através da combinação de farinhas de trigo (tipos 45, 55, 65, 80, 110 ou 150), de centeio (tipos 70, 85, 130 ou 170) e de milho (tipos 70, 100 ou 175). Também, pode ser obtido com farinhas de dois desses cereais desde que cada um corresponda a pelo menos 10 % da mistura;
- “Pão de milho” – Um tipo de pão de mistura onde a farinha predominante é a de milho dos tipos 70, 100 ou 175;
- “Pão especial” – Pão produzido com qualquer tipo de farinha que se encontre na Portaria n.º 254/2003, de 19 de março, seja a partir de uma única farinha ou de uma mistura de diferentes farinhas.

1.2.1. Principais ingredientes

A produção de pão consiste na utilização de farinha de trigo, água, sal e levedura. No entanto, podem ser acrescentados outros tipos de farinhas ou ingredientes com o objetivo de melhorar as suas características. Seguidamente descreve-se de forma detalhada os vários componentes utilizados na produção do pão.

A farinha de trigo é o principal ingrediente na panificação. De acordo com a Portaria nº 254/2003 de 19 de março, a farinha é definida como o “produto obtido a partir da moagem de grãos de um ou mais cereais, maduros, saudáveis, não germinados e livres de impurezas”. A farinha de trigo é essencialmente composta por amido, água e proteínas, sendo o amido o principal componente do trigo. Apesar deste cereal apresentar um baixo teor de lípidos, é rico em fibras e micronutrientes, nomeadamente minerais e as vitaminas B e E. O seu teor em proteínas é baixo, no entanto pode fornecer quase todos os aminoácidos essenciais necessários, exceto a lisina (Arendt e Zannini, 2013; Wrigley, 2016).

A água, é fundamental na panificação, pois quando entra em contacto com a farinha, promove a interação com outros componentes e, através da ação mecânica, a formação de uma massa. Este processo origina uma rede proteica, o glúten, criando uma textura firme que retém os gases produzidos durante a fermentação e cozimento. A presença de água também é essencial no processo fermentativo, criando um ambiente favorável à multiplicação das leveduras e à ativação das suas enzimas responsáveis pela fermentação (Chen et al., 2019; Rizzon et al., 2017).

Segundo Fennema et al. (2010), a *Saccharomyces cerevisiae* é o material biológico usado mais frequentemente como fermento na panificação. Esta levedura converte os açúcares como glucose, frutose, sacarose e maltose, em condições de anaerobiose, produzindo dióxido de carbono, que é fundamental para o crescimento da massa e para a formação de compostos aromáticos típicos dos produtos de panificação fermentados. O sal é bastante utilizado na indústria da panificação, com o objetivo de aumentar a resistência da massa durante a mistura, a fixação da água no glúten, e a redução da viscosidade ao longo do processo. Adicionalmente, o sal contribuiu para a maciez e para o atraso do endurecimento. Devido às suas propriedades higroscópicas, o sal também atua como agente de conservação.

Segundo a Lei nº 75/2009 o limite máximo permitido de sal no pão, após a sua produção, é de 1,4 g por cada 100 g de produto.

1.2.2. Processo de produção do pão

O diagrama de fabrico do pão encontra-se representado na Figura 1. É um processo que envolve um conjunto de operações e alterações físicas, químicas e

bioquímicas muito importantes. Este processo é constituído por três etapas principais: a mistura dos ingredientes, fermentação e cozedura.

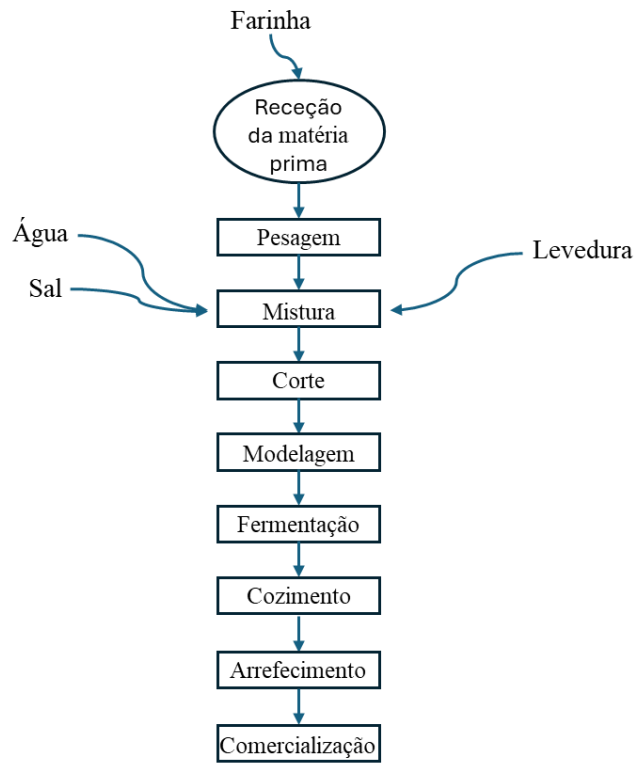


Figura 1: Fluxograma do processo de panificação. (Adaptado de Vianna, 2018)

O envolvimento dos ingredientes é a primeira etapa do procedimento, sendo imperioso garantir a interação das matérias-primas para otimizar a formação da massa. Nesta fase, a farinha é progressivamente hidratada com vista à formação de uma rede tridimensional de glúten, a qual retém os gases produzidos durante a fermentação. Esta rede agrega o amido e outros componentes da farinha, favorecendo a formação da estrutura alveolada final do pão. Posteriormente, ocorre a ativação das amilases que convertem o amido em açúcares fermentescíveis, que vão servir de substrato para a multiplicação das leveduras.

A fermentação é uma etapa crucial no processo de panificação, influenciando quer o aroma, quer outras características importantes do produto final, como o volume e a estrutura alveolada do miolo (Arendt et al., 2007; Bot, 2008). Durante essa fase, os açúcares são convertidos em etanol, dióxido de carbono e outros compostos que influenciam o aroma. São vários os fatores que influenciam o rendimento da fermentação,

a referir: temperatura, concentração de inoculo, pH, quantidade e qualidade de nutrientes disponíveis e inibidores da fermentação (Bot, 2008).

Durante o cozimento, continua a verificar-se a expansão da massa, bem como, a formação do miolo e da côdea. Entre os fatores responsáveis pela expansão da massa salientam-se: (i) expansão dos gases retidos devido ao aumento da temperatura; (ii) evaporação de água e do etanol presentes na massa; (iii) aumento da produção de dióxido de carbono pelas leveduras. (León et al.,2007).

1.2.3. Composição nutricional do pão de trigo

Para muitas populações, o pão é uma importante fonte de energia, sendo também uma relevante fonte de macro e micronutrientes, essenciais para o bom funcionamento do organismo. Do ponto de vista nutricional, o pão é uma ótima fonte de hidratos de carbono, proteínas vegetais, ferro, magnésio, fibras alimentares e vitaminas particularmente do complexo B (Nascimento et al., 2019).

Na Tabela 1 observa-se a composição aproximada em macronutrientes e minerais do pão de trigo e do pão de trigo integral, de acordo com a “Tabela da Composição dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge”.

1.2.4. Características tecnológicas do pão

As características tecnológicas analisadas no pão são a textura, porosidade, cor e volume.

Textura

Segundo a norma ISO 5492, a textura de um produto alimentar resulta de um conjunto de propriedades ou atributos mecânicos, geométricos, de corpo perceptíveis através de recetores cinestésicos (posição e movimento do corpo) e somáticos (pressão, temperatura, dor) e, eventualmente, por recetores visuais e auditivos. Esta perceção ocorre desde o momento da primeira dentada até à deglutição final.

Porosidade

A porosidade descreve à estrutura alveolar do pão, incluindo o volume e o número dos alvéolos, associados à formulação, fabrico e cozedura. Massas com maior absorção

de água geralmente apresentam alvéolos maiores, já os pães cozidos em formas tendem a ter alvéolos de menor tamanho e, conseqüentemente um miolo mais uniforme (Monteiro et al., 2021).

Tabela 1: Composição média dos dois tipos de pão (por 100 g).

Componentes	Pão de Trigo	Pão de Trigo integral
Energia, kcal	290	232
Água, g	26,2	40,3
Proteína, g	8,4	7,6
Açúcares	2,1	2,2
Lípidos, g	2,2	3
Amido, g	55,2	37,7
Fibra, g	3,8	7,4
Cinza, g	2,09	1,78
Sódio (Na), mg	610	500
Potássio (K), mg	120	220
Cálcio (Ca), mg	43	55
Fósforo (P), mg	160	250
Magnésio (Mg), mg	31	93
Ferro (Fe), mg	2,2	3
Zinco (Zn), mg	1	2

Adaptado do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2010)

Cor

A cor é um dos fatores visuais que influenciam de forma mais relevante a preferência dos consumidores. A cor da crosta resulta de reações químicas durante o cozimento, como pirólise, caramelização e reações de Maillard (Monteiro et al., 2021).

Volume

O volume é um importante indicador de qualidade do pão, influenciando acentuadamente a escolha do consumidor. As características volume e densidade do pão são inversamente proporcionais, refletindo a relação entre o teor de sólidos e a quantidade de ar na massa assada. No entanto, o volume do pão está diretamente relacionado à

quantidade de água retida na massa. Geralmente, um volume menor está associado a um maior teor de humidade (Monteiro et al. 2021).

1.3. Farinha de trigo

A quantidade de proteína presente na farinha determina a sua qualidade, pois estas vão formar a rede de glúten. No que diz respeito à percentagem de proteínas no trigo, as albuminas e globulinas contribuem com aproximadamente 15% das proteínas do trigo, sendo as restantes (85%) as gliadinas e gluteninas, que são as principais responsáveis pela formação do glúten (Coultate, 2009).

As farinhas resultantes da moagem do trigo possuem características ímpares no que respeita à produção de pão. Em Portugal, os números dos tipos de farinha indicam o grau de moagem do cereal. As farinhas tipo 55, 65 ou 85 caracterizam-se por serem farinhas brancas devido à moagem fina. Este tipo de farinha contém apenas o endosperma do grão, pois durante a refinação ocorre, não só, a remoção da casca, mas também a destruição da maioria das vitaminas do grão. O processo de moagem separa o farelo rico em fibras do resto do grão. Neste processo aumenta ligeiramente os teores de amido e glúten. As farinhas tipo 130, 150 ou 170 são elaboradas a partir do farelo do grão e dão origem a um pão mais escuro, preservando todas as características dietéticas e nutritivas, contendo diversas vitaminas, alto teor de fibras e gordura insaturada (Koletta et al., 2014).

As farinhas de trigo padrão portuguesas variam do tipo 55–65 (farinha de trigo branca) utilizada em pastelaria, até ao tipo 150 (farinha integral) utilizada em massas e pão integral. As farinhas de centeio padrão variam do tipo 70-85 (farinha semi-integral) usada na panificação, até ao tipo 130-170 (farinhas integrais) e dão ao pão uma cor escura crescente e forte (Weekendbakery, 2018).

Segundo a Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação (SPCNA, 2003), a farinha para a indústria de panificação, pastelaria, biscoitos e bolachas deve estar em conformidade com as características descritas na Tabela 2.

Como se pode observar na Tabela 2 representada, a farinha de trigo T150 destaca-se da farinha de trigo T55 pelo seu elevado teor em proteínas, açúcares, lípidos e fibras.

Tabela 2: Composição nutricional e valor energético da farinha de trigo T150 e T55.

Componentes	Farinha de trigo T150	Farinha de trigo T55
Energia, kcal	352	344
Água, g	10,7	13,4
Proteína, g	9,1	7,8
Açúcares	2,6	1,5
Lípidos, g	1,8	1,1
Fibra, g	3,7	2,9
Cinza, g	1,60	0,50
Sódio (Na), mg	3	3
Potássio (K), mg	160	130
Cálcio (Ca), mg	29	26
Fósforo (P), mg	100	140
Magnésio (Mg), mg	21	36
Ferro (Fe), mg	1.1	1.2
Zinco (Zn), mg	0,6	0.9

Adaptado: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2010)

1.3.1. Características de composição das farinhas para panificação

Proteína

Como referido anteriormente a proteína do trigo desempenha um papel primário na farinha, pois influencia a qualidade funcional e a sua apetência para panificação. O teor de proteína, particularmente o glúten, é fundamental para a qualidade dos produtos de panificação. Esse teor varia conforme a classe do trigo, as condições de cultivo e o tipo de solo. Farinhas com maior teor proteico apresentam maior capacidade de absorção de água e favorecem o crescimento do pão (Cato & Mullan, 2020). Segundo Cauvain & Young (2007), o teor de proteína ideal na farinha para panificação é de 12%.

Humidade

O teor de humidade no grão de trigo é um fator comercial significativo, pois afeta o peso específico, o rendimento da moagem, a conservação e as características tecnológicas. O controlo da humidade é decisivo para a preservação quer do grão quer da

farinha (Cato & Mullan, 2020). Segundo a Portaria n.º 254/2003, de 19 de março, o nível recomendado de humidade para as farinhas de trigo é de 14,5%.

Cinza

O teor de cinza indica o conteúdo mineral da farinha. Este parâmetro afeta a aparência (brilho) da farinha, bem como a resistência da massa e o desempenho na cozedura. Este é influenciado pelo tipo de extração da farinha de trigo, quanto maior for o grau de extração, maior será a quantidade de farelo incorporado e, conseqüentemente, mais elevado será o teor de cinza. Farinhas com teor de cinza mais elevado tendem a ser mais escura e ricas em fibras. De um modo geral, os consumidores valorizam as farinhas mais claras. Além disso, o teor de cinzas pode variar dependendo da variedade do trigo, das condições de cultivo e o tipo de fertilização do solo (Raigond et al., 2015).

A determinação do teor de cinza durante a moagem do grão é crucial, uma vez que a percentagem deste composto determina o tipo comercial da farinha (Zhang et al., 2022).

1.4. Fermentação

A fermentação é uma das etapas mais decisivas na tecnologia de panificação, exercendo uma grande influência na qualidade, textura, sabor e aparência do pão. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável por este processo, sendo amplamente utilizada na indústria de panificação devido à sua eficiência e fiabilidade. A facilidade de utilização de *Saccharomyces cerevisiae* é outro fator que contribui para a sua popularidade. Esta está disponível comercialmente em várias formas, como levedura seca ativa e levedura fresca, facilitando o seu uso quer para panificadores domésticos quer para a indústria de panificação.

Neste processo, as leveduras consomem os açúcares presentes na massa, produzindo dióxido de carbono (CO₂) e etanol como subprodutos. O CO₂ é essencial para a formação de bolhas na massa, fazendo com que esta cresça resultando num pão leve com miolo mais areado. Na ausência deste processo, o pão seria denso e menos agradável ao paladar (Hansen & Schieberle, 2005). Além de influenciar o volume do pão, a fermentação contribui significativamente para o desenvolvimento do sabor. Os

compostos voláteis e os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação conferem ao pão um sabor mais complexo e agradável.

A textura deste produto também é diretamente influenciada pela fermentação. A sova da massa faz com que as cadeias de glúten estiquem e alinhem, tornando a massa mais lisa e elástica. Esta elasticidade retém as bolhas de CO₂ produzidas durante a fermentação, formando bolsas de ar, isto é essencial para obter a textura desejada no pão. Além das qualidades organoléticas, a fermentação pode aumentar a biodisponibilidade de certos nutrientes no pão.

Capítulo 2

Material e Métodos



Todos os nossos ensaios foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia e Química Analítica do Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

2.1. Farinha de trigo Barbela

A farinha utilizada, da variedade Portuguesa trigo Barbela T150 orgânico, foi adquirida em fevereiro de 2024, à empresa Farinhas Paulino Horta, LDA, localizada em Alenquer.

2.2. Preparação das amostras de massa fermentada

Para desenvolver diferentes variedades de massa fermentada (MF) a fim de obter a melhor receita de pão (Figura 2). Foram realizados 18 ensaios, segundo um desenho experimental (Plackett-Burman) obtido através do programa R variando os parâmetros descritos na Tabela 3. Os parâmetros analisados incluíram a quantidade de sal marinho grosso, levedura seca desidratada (fermento Fermipan / Lallemand, Portugal (*Saccharomyces cerevisiae*)), temperatura, e tempo de fermentação, mantendo constante a quantidade de farinha de trigo Barbela e a água.



Figura 2: Amostras de massa fermentada.

Para a preparação das amostras, numa balança semi-analítica da marca Kern ADB, pesaram-se separadamente os ingredientes secos e húmidos, que constam da Tabela 4. Os ingredientes secos foram incorporados manualmente e misturados durante dois minutos, adicionando-se posteriormente a água. Todos os ingredientes foram misturados durante 10 minutos ou até formação de uma massa lisa e homogénea.

Após a mistura, a MF foi submetida às temperaturas e tempos sumariados na Tabela 3. Durante os processos fermentativos, foram realizadas análises microbiológicas, nomeadamente a contagem de leveduras, com o objetivo de avaliar o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em cada ensaio. De seguida, preparou-se o pão com estas misturas, sendo analisados os seguintes parâmetros: teor humidade, cinzas, proteína total, pH, gordura, hidratos de carbono e valor energético.

Tabela 3: Desenho experimental Plackett-Burman para a otimização das condições de fermentação.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Sal (g)	Levedura (g)
1	1	20	1	1
2	3	30	1,4	1
3	5	40	0,6	3
4	3	20	1	3
5	1	30	0,6	4
6	5	30	1,4	4
7	1	40	0,6	1
8	5	30	1	1
9	5	20	1,4	3
10	1	40	1,4	3
11	3	20	0,6	4
12	3	40	1	4
13	5	20	0,6	1
14	3	40	1,4	1
15	3	30	0,6	3
16	1	30	1	3
17	5	40	1	4
18	1	20	1,4	4

2.3. Preparação das amostras de pão

A formulação base adotada para a preparação do pão esta sumariada na Tabela 4.

Tabela 4: Composição da mistura dos ingredientes utilizados na produção dos pães.

Ingredientes	Quantidade (g)
Farinha de Trigo Barbela T150	100
Água	70
Sal	1
Levedura comercial	1

O processo iniciou-se com a pesagem de 100 g da farinha de trigo Barbela T150 (Figura 3), seguida da amassadura para o desenvolvimento da atividade do glúten. Posteriormente, a massa obtida foi colocada a fermentar à temperatura de 25°C durante 1 hora. A massa foi cozida num forno elétrico (Flama), previamente aquecido a 200°C, durante 40 minutos. O arrefecimento ocorreu à temperatura ambiente.

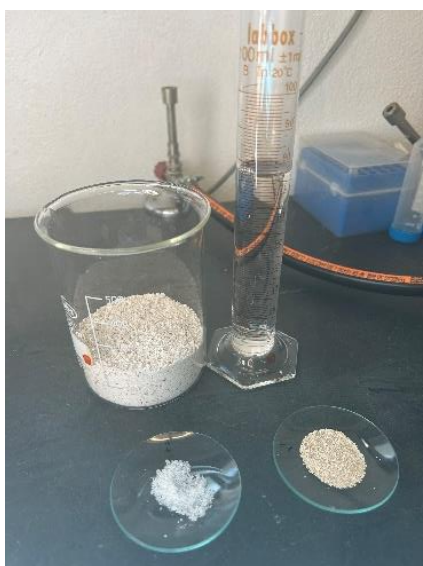


Figura 3: Ingredientes utilizados: farinha de trigo Barbela, água, sal e levedura.

Foram elaborados quatro pães utilizando a mesma receita. Estes pães foram conservados em sacos de plástico (Figura 4) e armazenados para avaliação do tempo de vida de prateleira, durante 6 dias (T0, T2, T4 e T6).



Figura 4: Estudo do tempo de vida de prateleira.

2.4. Análises microbiológicas

As análises efetuadas à amostra de farinha de trigo Barbela (FTB) tiveram como finalidade avaliar a sua qualidade microbiológica, para tal foram analisados os seguintes parâmetros: contagem total de bolores e leveduras, pesquisa e contagem de esporos de *clostridium* sulfito redutores, e pesquisa e contagem de *Bacillus cereus*.

As análises microbiológicas realizadas na massa fermentada (MF) tiveram como finalidade avaliar qual as melhores condições para o fabrico do pão, avaliando os seguintes parâmetros: contagem total de leveduras, nomeadamente *Saccharomyces cerevisiae*.

Para determinar o tempo de vida de prateleira (T0, T2, T4 e T6) do pão, os parâmetros avaliados foram: contagem de bolores e leveduras, pesquisa e contagem de coliformes totais/*Escherichia coli*, pesquisa e contagem de esporos de *Bacillus cereus* e contagem total de aeróbios mesófilos (30°C).

2.4.1. Preparação de amostras para análises microbiológicas

Para realizar as análises microbiológicas, pesou-se 5 g de cada amostra e adicionou-se 45 mL de água peptonada num frasco estéril. A mistura foi agitada e obteve-se a solução mãe (10^{-1}). Para obtenção da diluição 10^{-2} retirou-se 1 mL da solução anterior e colocou-se num tubo de falcon contendo 9 mL de água peptonada. De seguida, realizaram-se diluições decimais sucessivas até 10^{-5} . Todo este processo foi feito em duplicado.

2.4.2. Contagem de Coliformes totais/*Escherichia coli*

Para efetuar a pesquisa e contagem de coliformes totais e *E. coli*, utilizou-se o Kit Simplate, desenvolvido pela empresa Bio Control e aprovado pelo método AOAC 2005.03 (Figura 5). O meio de cultura desidratado fornecido pelo fabricante foi hidratado com 100 mL de água destilada estéril. Em seguida, pipetou-se 9 mL do meio hidratado e 1 mL da diluição decimal da amostra para um tubo de ensaio estéril. O conteúdo foi transferido para a placa Simplate, preenchendo os 84 poços com movimentos circulares, no final eliminou-se o excesso de líquido na esponja. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 a 48 horas. Após a incubação, a contagem de coliformes totais foi realizada observando-se as mudanças de cor nos poços do meio de cultura. Para a quantificação de *E. coli*, a placa Simplate foi exposta a uma lâmpada UV a 365 nm, e contaram-se os poços que apresentaram fluorescência. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) de coliformes totais e *E. coli* foi determinada usando a tabela de conversão fornecida pelo fabricante.



Figura 5: Análise de *Escherichia coli*/ Coliformes Totais.

2.4.3. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos

A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos realizou-se de acordo com a NP 4405:2002. Utilizou-se o meio de cultura Plate Count Agar (PCA). Inoculou-se 1 mL de cada uma das diluições decimais seriadas em placas de Petri, de seguida, verteu-se o meio de cultura, e agitou-se em movimentos circulares para permitir a

homogeneização. As placas foram incubadas a 30°C por 48 a 72 horas. Após esse período foram contadas as colónias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por g ou mL de amostra (UFC/g ou mL), utilizando a seguinte fórmula:

$$UFC/g \text{ ou mL} = \Sigma c / [V \times (n1 + 0,1 n2) \times d]$$

Onde:

Σc - soma total das colónias contadas em todas as placas;

V - volume de inóculo inoculado em cada placa;

n1 - número de placas contadas na primeira diluição;

n2 - número de placas contadas na segunda diluição;

d - diluição a partir da qual foram obtidas as primeiras contagens

2.4.4. Contagem total de bolores e leveduras

Na quantificação de bolores e leveduras seguiu-se a Norma ISO 21527-2:2008. Utilizou-se o meio de cultura Ágar Rosa de Bengala (Figura 6). As placas foram inoculadas com 0,1 mL de cada uma das diluições, em duplicado. O inóculo foi distribuído sobre o meio de cultura com um espalhador de vidro esterilizado. As placas foram incubadas a 25°C por 48h (contagem das leveduras) a 5 dias (contagem de fungos). Para efetuar os cálculos utilizou-se a fórmula referida anteriormente para avaliar aos aeróbios totais a 30°C. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por g de amostra (UFC/g ou ml).



Figura 6:Análise de Leveduras.

2.4.5. Contagem de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores

A contagem de esporos de *clostridium* sulfito redutores realizou-se de acordo com o reportado na Norma ISO 15213:2003. Inicialmente adicionou-se 1 mL de cada diluição para um tubo de ensaio estéril posteriormente os tubos foram colocados no banho-maria a 80°C, durante 10 minutos (inativação da amostra). Após arrefecimento em cada um dos tubos colocou-se meio de cultura seletivo e diferencial, Iron Sulfite Agar. Os tubos foram incubados em anaerobiose a 37±1°C durante 5 dias. Consideram-se como colónias suspeitas as que apresentaram cor negra.

2.4.6. Pesquisa e contagem de *Bacillus cereus*

A quantificação de *Bacillus cereus* foi efetuada pela técnica de contagem em placa segundo a ISO 7932:2004, através do espalhamento à superfície de placas de Petri contendo agar seletivo para *B. cereus* (MYP) de 0,1 mL de cada diluição decimal. As placas foram incubadas a 30°C durante 24-48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de amostra (UFC/g).

2.5. Análises físico-químicas

Foram avaliados os parâmetros físico-químicos nas diferentes amostras em estudo (FTB, MF e pão). Na FTB, analisou-se o teor de humidade, cinzas, proteína, pH e glúten. Na MF avaliou-se o teor de cinzas, proteína total e pH. Por fim no pão produzido determinou-se o teor de humidade, cinzas, proteína total, pH, gordura, teor em hidratos de carbono e valor energético.

2.5.1. Determinação do teor de humidade

A fim de avaliar a percentagem de humidade, utilizou-se o método de secagem em estufa a 105°C, de marca Memmert, baseado na remoção da água por aquecimento. Para isso, os cadinhos foram previamente aquecidos na estufa a 105 °C durante uma hora, arrefecidos em exsiccador à temperatura ambiente e pesados (massa do cadinho vazio, mc). Aproximadamente 3 gramas das amostras (massa inicial, mi) foram pesadas numa balança analítica (Kern ADB) e colocadas nos cadinhos devidamente identificados. Os

cadinhos com as amostras foram então levados à estufa por 3 horas. Após esse período, retiraram-se os cadinhos da estufa e colocaram-se no exsiccador para arrefecimento, até se obter peso constante (massa final, mf).

Os resultados expressaram-se em % de humidade com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ humidade} = \frac{mi - mf}{mi - mc} \times 100$$

Onde:

mi - massa inicial do cadinho com a amostra (g);

mf - massa do cadinho com a amostra após secagem (g);

mc - massa do cadinho vazio (g).

2.5.2. Determinação do teor de cinzas

Na determinação do teor de cinzas e do resíduo mineral, seguiu-se o método oficial nº 923.03 da AOAC. Os cadinhos vazios foram novamente aquecidos na estufa a 105 °C durante uma hora, arrefecidos no exsiccador à temperatura ambiente e pesados (massa do cadinho vazio, mc). Pesou-se, aproximadamente 3 gramas em cadinhos de porcelana devidamente identificados (massa inicial, mi). As amostras foram incineradas na mufla (Box Furnace – modelo 51894) a 550°C durante 6 horas, até a total queima da matéria orgânica (Figura 7). Após esse tempo os cadinhos foram colocados no exsiccador, arrefecidos até à temperatura ambiente e pesados (massa final, mf). Os resultados expressaram-se em % de cinzas com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{mf - mc}{mi - mc} \times 100$$

Onde:

mi - massa inicial do cadinho com a amostra (g);

mf - massa do cadinho com a amostra incinerada (g);

mc - massa do cadinho vazio (g).



Figura 7: Análise de cinzas.

2.5.3. Determinação do teor de proteína

Para determinação do teor de proteína bruta das amostras foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC - Official Method Analysis 950.36), que é composto por três etapas diferenciadas: digestão, destilação e titulação.

Inicialmente realizou-se a digestão da amostra que consistiu em pesar numa balança analítica (Kern ADB) 1g de amostra. Colocou-se a amostra num tubo de mineralização (Kjedhal), juntou-se duas pastilhas de catalisador (99,9% K_2SO_4 e 0,1% Se) e 12 mL de ácido sulfúrico. Homogeneizou-se de forma a assegurar um contato completo da amostra. Os tubos foram colocados no bloco de mineralização (modelo DK 8-Heating Digester), a uma temperatura de 420°C durante 60 minutos (Figura 8).

Após 2 horas de mineralização deixou-se arrefecer. Em seguida cada tubo contendo a amostra mineralizada foi destilado: adicionou-se uma solução de hidróxido de sódio para neutralizar o excesso de ácido sulfúrico e gerar vapor de água, resultando na formação de amoníaco. O amoníaco foi previamente preparado com ácido bórico e adicionou-se cerca de 10 gotas do indicador tashirob. De seguida, titulou-se a amoníaco com HCl a 0,2 mol/L até se atingir o ponto final, através da mudança de cor.

Para determinar a % de proteína presente nas amostras em estudo, inicialmente procedeu-se ao cálculo da % de azoto livre presente nas amostras através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ azoto} = \frac{V \times [\text{HCl}] \times 0,014}{m} \times 100$$

Onde:

V – volume gasto;

m – massa inicial da amostra

Após quantificar a % de azoto efetuou-se o cálculo da % de proteína, através da equação:

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ azoto} \times 5,7$$



Figura 8: Análise do teor de proteína.

2.5.4. Determinação do pH

O pH das amostras de farinha e pão foi determinado conforme o método oficial da AOAC n.º 943.02. Foram pesadas 3 gramas de amostra e adicionados 30 mL de água previamente aquecida a 25°C. A solução foi agitada para suspender uniformemente as partículas e deixada em contacto durante 30 minutos, agitando frequentemente. Após este período, a mistura foi deixada em repouso durante 10 minutos e, posteriormente, filtrada. O pH foi medido usando um eléctrodo de pH ligado a um potenciómetro (modelo Mettler Toledo), previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,00 e 7,00 (Figura 9).



Figura 9: Análise de pH.

2.5.5. Determinação do teor de gordura total

A quantidade de gordura total presente no pão foi determinada de acordo com o método AOAC 920.85, que utiliza a extração de gordura por Soxhlet (modelo Behrotest), empregando éter de petróleo como solvente de extração.

Aproximadamente 2 g da amostra foram pesadas e colocadas em um cartucho de Soxhlet. O cartucho foi então transferido para o extrator Soxhlet. O extrator foi acoplado a um balão de fundo achatado, previamente pesado, aquecido a 105°C. Foram adicionados 170 mL de éter de petróleo, e o conjunto foi conectado a um condensador. O sistema foi mantido sob aquecimento em uma manta elétrica (Figura 10). Após 6 horas, o cartucho foi removido, o solvente foi destilado. O balão contendo o resíduo extraído foram colocados numa estufa a 105°C por uma hora. Em seguida, o balão foi colocado num exsiccador à temperatura ambiente e novamente pesado. Este estudo foi feito em duplicado.

A percentagem de gordura é obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Teor de gordura} = \frac{m_{\text{final do balão}} - m_{\text{inicial do balão}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$



Figura 10: Análise do teor de gordura por Soxhlet.

2.5.6. Determinação de teor em hidratos de carbono e valor energético

O teor de hidratos de carbono foi calculado subtraindo a soma dos componentes de humidade, cinzas, gordura e proteína, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = 100 - (\% \text{humidade} + \% \text{cinzas} + \% \text{proteína} + \% \text{gordura})$$

O valor energético foi calculado conforme descrito no Regulamento (UE) n.º 1169/2011, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Valor energético (Kcal)} = 4 \times (\% \text{proteína} + \% \text{hidratos de carbono}) + 9 \times (\% \text{gordura})$$

2.5.7. Determinação do teor de glúten

Na avaliação dos teores de glúten húmido e seco foram realizados de acordo com o referido nas Normas ISO 21415-1 e ISO 21415-4, respetivamente. Com recurso a uma balança analítica (Kern ADB), pesaram-se 10 g de farinha de trigo para um almofariz. De seguida procedeu-se à adição lenta de 5 mL de água destilada à amostra, e amassou-se de forma contínua com um pilão de modo a formar uma bola. Posteriormente colocou-se a amostra num cadinho de porcelana e deixou-se em repouso durante 20 minutos. Após este período, lavou-se em água corrente, para eliminar toda a fase amilácea da farinha.

Secou-se o excesso de água e pesou-se o glúten húmido. O teor em glúten húmido (GH), expresso como percentagem, foi calculado através da seguinte fórmula:

$$GH (\%) = (m1 \times m0) \times 100$$

Onde:

m1 - massa, em gramas, do glúten seco extraído após a lavagem;

m0 - massa, em gramas, do resíduo;

Para determinar o teor de glúten seco, a amostra de glúten húmido foi colocada num cadinho de porcelana e submetida à secagem numa estufa a 105°C, sendo monitorada até atingir peso constante. Após a secagem, as amostras foram arrefecidas num exsiccador e posteriormente pesadas.

O teor de glúten seco (GS), expresso como percentagem, foi calculado através da seguinte fórmula:

$$GS (\%) = (m1 \times m0 (100-h)) \times 100$$

Onde:

m0- massa, em gramas, da quantidade de amostra;

m1- massa, em gramas, do glúten seco;

h – humidade, em percentagem, da farinha.

2.5.8. Calibração e análise por HPLC

Sistema de HPLC e condições experimentais

Foi utilizado um sistema HPLC composto por: uma bomba de marca Varian ProStar modelo 220 (Varian, Inc.), com fluxo de 0,6mL/min, um injetor manual Rheodyne 7725i com um loop de 20 µl; um forno de colunas 7981 Jones Chromatography; um detetor de ultravioleta marca Varian, modelo 9050, ligado em serie a um detetor de índice de refração marca Varian, modelo RI-4; e a uma coluna de marca Bio-Rad com o nome de Aminex HPX-87H, com as dimensões de 300mm por 7,8mm, mantida a uma temperatura de 30,3°C. Foi realizada uma eluição isocrática com uma fase

móvel composta por uma solução aquosa de ácido sulfúrico a 0,004 mol/L. O software Star Chromatography Workstation (versão 6.4, Varian Inc.) foi utilizado para a aquisição de dados e integração de picos. Os açúcares foram detetados com o detetor RI (detetor de índice de refração).

Os picos cromatográficos dos compostos de fermentação foram identificados comparando os tempos de retenção dos compostos puros com os registados em misturas padrão contendo todos os compostos analisados. Os picos foram quantificados utilizando calibração de padrões externos baseada nas áreas. O desempenho do HPLC foi avaliado com base no intervalo dinâmico, parâmetros da reta de calibração, bem como os limites de deteção e quantificação calculados.

Preparação de padrões e amostras

Para construir a curva de calibração foi inicialmente preparada uma solução padrão de mistura contendo glucose, sacarose, frutose, glicerol, ácido acético e etanol em diferentes concentrações. A partir desta solução padrão realizaram-se diluições utilizando água desionizada. As concentrações das soluções padrão de calibração variaram entre 10, 5, 0,75, 0,5, 0,25 e 0,125 g/L. Todos os padrões foram filtrados através de um filtro de nylon de 0,2 µm (Whatman) e analisadas numa única corrida cromatográfica.

Para a preparação das amostras das diferentes massas fermentadas, pesou-se aproximadamente 1 g de amostra e adicionou-se 10 ml de água desionizada. Após esta fase, as amostras foram colocadas num aparelho Stomacher, marca Lab System 400, para facilitar a mistura. Todas as amostras foram filtradas através de um filtro de nylon de 0,2 µm (Whatman) e armazenadas a -5°C até se efetuar análise.

2.6. Análises químicas

Os parâmetros químicos analisados nas amostras de FTB, MF e no pão foram: quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante pelo método do DPPH. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

2.6.1. Preparação dos extratos das amostras

Para a preparação dos extratos, procedeu-se à sua liofilização utilizando um liofilizador Triepic-55. Inicialmente, pesou-se 1 grama da amostra numa balança analítica (Kern ADB), à qual foram adicionados 25 mL de uma solução de etanol a 80% (v/v). A solução foi então submetida à agitação durante 1 hora. Posteriormente, o solvente do extrato foi evaporado num evaporador rotativo IKA RV8, a uma temperatura de banho de 50°C (Figura 11). No final, calculou-se o rendimento da extração através da diferença de pesos dos frascos.

Para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH e para a determinação dos compostos fenólicos totais, a diluição utilizada foi 1 mL da solução mãe num balão de 10 mL cujo volume foi completado com etanol a 80%.



Figura 11: Preparação dos extratos.

2.6.2. Determinação dos compostos fenólicos totais

Para determinar os compostos fenólicos totais, o método utilizado foi o de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos (1999), com algumas modificações. Na análise, foram pipetados 0,5 mL de amostra (amostras descritas nas seções 2.6.1.), 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% (v/v), e 2 mL de carbonato de sódio a 75 g/L. A solução foi mantida no escuro por 2 horas. Após esse período a absorvância foi medida a 760 nm num espectrofotómetro (VWR UV-3100PC). Os cálculos foram efetuados com base numa curva de calibração realizada com o padrão ácido gálico (AG). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de AG por g de amostra.

2.6.3. Determinação da atividade antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante, foi utilizado o método DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazilo), conforme reportado por Hatano et al. (1988), com algumas modificações. Foram pipetados 0,3 mL de cada uma das amostras (amostras descritas na seção 2.7.1.). para tubos de ensaio, posteriormente foram adicionados 2,7 mL do reagente DPPH. Após agitação no vortex (technoKartell TK3S) as soluções ficaram em repouso durante 1 hora no escuro. Ao fim deste tempo mediu-se a absorvância das soluções a 517 nm (Figura 12). O efeito bloqueador foi calculado pela percentagem de descoloração do DPPH usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

Sendo, A_S a absorvância da solução com o extrato da amostra, e A_{DPPH} , a absorvância da solução de DPPH. Os resultados foram expressos em mg eq Trolox/g de amostra tendo como base uma reta de calibração com trolox.



Figura 12: Análise de DPPH.

2.7. Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana das três amostras liofilizadas (FTB, MF e pão) foi avaliada contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) e Gram-positivas

(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) usando a técnica de microdiluição em meio líquido. O meio Mueller-Hinton (MHB) foi utilizado como meio de crescimento de bactérias em cultura pura, estas foram inoculadas em meio estéril e incubadas a 37°C durante a noite “Overnight”. A população bacteriana inicial foi ajustada de acordo com o padrão de 0,5 McFarland.

Para determinar a concentração mínima inibitória (CIM), e a concentração mínima bactericida (CBM), cada amostra foi dissolvida em DMSO a 5%, na concentração inicial de 5g/mL.

A técnica foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de meio MHB (Figura 13). Em seguida foram acrescentados 100 µL de cada amostra, e a partir daí foram efetuadas diversas diluições seriadas. Posteriormente foram adicionados 30 µL das suspensões dos microrganismos teste e por fim acrescentados 20 µL de corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona10-óxido). As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Foram incluídos o controle positivo (microrganismo e meio de cultura) positivos e controles negativos (meio de cultura; meio de cultura e DMSO a 5%). Os testes foram realizados em duplicado.

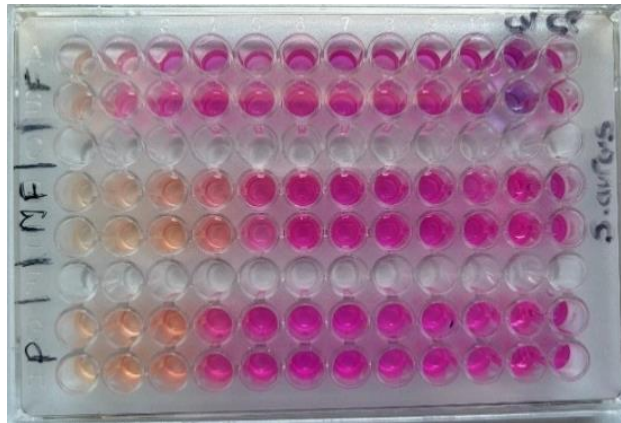


Figura 13: Análise da atividade antioxidante.

O valor da CIM foi definido como a menor concentração que inibiu o crescimento visível das bactérias testadas em poços da placa de microdiluição.

As concentrações mínimas bactericidas (CBM) foram definidas como a menor concentração capaz de eliminar toda a população dos micro-organismos. Para isso, uma alíquota de 20 µL de cada poço da placa de microdiluição onde não se verificou

crescimento foi subcultivada em placas de HIA. Após 24 horas de incubação a 37°C, foi realizada efetuada a contagem das colónias.

O agente foi considerado bactericida na concentração em que o número de colónias na placa foi inferior a 10.

Capítulo 3

Resultados e Discussão



Nesta secção serão abordadas as diferentes análises realizadas à FTB, à MF e ao pão. Estas incluem análises microbiológicas, físico-químicas, químicas e atividade antimicrobiana. Além disso, serão apresentados os resultados obtidos no desenho experimental.

3.1. Análises à farinha de trigo Barbela

No estudo da FTB foram realizadas diversas análises, incluindo análises microbiológicas, análises físico-químicas, químicas e avaliação da atividade antimicrobiana, com o objetivo de caracterizar as suas propriedades e qualidade.

3.1.1. Análises microbiológicas

Com objetivo de garantir a qualidade e a segurança da farinha de trigo Barbela, avaliou-se a presença de microrganismos que possam comprometer a sua integridade e a saúde dos consumidores. Para isto, foram realizadas análises específicas para diferentes grupos de microrganismos, incluindo bolores e leveduras, esporos de clostrídios sulfito-redutores e *Bacillus cereus*.

Khanom, Shammi e Kabir (2016) descreveram a presença de 5,33 log UFC/g para leveduras e bolores em farinhas não embaladas. Berghofer, Hocking, Miskelly e Jansson (2003) também observaram a análise microbiológica da farinha de trigo australiana e relataram a contaminação da amostra com leveduras e bolores, com contagens de 10^2 UFC/g.

Da análise da Tabela 5, constata-se que a farinha de trigo Barbela não apresentou qualquer tipo de crescimento microbiano nas condições testadas, sugerindo que a farinha em estudo encontra-se em conformidade com os padrões microbiológicos de segurança alimentar.

Tabela 5: Resultados das análises microbiológicas da FTB

Amostra	Bolores e Leveduras (log UFC/mL)	<i>Clostridium sulfito-redutores</i> (UFC/mL)	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/mL)
Farinha de trigo Barbela T150	<1	<1	<1

Resultados expressos em média das análises \pm desvio padrão

3.1.2. Análise físico-químicas

Nas análises físico-químicas à FTB avaliaram-se os seguintes parâmetros: teor de humidade, cinzas, proteína total, glúten e pH. Em termos comparativos, também se analisou uma amostra de farinha de trigo Espelta.

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos nas análises físico-químicas efetuadas às farinhas. Verificaram-se erros de desvio padrão inferiores a 3,7%. O teor de humidade apresentou um valor de 11,12%. De acordo com a Portaria n.º 254/2003, de 19 de março, a percentagem máxima permitida de humidade em farinhas de trigo é de 14,5%, o que coloca este resultado dentro do limite legal.

O teor de cinzas, determinado pela incineração completa da amostra, foi de 1,58%, estando em conformidade com os intervalos definidos na mesma Portaria (1,21-2,00%). O teor de cinzas está diretamente relacionado com a taxa de extração da farinha, influenciando também a sua coloração. O conteúdo de proteína total da farinha Barbela foi de 12,65%. Um parâmetro igualmente relevante é o teor de glúten, que desempenha um papel crucial nas propriedades reológicas da massa, fornecendo plasticidade, viscosidade e elasticidade. Os teores de glúten húmido e seco encontrados foram de 35,05% e 13,13%, respetivamente, ambos de acordo com os requisitos legais (>7%) O valor de pH obtido na farinha Barbela é de 6,15.

Ao comparar estes resultados com os obtidos com uma amostra de farinha Espelta, verificou-se que a FTB apresentou valores ligeiramente inferiores em termos de humidade, cinzas e proteína total. A humidade na farinha de Espelta foi de 12,61%, teor de cinzas de 1,82% e proteína total de 13,77%.

Tabela 6: Resultados das análises físico-químicas (humidade, cinzas, proteína total, glúten húmido, glúten seco, glúten total e pH) na FTB.

Amostra	Humidade (%)	Cinzas (%)	Proteína Total (%)	Glúten Húmido (%)	Glúten Seco (%)	Glúten Total (%)	pH
Farinha de trigo Barbela T150	11,12±0,41	1,58±0,01	12,66±0,40	35,04±1,28	13,14±0,11	37,50±1,05	6,15±0,01
Farinha Espelta	11,64±4,27	1,85±2,04	13,77±1,52	42,96±1,97	26,95±2,40	37,55±1,45	6,11±0,04

Resultados expressos em média das análises ± desvio padrão

A ANOVA foi aplicada para identificar diferenças significativas entre as duas farinhas para averiguar quais os parâmetros físicos-químicos apresentavam diferenças significativas (nível de significância 0,05). Os resultados da ANOVA permitiram verificar que havia diferenças significativas nos resultados das cinzas ($p=0,017$), glúten seco ($p=0,002$) e glúten húmido ($p=0,02$), tendo-se obtido valores inferiores na farinha de trigo Barbela. No que diz respeito ao teor de humidade ($p=0,45$), proteína total ($p=0,08$) e glúten total ($p=0,95$) não apresentaram diferenças significativas entre as duas farinhas.

Para comparação consideraram-se os resultados do estudo realizado por Frakolaki et al. (2018), com a farinha de trigo T70: humidade de 13,75%, teor de cinzas de 0,63%, proteína total de 11,58% e glúten total 28,24%.

3.1.3. Análises químicas

Nesta secção quantificaram-se os fenóis totais e a atividade antioxidante da FTB, cujos resultados estão apresentados na Tabela 7. Os resultados mostraram que a farinha contém $7,57 \pm 0,14$ mg eq. AG/g de farinha em fenóis totais e uma atividade antioxidante de $32,49 \pm 0,57$ mg eq. Trolox/g de farinha no teste DPPH. Esses valores demonstraram que a farinha possui uma significativa presença de compostos fenólicos e uma considerável capacidade antioxidante.

Tabela 7: Resultados das análises químicas na FTB.

Amostra	Fenóis Totais (mg eq. Ácido Gálico / g)	DPPH (mg eq. Trolox / g)
Farinha de trigo Barbela T150	$7,57 \pm 0,14$	$32,49 \pm 0,57$

Resultados expressos em média das análises \pm desvio padrão

Estudos indicam que farinhas de grãos integrais, como a Barbela, tendem a apresentar maior quantidade de compostos fenólicos em comparação com farinhas refinadas, devido à preservação de partes do grão como o farelo e o embrião, onde muitos desses compostos estão concentrados (Kosík et al., 2014). Além disso, a alta atividade antioxidante medida por DPPH indica uma boa capacidade de neutralização de radicais

livres, o que pode contribuir para benefícios para a saúde, como a redução do risco de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo (Li et al., 2007).

3.1.4. Análise da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato da farinha foi avaliada determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) (ver secção 2.5). O extrato foi dissolvido em DMSO a 5%, com uma concentração inicial de 5 g/mL. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento visível das bactérias nos poços da placa de microdiluição.

A CBM, por sua vez, foi considerada a menor concentração capaz de eliminar completamente as bactérias, sendo avaliada através da subcultura de 20 µL dos poços sem crescimento em placas de HIA, incubadas a 37°C durante 24 horas. Considerou-se como CMB a concentração correspondente à placa onde se observou a crescimento de menos de 10 colónias.

Os resultados obtidos demonstraram que, para as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, a atividade inibitória ocorreu no primeiro no primeiro poço, correspondente à concentração de 5 g/mL, O extrato de farinha não teve efeito bacteriostático contra os microrganismos em estudo.

3.2. Otimização da MF

Nesta secção estudou-se o processo de fermentação da massa de trigo, usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os parâmetros avaliados foram: quantificação dos teores de etanol, glicerol, ácido acético, açúcares (glucose, frutose, sacarose), cinzas, proteína total, e, o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.1. Crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Nos ensaios associados ao desenho experimental monitorizou-se o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* após o respetivo tempo de fermentação (ver secção 2.2.) que se apresentam na Tabela 8.

Com base nos resultados obtidos para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* verifica-se que os ensaios com maiores quantidades de levedura (ensaios 5, 6,

12 e 18, com concentração inicial de 4 g de levedura) apresentam um crescimento muito mais rápido e eficiente. A adição de uma maior concentração de levedura acelera o processo fermentativo, aumentando significativamente a produção de CO₂ e, conseqüentemente, a expansão da massa. Nessas condições, o efeito de variáveis como tempo de fermentação e quantidade de sal torna-se secundário, uma vez que a alta concentração de levedura dominou o processo. Em contrapartida, nos ensaios com 1 g de levedura (ensaios 2, 3, 7 e 13) resultaram em um crescimento menos acentuado. Este facto permitiu observar mais claramente a influência dos outros fatores, como a temperatura e o sal, na fermentação.

Tabela 8: Resultados das análises microbiológicas efetuadas no desenho experimental.

Ensaio	Contagem de levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
1	6,53±0,30
2	6,21±0,43
3	7,18±0,21
4	6,87±0,05
5	7,00±0,28
6	5,84±0,54
7	7,09±0,08
8	6,73±0,11
9	5,78±0,48
10	7,11±0,04
11	6,74±0,01
12	7,29±0,10
13	5,78±0,48
14	6,95±0,03
15	6,76±0,19
16	6,35±0,15
17	6,70±0,07
18	7,23±0,01

Resultados expressos em média das análises ± desvio padrão

3.2.2. Calibração do HPLC

Nesta secção apresentam-se os resultados da calibração do HPLC (intervalo dinâmico, parâmetros da reta de calibração, bem como os limites de deteção e quantificação calculados). A Tabela 9 apresenta os dados obtidos na calibração da análise de seis compostos (sacarose, glucose, frutose, glicerol, ácido acético e etanol) por HPLC.

As calibrações foram efetuadas com concentrações dentro do intervalo de 0,018 a 5,20 g/L. Analisando os resultados da regressão linear entre as áreas dos picos e as respectivas concentrações, observou-se que os valores de correlação para todos os compostos são muito próximos de 1 (valor teórico), sugerindo uma boa linearidade.

O valor de correlação para o glicerol foi de 0.999998, indicando um ajuste quase perfeito. A linearidade pode ser visualizada na Figura 14, onde se representam as retas de calibração obtidas para os compostos analisados.

Os declives variam entre os compostos, refletindo diferenças na sensibilidade do detetor RI para cada um deles. Por exemplo, o declive mais elevado foi obtido para a glucose, seguido pela frutose e pela sacarose. Isso indica que o detetor é mais sensível a essas substâncias em comparação com as outras.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são muito importantes na validação de resultados dos métodos analíticos, pois definem as zonas de não detecção, detecção e quantificação do composto analisado. Por isso, os melhores resultados são aqueles com os menores valores de LD e LQ, pois indicam a capacidade do método analítico em detetar e quantificar o analito em concentrações mais baixas. Como os coeficientes de correlação mostra boa linearidade (Figura 14) nas calibrações, os limites calculados com os parâmetros da regressão linear mostram ser de confiança. Globalmente, os LD e LQ são baixos para os seis compostos analisados. O melhor resultado em termos de LD foi o glicerol, seguido pela frutose. Em termos de LQ, o glicerol também apresenta o resultado mais baixo, seguido pelo ácido acético com 0.0414 g/L. O valor LD mais elevado foi o do etanol, com um valor de 0.0511 g/L. Em termos de LQ, o etanol também apresentou o resultado mais alto. Esses valores indicam que o método analítico é particularmente sensível para a detecção de glicerol, enquanto, o etanol necessita de maior nível de concentração para ser detetável. No entanto, neste trabalho os níveis de etanol obtidos são superiores ao LQ. É importante notar que esses resultados podem ser influenciados por vários fatores, incluindo condições do equipamento, pureza dos padrões, erros experimentais, eficiência do detetor e matriz da amostra.

A crítica geral dos valores da ordenada na origem das calibrações obtidas para os diferentes compostos deve levar em consideração os princípios da química analítica. A ordenada na origem num gráfico de calibração representa a resposta do instrumento quando a concentração do analito é zero. Idealmente, o valor deve ser próximo ou igual a zero, indicando que a resposta do instrumento não é afetada por outros fatores além da concentração do analito.

Tabela 9: Dados da calibração do HPLC para a análise de sacarose, glucose, frutose, glicerol, ácido acético e etanol.

Compostos	Concentrações, g/L			Parâmetros da calibração			
	Min	Máx	Declive	Ord. Origem	Correlação	LD, g/L	LQ, g/L
Sacarose	0,0254	5,08	1432877,9	25922,7	0,99992	0,0437	0,1324
Glucose	0,0255	5,10	1514343,7	30824,9	0,99994	0,0382	0,1159
Frutose	0,0260	5,19	1485119,5	23627,9	0,99997	0,0272	0,0823
Glicerol	0,0186	3,71	1214592,4	349,1	0,999998	0,0050	0,0150
Ácido Acético	0,0213	4,27	763350,5	-5125,1	0,999989	0,0137	0,0414
Etanol	0,0205	4,10	649748,1	-16633,9	0,9998	0,0511	0,1549

Pode-se observar que os valores da ordenada na origem para sacarose, glucose, frutose, e glicerol são positivos e relativamente altos, enquanto os valores para ácido acético e etanol são negativos.

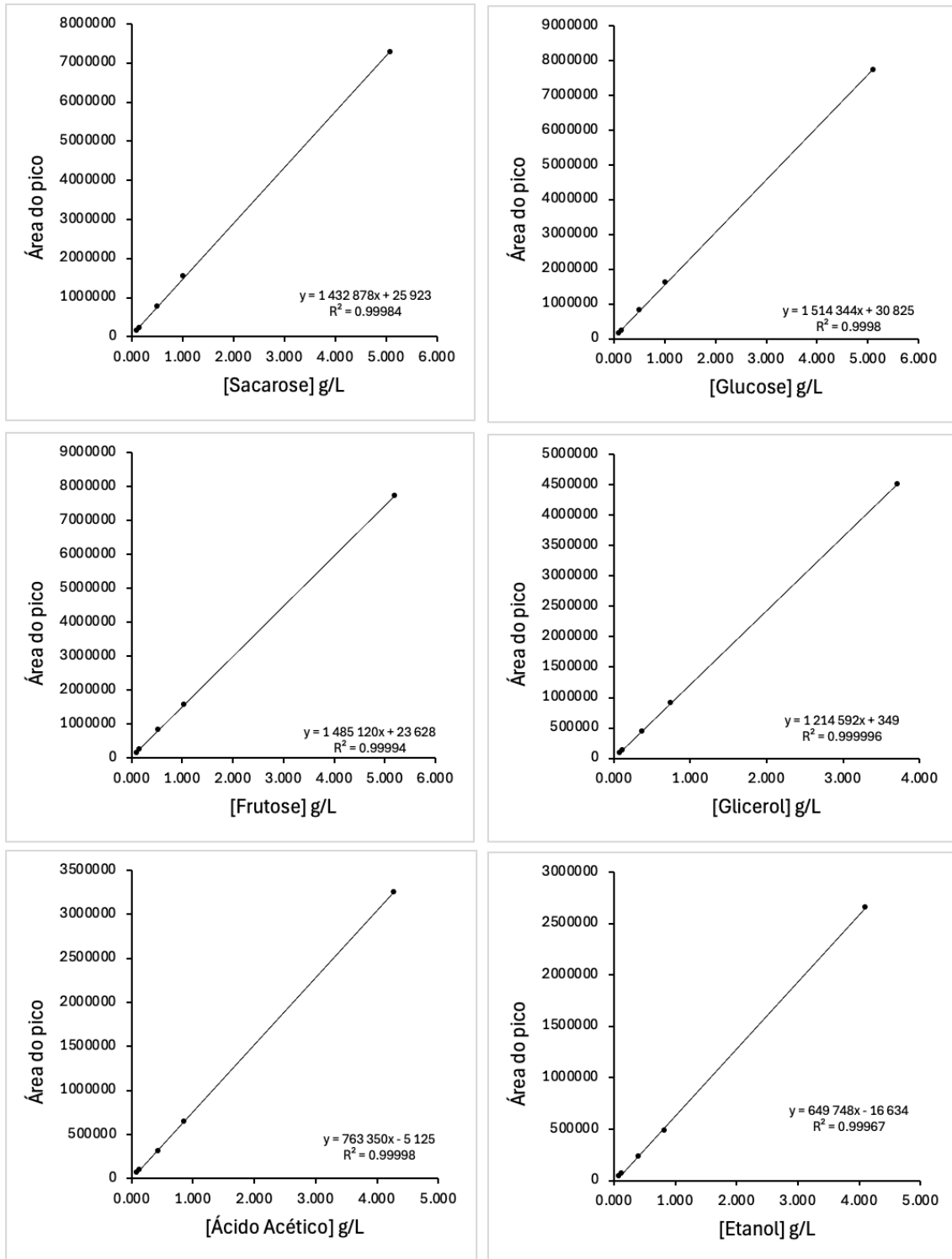


Figura 14: Retas de calibração obtidas para os compostos de fermentação analisados por HPLC: sacarose; glucose; frutose; glicerol; ácido acético e etanol.

Valores positivos altos podem indicar a presença de ruídos de fundo (linha de base) que contribuem para a resposta do instrumento, mesmo na ausência do analito. Valores negativos para a ordenada na origem são ainda mais problemáticos, pois teoricamente não fazem sentido, uma vez que a resposta do instrumento não pode ser negativa quando a concentração é zero. Globalmente, isto pode ser indicativo de erros com a linha de base do instrumento, ou o método de medição da área do pico ou o modelo de regressão.

Em resumo, os resultados da calibração do HPLC apresentam uma boa linearidade e com limites de detecção e quantificação adequados para todos os analitos. As limitações referidas, embora mereçam atenção futura para a otimização das calibrações, não afetam a robustez e a confiabilidade do método analítico.

3.2.3. Análises físico-químicas e químicas

Após a fermentação da massa de trigo mediram-se os teores em cinzas, proteína, sacarose; glucose; frutose; glicerol; ácido acético e etanol, os resultados apresentam-se na Tabela 10.

Os valores das cinzas (teor mineral) oscilaram ligeiramente, entre 1,27% e 1,76%, sugerindo que a quantidade de material inorgânico presente nas amostras é relativamente estável, como esperado, considerando que se adicionou sal. O teor de proteínas variou entre 8,78% e 9,80% indicando que o nível de proteína entre as amostras é bastante uniforme. As restantes amostras apresentaram valores próximos do valor médio, demonstrando consistência na qualidade proteica das amostras. Relativamente aos produtos resultantes da fermentação constata-se que a sacarose apenas foi detetada nos ensaios 6, 11 e 13, com valores de 0,165 g/L, 0,161 g/L e 0,407 g/L, respetivamente. A concentração de glucose foi mais elevada no ensaio 13, com 0,627 g/L, e a frutose apenas foi detetada nesse mesmo ensaio (0,409 g/L). O glicerol foi consistentemente encontrado em todos os ensaios, com concentrações variando entre 0,113 g/L (ensaio 13) e 0,310 g/L (ensaio 17). O teor de ácido acético foi baixo, oscilando entre 0,053 g/L e 0,070 g/L. Por fim, o etanol foi observado em todas as amostras, variando entre 0,349 g/L (ensaio 13) a 1,174 g/L (ensaio 16).

Tabela 10: Resultados das análises físico-químicas e químicas efetuadas no desenho experimental.

Ensaio	Cinzas (%)	Proteína Total (%)	Sacarose, g/L	Glucose, g/L	Frutose, g/L	Glicerol, g/L	Ácido Acético, g/L	Etanol, g/L
1	1,53±0,06	9,01±0,40	D	D	D	0,184±0,003	D	1,054±0,034
2	1,68±0,02	9,18±0,40	D	ND	ND	0,238±0,004	D	1,125±0,028
3	1,35±0,01	9,32±0,12	D	0,447±0,027	ND	0,263±0,003	0,066±0,024	0,809±0,031
4	1,48±0,02	8,92±0,36	D	ND	ND	0,255±0,002	D	1,094±0,018
5	1,37±0,01	9,41±0,08	D	ND	ND	0,219±0,001	D	1,081±0,014
6	1,76±0,08	9,69±0,01	0,165±0,031	ND	ND	0,224±0,002	D	0,999±0,021
7	1,27±0,02	9,09±0,20	D	ND	ND	0,158±0,003	D	1,006±0,036
8	1,61±0,02	8,89±0,16	D	ND	ND	0,202±0,003	D	0,905±0,042
9	1,70±0,03	8,89±0,24	D	0,278±0,027	D	0,233±0,004	D	0,860±0,035
10	1,76±0,27	8,78±0,97	D	D	ND	0,299±0,002	0,067±0,015	1,162±0,018
11	1,33±0,03	8,92±0,36	0,161±0,031	0,285±0,027	ND	0,260±0,003	0,056±0,020	1,038±0,023
12	1,60±0,03	9,06±0,24	D	D	ND	0,302±0,003	0,070±0,018	1,113±0,044
13	1,31±0,06	9,29±0,16	0,407±0,031	0,627±0,027	0,409±0,018	0,113±0,002	D	0,349±0,038
14	1,39±0,41	9,18±0,08	D	D	ND	0,218±0,002	D	1,047±0,029
15	1,45±0,16	9,80±0,08	D	D	ND	0,266±0,004	D	1,107±0,033
16	1,49±0,08	9,21±0,28	D	D	ND	0,264±0,001	0,050±0,033	1,174±0,019
17	1,47±0,24	9,06±0,73	D	D	ND	0,310±0,002	0,068±0,016	1,064±0,033
18	1,54±0,36	9,29±0,01	D	D	ND	0,285±0,003	0,053±0,022	1,189±0,012

Resultados expressos em média das análises ± desvio padrão

Esses resultados indicam diferentes padrões de fermentação, com variação na produção de etanol e outros metabolitos, como o glicerol e o ácido acético, dependendo das condições experimentais.

Segundo Trinh (2013) a glucose é geralmente o açúcar preferencialmente utilizado pelas leveduras, no entanto podem também utilizar como fonte de carbono e energia a frutose, a sacarose e a maltose. O etanol é um produto chave na fermentação do pão, contribui para o desenvolvimento de compostos voláteis que melhoram o aroma e o sabor do produto, enquanto o CO₂ é responsável pela expansão da massa. Este gás é retido pela rede de glúten, causando a fermentação visível e o aumento de volume.

Aslankoohi E et al. (2015) estudaram o impacto da produção de glicerol pela levedura na capacidade de fermentação da massa de pão, comparando uma estirpe comercial de padaria com uma estirpe de laboratório. Observaram que uma produção de glicerol tem efeitos positivos na fermentação e no desenvolvimento ideal da massa. Adicionalmente, este metabolito também atua na retenção adequada de dióxido de carbono, essencial para a qualidade final do pão.

Codina e Voica (2010) avaliaram de que forma o tipo de fermento (comprimido, seco instantâneo e seco ativo), obtidos a partir da *Saccharomyces cerevisiae* de padreiro, influenciam a concentração de açúcares ao longo de diferentes tempos de fermentação. Os autores concluíram que, no início do processo, a levedura fermenta preferencialmente a glucose, e apenas em fases mais avançadas da fermentação utiliza maltose e frutose como fontes de hidratos de carbono para o seu metabolismo.

Além disso, durante a fermentação da massa de trigo, há um intercâmbio de produtos consumidos e produzidos. Os hidratos de carbono, em especial o amido, são convertidos em açúcares mais simples pelas enzimas amílases, enquanto as proteínas do trigo sofrem degradação parcial pelas protéases (Gänzle, 2014). O processo resulta na produção de compostos importantes, como ácidos orgânicos (ácido lático e acético), que conferem acidez e sabor, gás carbônico, que faz a massa crescer, e compostos aromáticos voláteis, responsáveis pelo aroma e sabor característicos (Gobbetti et al., 2014). A interação desses produtos durante a fermentação natural confere características únicas ao pão, nomeadamente maior firmeza e um perfil sensorial distinto em relação aos pães produzidos com fermento comercial (Katina et al., 2006).

3.2.4. Modelos de RSM

O modelo RSM obtido foi uma combinação linear representada pela seguinte equação:

Resposta =

$$a_1 \times F1 + a_2 \times F2 + a_3 \times F3 + a_4 \times F4 + \\ a_5 \times F1^2 + a_6 \times F2^2 + a_7 \times F3^2 + a_8 \times F4^2 + \\ a_9 \times F1:F2 + a_{10} \times F1:F3 + a_{11} \times F1:F4 + a_{12} \times F2:F3 + a_{13} \times F2:F4 + a_{14} \times F3:F4$$

sendo,

F1 - Tempo de fermentação;

F2 - Temperatura de fermentação;

F3 - Quantidade de sal;

F4 - Quantidade de levedura.

Os resultados de significâncias dos coeficientes (a_i) estão apresentados na Tabela 11 para as respostas proteína, teor de cinzas, glicerol, ácido acético e etanol. Os dados obtidos mostram que os fatores estudados influenciam significativamente a fermentação da massa de trigo, ao nível das respostas estudadas. Os valores de p inferiores a 0,05 identificam os efeitos estatisticamente significativos dos fatores testados, sendo relevante destacar os principais fatores que interferem no comportamento de cada variável.

Proteína.

O modelo ajustado (Figura 15) explicou 40,11% da variabilidade dos dados, indicando que a adequação do modelo aos dados é limitada. Pelo que, esta limitação deve ser considerada na interpretação dos resultados do modelo. Nos efeitos principais, o tempo de fermentação (Fator 1) não foi estatisticamente significativo, sugerindo que variações na duração da fermentação não afetam significativamente o teor de proteína. Já a temperatura (Fator 2) teve um impacto marginalmente significativo: temperaturas mais elevadas podem causar um leve aumento no teor de proteína, mas esse efeito é relativamente fraco. Por outro lado, o sal (Fator 3) exerceu um efeito negativo significativo sobre o teor de proteína, indicando que maiores concentrações de sal diminuiram os níveis de proteína, provavelmente por interferir na hidratação das proteínas e na formação do glúten.

Tabela 11: Significância dos termos presentes no modelo RSM para os vários parâmetros químicos analisados na MF que inclui 4 fatores, os respectivos termos quadráticos e as interações pareadas.

Valor de p						
Fatores	Proteína	Cinzas	UFC	Glicerol	Etanol	Acido Acético
F1	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	<0,001	>0,05
F2	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
F3	0,003	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05
F4	0,040	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
F1^2	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05
F2^2	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
F3^2	0,002	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05
F4^2	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05
F1:F2	0,02	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05
F1:F3	>0,05	0,043	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001
F1:F4	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
F2:F3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
F2:F4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,011	>0,05
F3:F4	0,015	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	<0,001

F1-Tempo de fermentação; F2-Temperatura de fermentação; F3-Quantidade de sal; F4- Quantidade de levedura.

A quantidade de levedura (Fator 4), por sua vez, teve um impacto positivo significativo, sugerindo que aumentar a quantidade de levedura pode elevar o teor de proteína, possivelmente em virtude de uma fermentação mais eficiente e maior incorporação de leveduras, cujas células são ricas em proteínas.

Nos efeitos quadráticos, a temperatura foi significativa, indicando uma relação não linear. Isto significa que existe uma faixa de temperatura ótima para maximizar o teor de proteína. Temperaturas extremas (muito baixas ou muito altas) podem reduzir o teor de proteína. O sal também apresentou um efeito quadrático, o que significa que tanto uma quantidade excessiva quanto insuficiente de sal podem ter um impacto negativo no teor de proteína. Um nível moderado de sal parece ser o ideal.

Nos efeitos de interação, a interação entre o tempo de fermentação e a levedura foi significativa, o que indica que o efeito da levedura no teor de proteína depende da duração da fermentação. Uma combinação equilibrada entre a quantidade de levedura e o tempo de fermentação pode maximizar os níveis de proteína. A interação entre o sal e a levedura também foi significativa. Um teor elevado de levedura pode mitigar alguns dos efeitos negativos do sal no teor de proteína. Portanto, um equilíbrio cuidadoso entre os níveis de levedura e sal é crucial.

Segundo Preston (1989) durante a panificação o sal tem um papel essencial na formação da rede de glúten. Este pode endurecer a rede de proteínas, afetando a textura e estrutura da massa. Teores elevados de sal podem inibir a hidratação adequada das proteínas, afetando negativamente a sua funcionalidade e, conseqüentemente, o teor de proteína disponível.

Cinzas.

O teor de cinzas está geralmente relacionado com o conteúdo mineral presente na farinha e com a composição da massa. O ajustamento do modelo (Figura 16) explicou 83,99% da variabilidade, indicando que o modelo se ajusta bem aos dados, não havendo necessidade de um modelo mais complexo. Nos efeitos principais, o tempo de fermentação (Fator 1) não foi estatisticamente significativo, o que indica que o tempo de fermentação tem pouco impacto direto no teor de cinzas. A temperatura de fermentação (Fator 2) também não foi significativa, indicando que a temperatura tem uma influência mínima no teor de cinzas. A quantidade de sal (Fator 3) foi altamente significativa, sugerindo que a quantidade de sal na massa é um fator principal que afeta o teor de cinzas. O sal pode influenciar as interações minerais na massa, alterando assim o teor de cinzas.

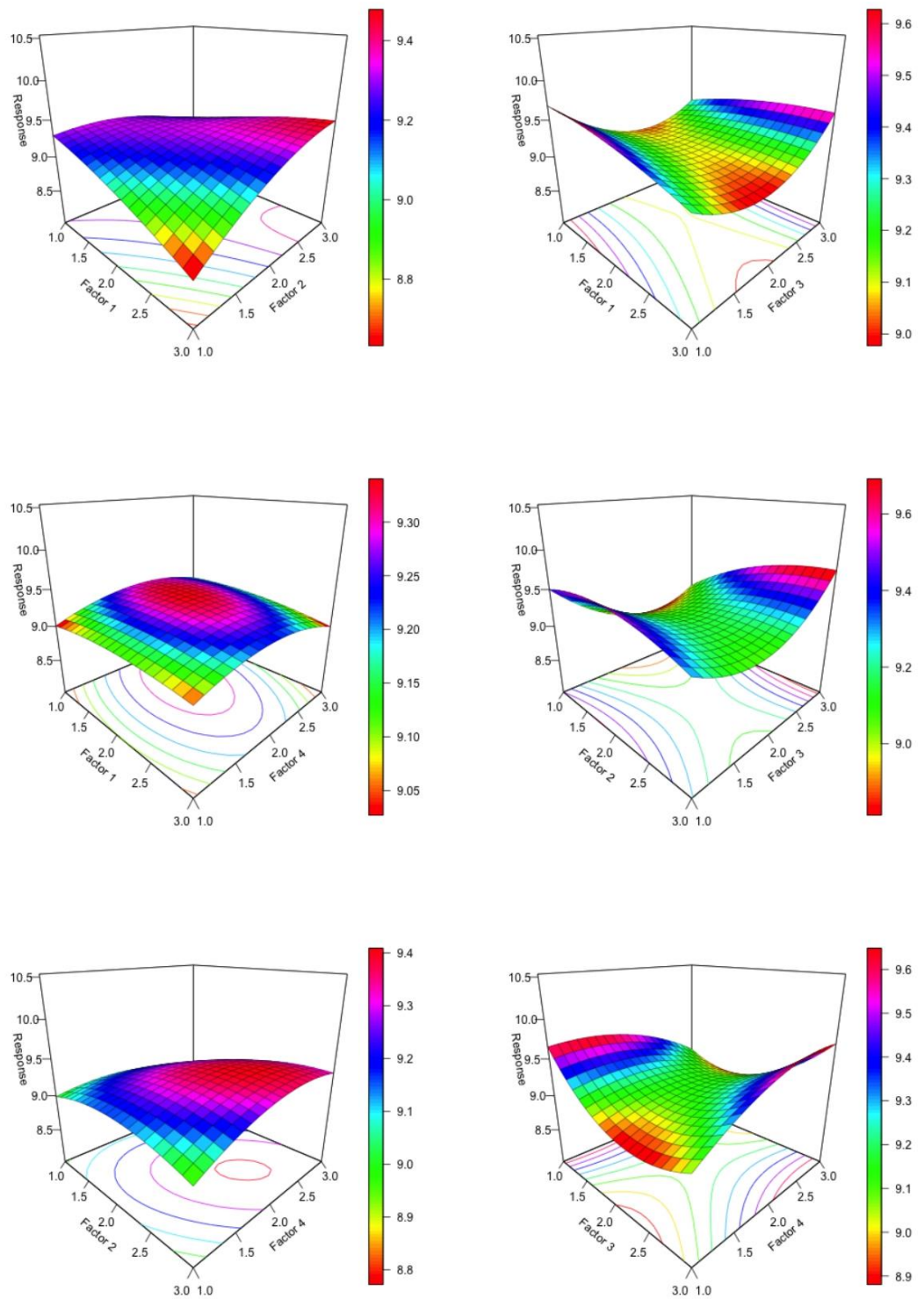


Figura 15: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a resposta “Proteína (%)”. Fator 1 - Tempo (1h, 3h, 5h); Fator 2 - Temperatura (20°C, 30°C, 40°C); Fator 3 - Quantidade de Sal (0,6g, 1g, 1,4g); e Fator 4 - Quantidade de Levedura (1g, 3g, 4g).

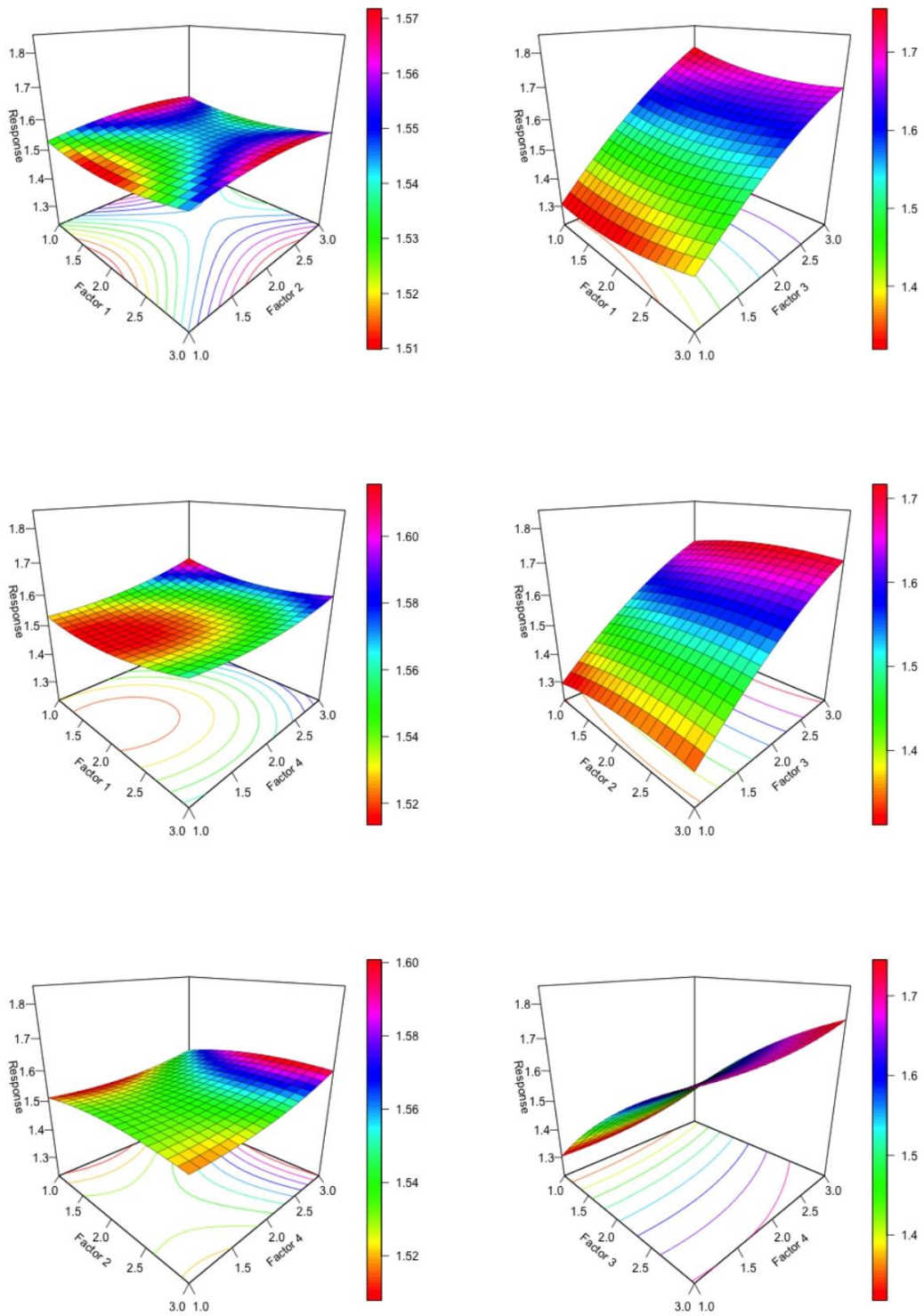


Figura 16: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a resposta "Concentração de Cinzas (%)".
 Fator 1 - Tempo (1h, 3h, 5h); Fator 2 - Temperatura (20°C, 30°C, 40°C); Fator 3 - Quantidade de Sal (0,6g, 1g, 1,4g);
 e Fator 4 - Quantidade de Levedura (1g, 3g, 4g).

A quantidade de levedura (Fator 4) apresentou uma significância marginal, sugerindo que a levedura pode ter algum efeito sobre o teor de cinzas, embora a sua influência seja menos pronunciada em comparação com o sal.

Nos efeitos de interação obteve-se uma interação significativa entre o tempo de fermentação e a quantidade de sal. Isto indica que, embora o tempo e o sal, individualmente, possam não ser significativos, a sua combinação tem um impacto importante no teor de cinzas. Otimizar ambos é crucial para controlar os níveis de cinzas. As restantes interações entre os fatores não foram significativas, o que significa que as combinações destes fatores não afetaram fortemente o teor de cinzas.

Não foram obtidos efeitos quadráticos significativos, o que sugere que as relações entre estes fatores e o teor de cinzas são lineares, conforme esperado, e não curvilíneas.

Crescimento das Leveduras.

O modelo, representado na Figura 17, ajustou-se bem aos dados, com um valor de R-quadrado de 0,767, indicando que o modelo explica 76,70% da variabilidade dos valores de UFC. O F-estatístico foi altamente significativo (valor $p < 0,001$), o que indica que o modelo se ajustou bem aos dados.

O Fator 2 (temperatura de fermentação) e o Fator 4 (quantidade de levedura) apresentaram uma forte significância. O termo quadrático do Fator 2 (temperatura de fermentação) foi altamente significativo, indicando uma relação curva, onde o impacto da temperatura na resposta foi não linear. Isto sugere que existe uma temperatura ótima intermediária para controlar os valores de log UFC.

A interação entre o Fator 1 (tempo de fermentação) e o Fator 4 (quantidade de levedura) é altamente significativa, mostrando uma forte dependência da atividade da levedura relativamente ao tempo de fermentação.

Os resultados mostraram que, para ter valores mais elevados de UFC, deve-se aumentar moderadamente a temperatura (Fator 2), já que esta influenciou significativamente a resposta, isto é, o tempo de fermentação (Fator 1) deve ser otimizado em função da quantidade de levedura, dada a interação entre estes dois fatores. Em resumo, para controlar os valores de UFC, a temperatura e a quantidade de levedura são os fatores mais cruciais, sendo a temperatura o fator dominante. Ajustar estes fatores dentro dos seus respetivos intervalos permitirá afinar a atividade microbiana no processo fermentativo.

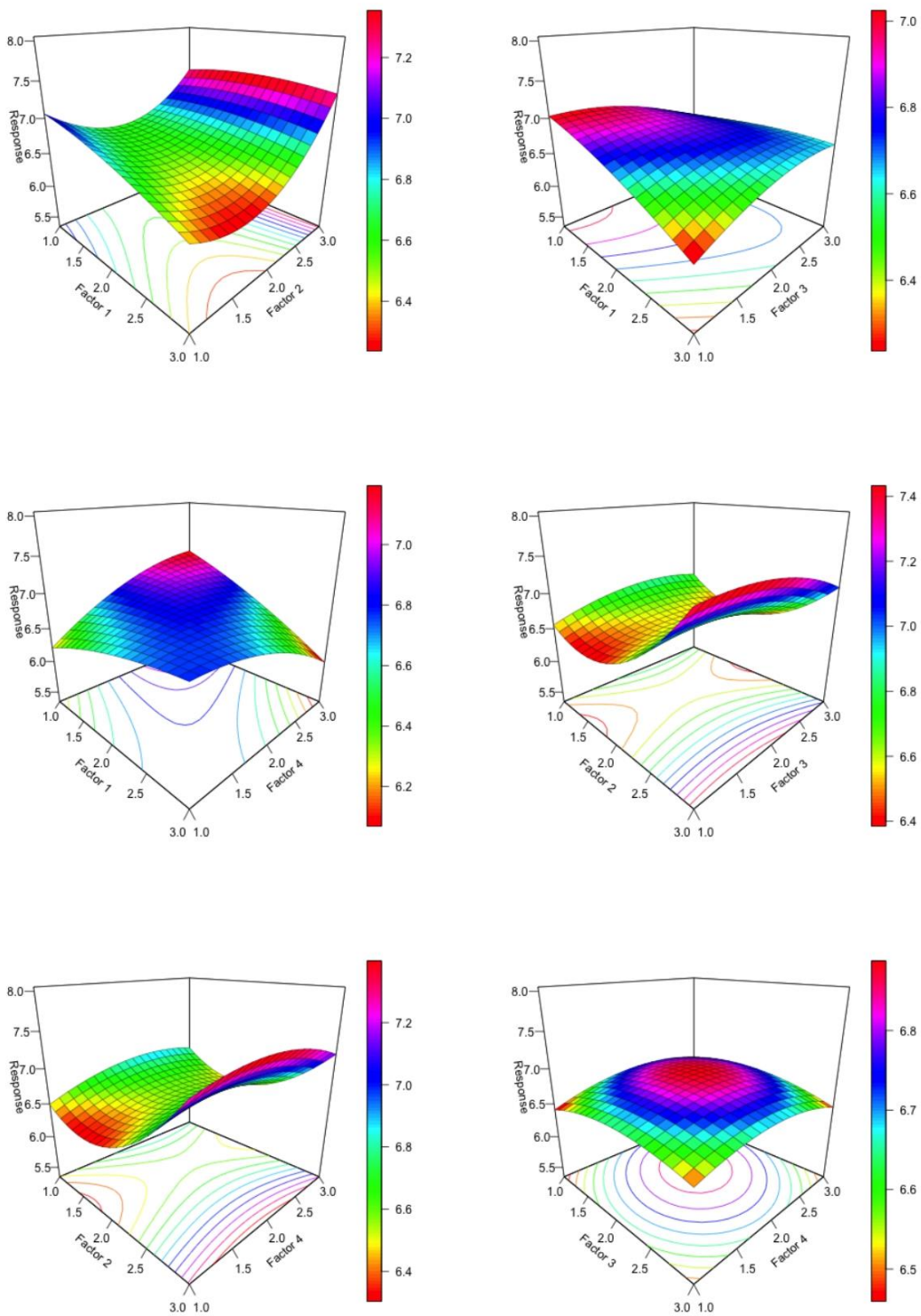


Figura 17: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para o crescimento de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fator 1 - Tempo (1h, 3h, 5h); Fator 2 - Temperatura (20°C, 30°C, 40°C); Fator 3 - Quantidade de Sal (0,6g, 1g, 1,4g); e Fator 4 - Quantidade de Levedura (1g, 3g, 4g).

Glicerol.

O modelo ajustou-se bem aos dados, com um valor de R^2 ajustado de 0,9415, indicando que o modelo explicou 94,15% da variabilidade no teor de glicerol. O F-estatístico foi altamente significativo (valor $p = 4,356e-12$), o que evidenciou que o modelo é adequado para os dados. Em relação ao modelo ajustado para o teor de glicerol (Figura 18), os resultados mostraram que todos os fatores tiveram um impacto significativo no conteúdo de glicerol. Isto sugere que mudanças em qualquer uns deles podem influenciar de forma relevante os níveis de glicerol. Entre os fatores, a quantidade de levedura (Fator 4) teve maior influência, indicando que desempenha um papel importante na produção de glicerol.

Os termos quadráticos significativos para os Fatores 1 (tempo de fermentação), 3 (quantidade de sal) e 4 (quantidade de levedura) sugerem relações não lineares. Isto significa que valores muito elevados ou muito baixos destes fatores podem diminuir a produção de glicerol, sendo que valores moderados podem ser mais adequados. A ausência de um efeito quadrático significativo para o Fator 2 (temperatura de fermentação) implica que o seu efeito sobre o teor de glicerol foi mais linear, ou seja, pode ser aumentado ou diminuído de forma gradual, sem mudanças dramáticas ou não lineares.

Observam-se interações significativas entre o tempo de fermentação (Fator 1) quer com a temperatura (Fator 2) quer com a quantidade de sal (Fator 3), sugerindo que esses fatores não podem ser otimizados de forma isolada. Por exemplo, aumentar o tempo de fermentação em combinação com níveis elevados de sal ou temperatura pode ter um efeito cumulativo na produção de glicerol. A interação entre o sal (Fator 3) e a quantidade de levedura (Fator 4) também foi significativa, revelando que a influência combinada destes fatores é crucial para o controlo dos níveis de glicerol.

Com o aumento do pH do meio de fermentação observa-se maior formação de ácido acético (Kunkee & Amerine, 1970) e, por isso, ocorre maior formação de glicerol como previsto pela equação de Genevois (1950). Também, Nordstrom (1962) verificou menor formação de glicerol com a diminuição da produção de ácido acético. Diversos fatores afetaram a produção de glicerol durante a fermentação. A temperatura desempenhou um papel significativo, formando mais glicerol sendo formado a 34°C do que a 25°C ou 12°C. O pH também foi um fator importante, com uma maior produção de glicerol observada em pH 4,5 em comparação com pH 3,0.

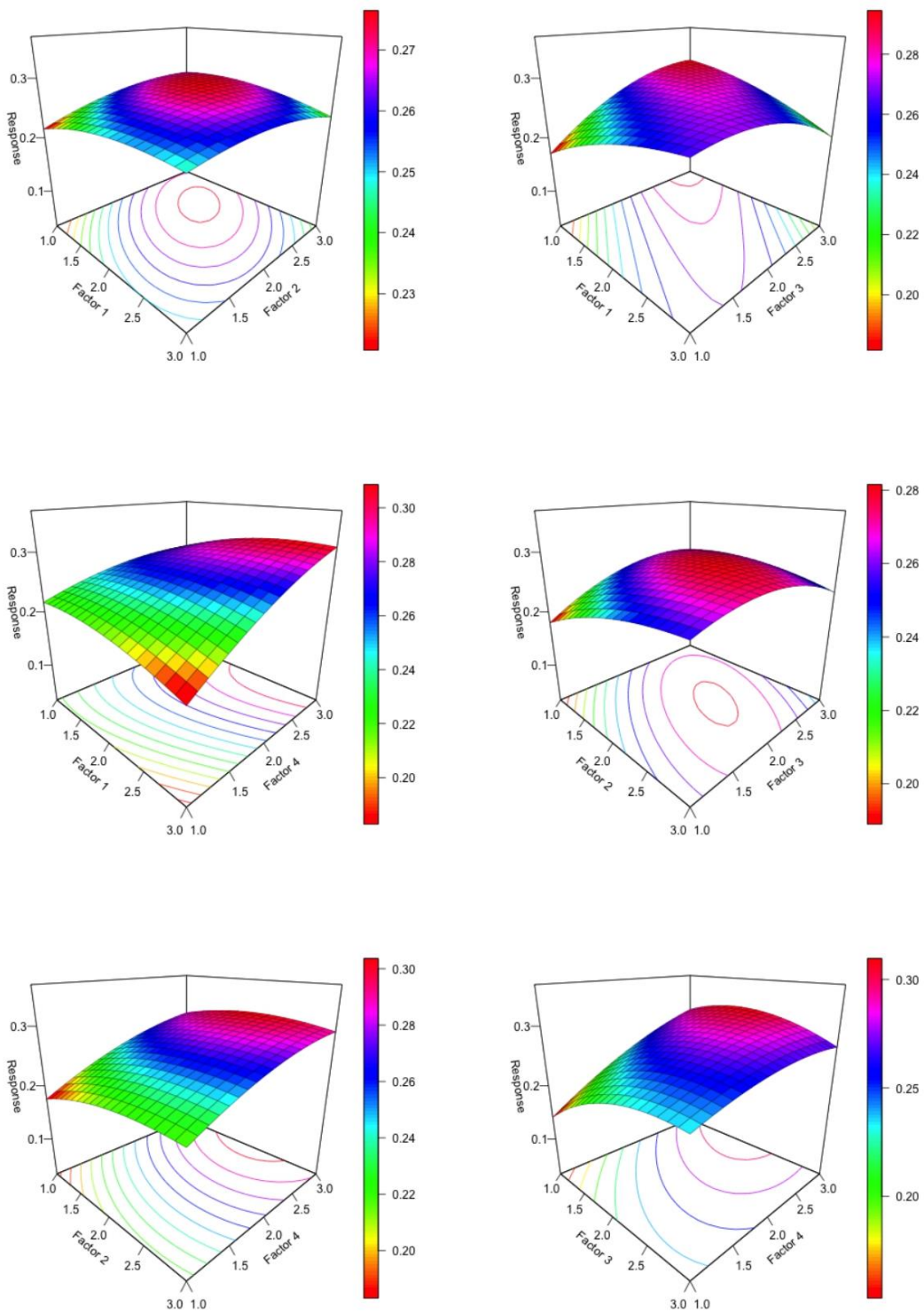


Figura 18: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a produção de glicerol, em g/L. Fator 1 - Tempo (1h, 3h, 5h); Fator 2 - Temperatura (20°C, 30°C, 40°C); Fator 3 - Quantidade de Sal (0,6g, 1g, 1,4g); e Fator 4 - Quantidade de Levedura (1g, 3g, 4g).

Ácido Acético.

O modelo ajustou-se de forma razoável aos dados, com um valor de R-quadrado ajustado de 0,6662, indicando que o modelo explica 66,62% da variabilidade no teor de ácido acético. O F-estatístico foi significativo (valor $p = 0,0001391$), indicando que o modelo é apropriado para os dados.

Relativamente aos efeitos principais, a temperatura de fermentação (Fator 2) e a quantidade de levedura (Fator 4) teve um impacto significativo no teor de ácido acético. Isto indica que manipular estes dois fatores pode aumentar ou diminuir de forma relevante a produção de ácido acético (Figura 19). O tempo de fermentação (Fator 1) não apresenta um efeito significativo por si só, o que significa que mudanças no tempo de fermentação não afetam fortemente os níveis de ácido acético. A quantidade de sal (Fator 3) também não tem um efeito principal significativo, embora possa interagir com outros fatores. O modelo mostrou evidências de um efeito não linear para o Fator 3 (quantidade de sal), sugerindo que níveis muito altos ou baixos de sal podem reduzir o teor de ácido acético, com níveis moderados potencialmente mais adequados. A não significância dos termos quadráticos para os outros fatores sugeriu que a sua influência foi mais linear, o que significa que aumentar ou diminuir esses fatores deverá resultar em mudanças proporcionais no teor de ácido acético.

As interações significativas entre o tempo de fermentação (Fator 1) e outros fatores, especialmente o sal (Fator 3) e a temperatura (Fator 2), indicam que esses fatores não devem ser considerados isoladamente. Por exemplo, uma combinação de certos níveis de sal e tempo de fermentação poderá aumentar ou reduzir o teor de ácido acético. A interação entre o sal (Fator 3) e as leveduras (Fator 4) também foi significativa, destacando a importância de gerir conjuntamente esses fatores para atingir os níveis desejados de ácido acético.

A presença de oxigénio desempenhou um papel crucial na formação deste composto. Conforme Liu (2003), a disponibilidade de oxigénio pode favorecer a produção de ácido acético em detrimento do etanol. Este fenómeno pode ocorrer durante o processo de sova da massa, quando a fermentação é temporariamente interrompida e a massa é exposta ao ar, proporcionando contato com o oxigénio. É importante notar que o ácido acético não é apenas um subproduto da fermentação, mas também desempenha um papel funcional importante. De acordo com Ribeiro (2021), o ácido acético é um dos produtos da fermentação lenta e contribui para a inibição do crescimento de bolores.

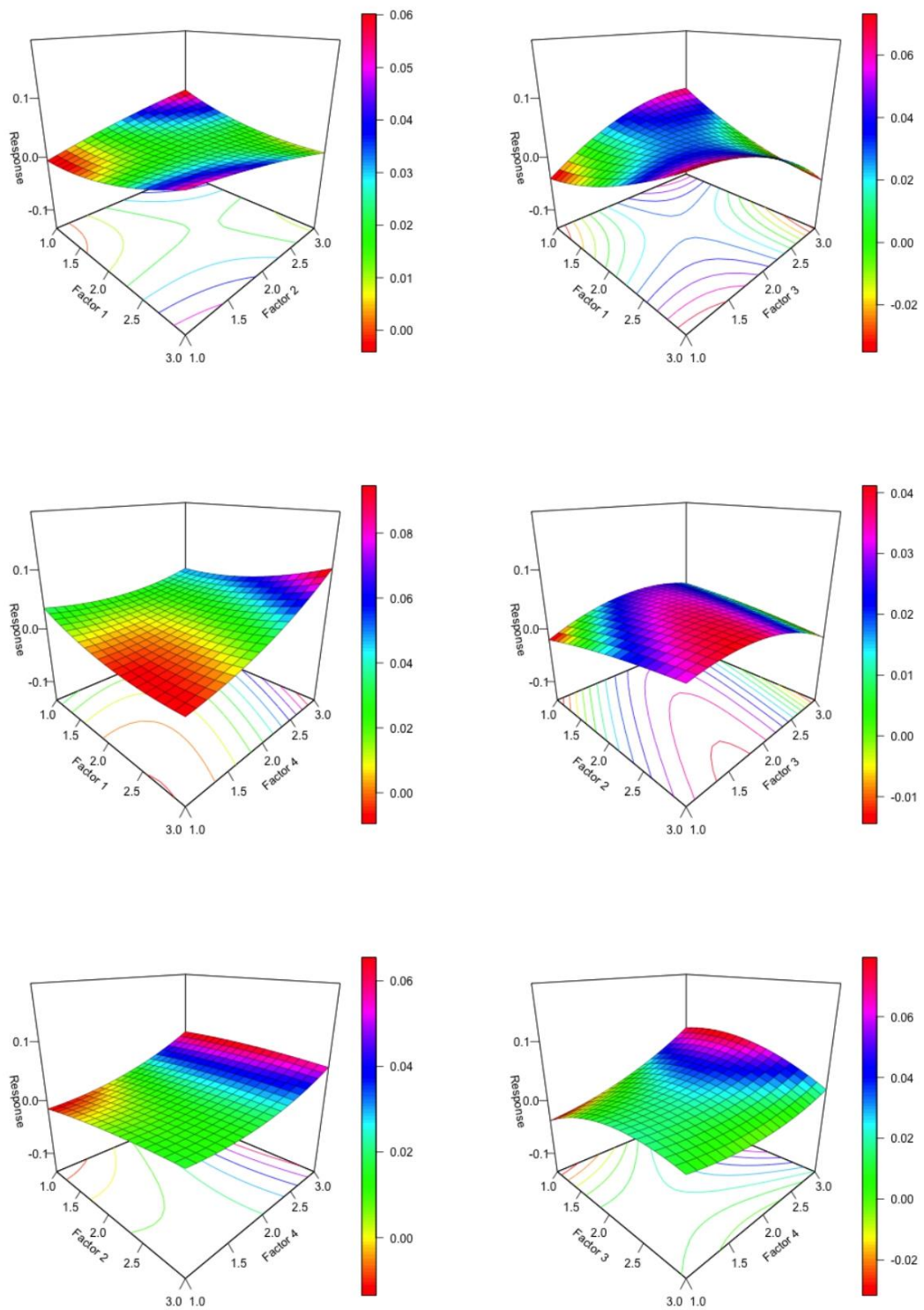


Figura 19: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a produção de ácido acético, em g/L. Fator 1 - Tempo (1h, 3h, 5h); Fator 2 - Temperatura (20°C, 30°C, 40°C); Fator 3 - Quantidade de Sal (0,6g, 1g, 1,4g); e Fator 4 - Quantidade de Levedura (1g, 3g, 4g).

Etanol.

O modelo RSM ajustou-se bem aos dados, com um valor de R-quadrado ajustado de 0,8963, indicando que o modelo explicou 89,63% da variabilidade na resposta. O F-estatístico foi altamente significativo (valor $p = 1,526e-09$), confirmando que o modelo é adequado para os dados. Com base nos resultados da análise do teor de etanol (Figura 20) no resumo do modelo RSM e nos resultados da ANOVA, o Fator 1 (tempo de fermentação) tiveram um efeito direto e significativo no conteúdo de etanol. Tempos de fermentação mais longos tendem a aumentar o teor de etanol, mas o termo quadrático indicou que existia um ponto ótimo de fermentação. Ir além deste ponto ótimo pode resultar na redução do teor de etanol.

O Fator 2 (temperatura de fermentação) também afeta significativamente a produção de etanol. Temperaturas mais altas normalmente conduzem a uma maior produção de etanol, mas o termo quadrático sugere uma relação não linear. Tal como o tempo, provavelmente por se esgotarem os açúcares fermentescíveis, a temperatura teve uma faixa ótima em que o conteúdo de etanol foi máximo. O Fator 3 (quantidade de sal) e o Fator 4 (quantidade de leveduras) também influenciaram significativamente o conteúdo de etanol. A levedura, estando diretamente envolvida no processo de fermentação, desempenhou um papel crítico na produção de etanol, enquanto o sal pode afetar a dinâmica da fermentação, possivelmente devido aos seus efeitos osmóticos sobre a atividade da levedura.

Os termos quadráticos significativos para o Fator 1 (tempo de fermentação), o Fator 2 (temperatura de fermentação) e o Fator 3 (quantidade de sal) sugerem que a relação entre estes fatores e o teor de etanol foi não linear. Indicando, que existiam pontos ótimos além dos quais o aumento desses fatores levaria à redução do conteúdo de etanol.

Interações entre os fatores:

A interação entre o Fator 1 (tempo de fermentação) e o Fator 2 (temperatura de fermentação) foi significativa, indicando que o efeito combinado do tempo de fermentação e da temperatura pode ser crítico para a produção de etanol. Isso sugere que encontrar o equilíbrio certo entre esses dois fatores foi essencial para maximizar o teor de etanol. A interação entre Sal e Levedura: A interação entre o Fator 2 (temperatura de fermentação) e o Fator 4 (quantidade de levedura) também foi significativa, o que implica que os controlos da temperatura em conjunto com os níveis de levedura terão um impacto significativo no teor de etanol.

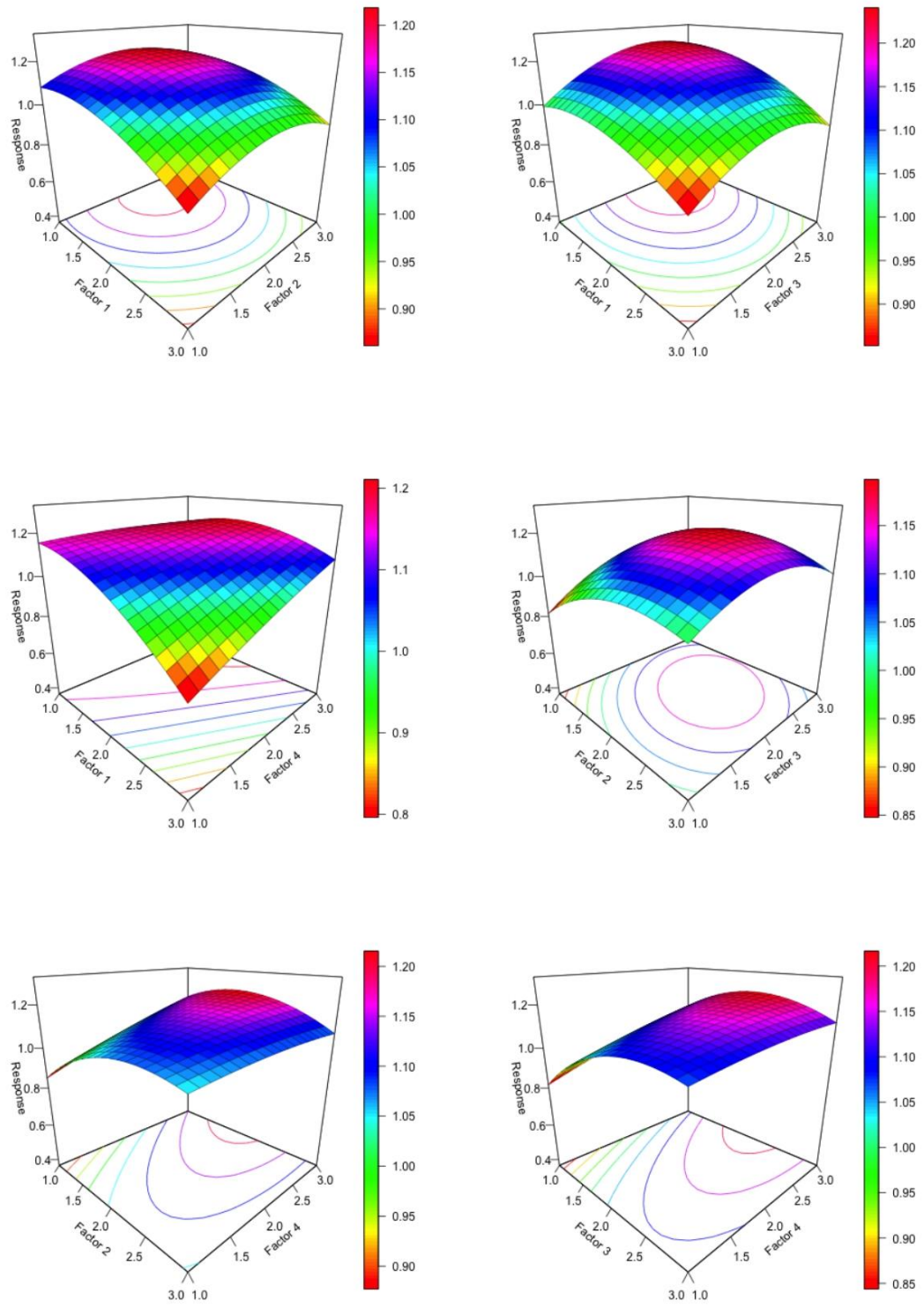


Figura 20: Gráficos 3D do modelo ajustado aos dados do desenho experimental para a produção de etanol, em g/L. Fator 1 - Tempo (1h, 3h, 5h); Fator 2 - Temperatura (20°C, 30°C, 40°C); Fator 3 - Quantidade de Sal (0,6g, 1g, 1,4g); e Fator 4 - Quantidade de Levedura (1g, 3g, 4g).

Assim, para controlar o teor de etanol na fermentação da massa do pão, os fatores mais importantes foram o tempo de fermentação e a temperatura, pois têm os efeitos diretos mais significativos. Além disso, a quantidade de fermento foi crucial para aumentar o teor de etanol, enquanto o sal desempenhou um papel secundário, influenciando a atividade do fermento. Gerir estes fatores de forma equilibrada foi fundamental para aumentar ou diminuir o teor de etanol.

O etanol produzido na fermentação evapora-se durante a cozedura, mas a sua presença durante a fermentação ajuda a criar um ambiente que favorece a produção de compostos que influenciam o sabor e a textura do pão. (Ribeiro, 2021).

Globalmente, com base nos resultados do desenho experimental, a seleção de níveis baixos para o tempo de fermentação (Fator 1), temperatura de fermentação (Fator 2), quantidade de sal (Fator 3) e quantidade de levedura (Fator 4) foi considerada ideal, com base nos resultados do desenho experimental. Um tempo de fermentação reduzido (Fator 1) minimizou o impacto não significativo no teor de proteína e nas cinzas. A prolongação do tempo de fermentação não melhorou estas características e pode dar origem a subprodutos de fermentação indesejáveis. Adicionalmente, uma temperatura de fermentação mais baixa (Fator 2) contribuiu para evitar os efeitos quadráticos negativos observados no teor de proteína, mantendo a estabilidade dos níveis de cinzas. Temperaturas elevadas podem afetar a atividade das leveduras e degradar componentes importantes, enquanto temperaturas moderadas a baixas asseguraram um processo mais controlado. A redução da quantidade de sal (Fator 3) foi igualmente crucial, uma vez que níveis elevados de sal diminuíram significativamente o teor de proteína e afetaram negativamente a composição mineral geral da massa, como evidenciado nos resultados referentes às cinzas. As manutenções de níveis baixos de sal evitaram a interferência na formação de glúten e na hidratação da proteína. De maneira similar, uma quantidade reduzida de levedura (Fator 4) assegurou que os efeitos positivos no teor de proteína e no crescimento da levedura fossem equilibrados, prevenindo a produção excessiva de etanol, glicerol e ácido acético.

Neste contexto, as condições selecionadas para a produção de pão, utilizando farinha Barbela, foram as seguintes: 1 hora de tempo de fermentação, 25°C de temperatura, 1g de sal e levedura.

A temperatura típica de fermentação de massa industrial está entre 25 e 35 °C (Wiggins, 1998), que está próxima da temperatura ótima para multiplicação de *S. cerevisiae* (aproximadamente 25 °C) (Attfield, 1997).

3.3. Análises à massa fermentada nas condições ótimas

Nesta secção apresentam-se os resultados das análises microbiológicas, físico-químicas, químicas e atividade antimicrobiana da massa fermentada de trigo Barbela preparada com base nas condições ótimas selecionadas através do desenho experimental.

3.3.1. Análises microbiológicas

De acordo com a análise microbiológica à MF do pão de Barbela, foi obtido um valor de $6,48 \pm 0,04$ log UFC/mL para a contagem total de leveduras. Este resultado foi particularmente relevante, pois reflete o crescimento microbiano benéfico, de *Saccharomyces*, essenciais no processo de fermentação do pão. Este desenvolvimento adequado das leveduras foi fundamental para garantir a formação da rede de glúten, a produção de dióxido de carbono, bem como a obtenção da textura e sabor característicos do pão. Além disso, a ausência de contaminação significativa por bolores indica que as práticas de fabrico foram favoráveis para uma produção segura e de qualidade.

3.3.2. Análises físico-químicas e químicas

Na análise dos parâmetros físico-químicos obtiveram-se os seguintes valores: teor de cinzas foi de 1,39%; proteína total 8,72%; pH de 6,9, o que sugere que a massa foi ligeiramente neutra, uma vez que está próxima de 7 na escala de pH.

Segundo Jekle e Becker, (2012) a massa fermentada de trigo pode ser sensível a alterações de pH, o que pode influenciar o produto final. Embora valores mais baixos de pH não afetem diretamente a atividade da levedura, uma vez que o pH ótimo da *Saccharomyces cerevisiae* está entre 4,0 e 4,5 (Buzás et al., 1989), estas variações podem comprometer a atividade enzimática, em particular as enzimas responsáveis pela digestão do amido. Assim, um pH mais baixo pode reduzir a disponibilidade de substratos e, por conseguinte, limitar a multiplicação de levedura e, conseqüentemente a formação de

dióxido de carbono (CO₂) durante a fermentação, influenciando negativamente as propriedades do produto.

A quantificação de fenóis totais na massa fermentada foi de $8,81 \pm 0,44$ de mg eq. AG/g de massa fermentada, e a atividade antioxidante, medida pelo ensaio de DPPH, $29,57 \pm 0,65$ mg eq. Trolox/g de massa fermentada.

3.3.3. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da massa fermentada foi avaliada determinando os parâmetros CIM e da CBM. O extrato foi preparado com DMSO a 5%, numa concentração inicial de 5 g/mL. Os resultados CIM demonstraram que, para *Staphylococcus aureus*, a inibição ocorreu na concentração de 1,25 g/mL, e para *Bacillus cereus* na concentração de 2,5 g/mL. No entanto, para *Escherichia coli* (Gram-negativa), não foi observada qualquer inibição, indicando a ausência de atividade antimicrobiana do extrato contra esta bactéria. Na avaliação da CBM, verificou-se uma contagem de colónias superior a 10, indicando a ação bacteriostática do extrato.

3.4. Análises ao pão preparado nas condições ótimas

3.4.1. Análises microbiológicas

A legislação portuguesa é omissa relativamente à grande maioria dos alimentos prontos a comer foram publicadas, pelo que os nossos resultados foram avaliados com base nas linhas de orientação para a apreciação da qualidade microbiológica dos produtos, em 2005, pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) (Santos et al., 2005). Nesta apreciação são usados quatro níveis de qualidade/segurança: satisfatório (indica boa qualidade microbiológica), aceitável (o produto alimentar encontra-se dentro dos limites estabelecidos), não satisfatório (indica que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos) ou inaceitável/potencialmente perigoso (os resultados indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde).

A qualidade/segurança dos alimentos pode ser determinada com base na contagem de microrganismos mesófilos, microrganismos indicadores, e a presença ou o número de microrganismos patogénicos: *Bacillus cereus*, bolores e leveduras, *E.coli* e Coliformes

totais. Esta avaliação envolveu a avaliação do tempo de vida de prateleira do pão Barbela, durante 6 dias (T0, T2, T4 e T6).

Os resultados obtidos no estudo do tempo de vida de prateleira (Tabela 12) do pão revelam que, nos primeiros dois dias (T0 T2), não se observou presença de microrganismos, o que era esperado, visto que o pão foi submetido a altas temperaturas durante a cozedura. No entanto, no quarto dia (T4), observou-se a presença de microrganismos mesófilos totais, indicando o início de um processo de deterioração. No último tempo (T6) de análise, constatou-se um ligeiro aumento na contagem de mesófilos totais, bem como o aparecimento de *Bacillus cereus* e o crescimento de bolores e leveduras, indicando que a qualidade microbiológica do pão era não satisfatória de acordo com os valores guia do INSA. Para *Escherichia coli* e coliformes totais, os resultados demonstraram a ausência contínua de contaminação, indicando ausência de contaminação fecal do produto em estudo.

Tabela 12: Resultados do estudo do tempo de vida de prateleira do pão durante 6 dias (T0, T2, T4, T6).

Tempo (dias)	Mesófilos totais (log UFC/mL)	Bacillus cereus (log UFC/mL)	Bolores e Leveduras (log UFC/mL)	E.coli (log UFC/mL)	Coliformes totais (log UFC/mL)
0	1	Ausente	1	0	0
2	1	Ausente	1	0	0
4	4,85±0,15	Ausente	1	0	0
6	5,44±0,04	2,35±0,35	2,35±0,67	0	0

Resultados expressos em média das análises ± desvio padrão

3.4.2. Análises físico-químicas e químicas

Os resultados obtidos neste estudo (Tabela 13) indicam que o pão de trigo Barbela apresentou um teor de humidade de 36,64%. Esta absorção de água pode estar associada à presença de fibras (Bortolotti, 2009).

O teor de cinzas, indicativo da presença de minerais, foi de 1,69%. Bortolotti et al. (2009) reportaram um teor de cinzas de 2,48% no pão de forma tradicional, enquanto Anton (2006) encontrou valores de 2,15% e 2,09% em pães de trigo integral caseiro e em pão produzido de forma tradicional, respetivamente. No que diz respeito ao teor de proteína, o valor encontrado no presente estudo foi de 9,80%, situando-se dentro das

recomendações da Direção-Geral da Saúde para pães integrais, que sugerem 7,6%. Castro (2013) também relatou teores de proteína entre 9,4% e 10,4%. O pH do pão foi de 5,98, indicando uma acidez moderada. Relativamente aos hidratos de carbono totais, foi registado um valor de 50,84 g/100g de pão, superior ao valor de referência para pães integrais, que segundo a Direção-Geral da Saúde é de 39,9 g/100 g. Esta diferença pode estar relacionada com o baixo teor de gordura encontrado neste produto (1,02%). Por fim, o valor energético do pão foi de 251,82 kcal/100 g, acima do valor tabelado pela Direção-Geral da Saúde, que é de 221 kcal/100 g. Este aumento energético pode ser atribuído ao maior teor de hidratos de carbono observado.

Os resultados referentes as análises químicas do pão de trigo Barbela demonstraram um teor de fenóis totais de $13,69 \pm 0,26$ mg eq. AG/g de pão. Este valor indica a presença significativa de compostos fenólicos, que são conhecidos pelos seus potenciais benefícios à saúde devido às suas propriedades antioxidantes.

Além disso, a capacidade antioxidante medida pelo ensaio de DPPH apresentou um valor de 59,09 mg eq. Trolox/g de inibição. A redução da capacidade antioxidante pode ser atribuída à perda de compostos fenólicos, visto que a alta temperatura utilizada durante o processo de cozedura é conhecida por degradar certos ácidos fenólicos. Esses compostos, que desempenham um papel essencial na atividade antioxidante, são sensíveis ao calor, resultando na sua destruição ou modificação durante o cozimento (Han et.al., 2011).

Tabela 13: Resultados das análises físico-químicas (humidade, cinzas, proteína total, pH, gordura, hidratos de carbono e valor energético) do pão.

Amostra	Humidade (%)	Cinzas (%)	Proteína Total (%)	pH	Gordura (%)	Hidratos de carbono (g/100g)	Valor energético (Kcal/100g)
Pão de trigo Barbela T150	36,64±0,61	1,69±0,17	9,80±0,16	5,98±0,01	1,02±0,09	50,84	251,82

Resultados expressos em média das análises ± desvio padrão

3.4.3. Atividade antimicrobiana

O extrato do pão foi preparado com DMSO a 5%, com uma concentração inicial de 5 g/mL. Os resultados foram idênticos aos observados para a massa fermentada (*Staphylococcus aureus* a concentração mínima inibitória foi 1,25 g/mL, *Bacillus cereus* foi inibido a 2,5 g/mL e o crescimento de *Escherichia coli* não foi afetado pelo extrato de pão). O extrato de pão exerceu apenas efeito bacteriostático. Estes resultados são muito promissores, pois indicam que a cozedura não afeta a atividade antimicrobiana do pão.

Capítulo 4

Conclusão



Atualmente, existem poucos estudos sobre as propriedades e o potencial uso da farinha de trigo Barbela na indústria da panificação. No âmbito desta investigação, foram avaliadas as propriedades e a qualidade tecnológica do pão com farinha de trigo Barbela.

A análise dos resultados obtidos para a farinha de trigo Barbela destacou-se pelas suas propriedades físico-químicas. Apresentou um teor significativo de proteína, essencial para o desenvolvimento do glúten, o que contribui para a boa qualidade reológica da massa. O teor de cinzas indicou uma quantidade relevante de minerais, típica de farinhas integrais com elevado valor nutricional.

A farinha revelou ainda uma concentração considerável de compostos fenólicos totais e uma elevada atividade antioxidante, demonstrando um perfil bioativo promissor. Este teor de fenóis, associado à capacidade antioxidante significativa, sugere que a farinha de Barbela é uma excelente escolha para o desenvolvimento de produtos funcionais, com benefícios para a saúde.

Em termos microbiológicos, a farinha não apresentou contaminação, sendo segura para utilização na panificação. Além disso, o teor de humidade encontra-se dentro dos limites regulamentares, favorecendo a sua estabilidade e conservação. Em relação à atividade antimicrobiana, a farinha de trigo Barbela apresentou uma capacidade de inibição de bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Essa atividade, ainda que bacteriostática, indica que o trigo em estudo pode ter efeito benéfico na inibição de microrganismos causadores de doenças de origem alimentar.

Na otimização das condições de fermentação da massa fermentada de trigo Barbela, verificou-se que o aumento da quantidade de sal e de levedura contribuiu significativamente para o desempenho do processo fermentativo conduzido por *Saccharomyces cerevisiae*. Para otimizar o processo fermentativo utilizou-se um desenho experimental composto por 18 ensaios e 4 fatores distintos (F1, F2, F3, F4), tendo-se obtido melhores resultados a uma temperatura de 25°C, com 1 g de sal e levedura, e um tempo de fermentação de 1 hora.

A análise química, à massa fermentada evidenciou um aumento significativo nos compostos fenólicos totais. Estes resultados sugerem que o processo de fermentação intensifica as propriedades bioativas da massa, tornando-a uma base altamente nutritiva e funcional para a produção de pão.

Os parâmetros físico-químicos da massa fermentada, como o teor de proteína e a formação de glúten, indicaram que a rede proteica foi bem desenvolvida, garantindo uma boa elasticidade e coesão da massa.

Os resultados das análises químicas ao pão revelaram um aumento dos compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante ao longo do processo fermentativo. A presença de fenóis totais foi preservada no produto final, com valores superiores de antioxidantes em comparação com a farinha inicial, sugerindo que o pão produzido com farinha de trigo Barbela é um produto bioativo de interesse para a saúde.

Nas análises físico-químicas ao pão, observou-se um aumento no teor de cinzas, proteínas e fibras, salientando a composição nutricional da farinha integral utilizada. Adicionalmente, o pH do pão diminuiu ligeiramente, indicando um produto final equilibrado em termos de acidez, o que pode contribuir para a sua conservação.

Quanto ao estudo do tempo de vida de prateleira do pão foi possível observar uma degradação progressiva da qualidade do produto ao longo dos dias de armazenamento. As análises microbiológicas realizadas nos diferentes dias (T0, T2, T4 e T6) indicaram que, nos tempos T0 e T2, não se observou presença de microrganismos, o que era previsível devido às elevadas temperaturas utilizadas no processo de cozedura. No entanto, a partir do tempo T4, verificou-se um aumento na contagem de microrganismos mesófilos totais, sugerindo o início do processo de deterioração. No tempo T6, além do aumento constante da contagem de mesófilos totais, também foi detetada a presença de *Bacillus cereus* e o crescimento de bolores e leveduras, o que evidenciou uma degradação significativa do produto.

Adicionalmente a capacidade antioxidante na farinha e no pão poderá ter contribuído para retardar a deterioração, preservando o alimento por mais tempo.

Conclui-se, assim, que a farinha de trigo Barbela, devido ao seu potencial bioativo e características nutricionais, representa uma excelente opção para a produção de pão funcional, com boas propriedades biológicas e com maior tempo de vida útil.

Referências



- Anton, A. A., Francisco, A., Haas, P. (2006). Análise físico-química de pães da cidade de Florianópolis e a situação dos alimentos integrais no Brasil. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 17 (4), 381-386.
- AOAC - Official Method 03-2005, Detection and Confirmed Quantitation of Coliforms, 2005
- AOAC - Official Method 923.03, Ash of flour. Direct method, 1923.
- AOAC - Official Method 943.02, pH of flour. Potentiometric method, 1943.
- AOAC - Official Method 950.36, Protein in bread, 1950.
- Arendt, E., Ryan; K. L., Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24 (2), 165-174.
- Arendt, E., Zannini, E. (2013). Wheat and other Triticum grains Cereal Grains for the Food and Beverage Industries, Woodhead Publishing, 1-67.
- Aslankoochi, E., Rezaei, M. N., Vervoort, Y., Courtin, C. M., & Verstrepen, K. J. (2015). Glycerol production by fermenting yeast cells is essential for optimal bread dough fermentation. *PloS one*, 10(3), e0119364.
- Attfield, P. V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature biotechnology*, 15(13), 1351-1357.
- Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D., & Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 137-149.
- Bortolotti, C. M. (2009) Caracterização de farinhas de cevada e o efeito da sua incorporação sobre a qualidade do pão de forma. Tese de Mestrado. Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.
- Bot, B. (2008). Estudio del efecto de acciones químicas y biológicas sobre la masa panaria. Tese de Mestrado. Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral., Santa Fé - Argentina.

- Buzás, Z., Dallmann, K. and Szajáni, B. (1989). Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 34, 882-884.
- Castilho, A. (1954). Manual enciclopédico do Agricultor Português. Agricultura II Parte, Grupo I-Cereais. *Gazeta das Aldeias*, 2, 1393-1425.
- Castro, C. G. G. D. (2013). Utilização do bagaço do mosto da cerveja para desenvolvimento de pão de forma fermentado com diferentes bactérias lácticas. Tese de Mestrado. Universidade Positivo, Curitiba, Brasil.
- Cato, L., & Mullan, D. (2020). Wheat quality: Wheat breeding and quality testing in Australia. Em *Breadmaking*. Elsevier.
- Cauvain, S. P., & Young, L. S. (Eds.). (2007). *Technology of breadmaking* (2nd ed). Springer
- Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 169-182.
- Chen, G., Ehmke, L., Sharma, C., Miller, R., Faa, P., Smith, G., & Li, Y. (2019). Physicochemical properties and gluten structures of hard wheat flour doughs as affected by salt. *Food chemistry*, 275, 569-576.
- Codina, GG., & Voica, D. (2010). The influence of different forms of bakery yeast *Saccharomyces cerevisiae* type strain on the concentration of individual sugars and their utilization during fermentation. *Romanian Biotechnol Lett*, 15(4), 5417-22.
- Coulter, T. P. (2009). *Food: the chemistry of its components*. Royal Society of Chemistry.
- Direção Geral da Saúde (DGS), “Pão”, <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/alimento/pao/>,2021.
- Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2010). *Química de alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Artmed, 4, 366-374.

- Frakolaki, G., Giannou, V., Topakas, E., & Tzia, C. (2018). Chemical characterization and breadmaking potential of spelt versus wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 79, 50-56.
- Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food microbiology*, 37, 2-10.
- Genevois, L. (1950). Essais de bilans de la fermentation alcoolique due aux cellules de levures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4, 179-192.
- Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2014). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food microbiology*, 37, 30-40.
- Guedes-Pinto, H., & Bernard, M. (1983). Etude comparative de quelques cultivars de blé, seigle et triticales dans le Nord du Portugal. I. Productions de grain, de paille, de protéines. *Agronomie*, 3(7), 691-700.
- Han, H. M., & Koh, B. K. (2011). Antioxidant activity of hard wheat flour, dough and bread prepared using various processes with the addition of different phenolic acids. *Journal of the science of food and agriculture*, 91(4), 604-608.
- Hansen, A., & Schieberle, P. (2005). Generation of Aroma Compounds during Sourdough Fermentation: Applied and Fundamental Aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 85-94.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36(6), 2090-2097.
- Hoseney, R. C. (1994). *Principles of Cereal Science and Technology*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) – Tabela de composição do Alimentos. Lisboa: INSA, 2010 (consultado em fevereiro de 2024).

- ISO 15213 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.
- ISO 21415-1 (2006). Wheat and wheat flour - Gluten content - Part 1: Determination of wet gluten by a manual method. International Standardization Organization.
- ISO 21415-4-E (2006). Wheat and wheat flour - Gluten content- Part 4: Determination of dry gluten from wet gluten by a rapid drying method. International Standardization Organization.
- ISO 21527-2 (2008), Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95.
- ISO 5492 (2008), Sensory analysis — Methodology — General guidance.
- ISO 7932 (2004), Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 degrees.
- Jekle, M., & Becker, T. (2011). Dough microstructure: Novel analysis by quantification using confocal laser scanning microscopy. *Food Research International*, 44(4), 984-991.
- Katina, K., Salmenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P., & Autio, K. (2006). Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 39(5), 479-491.
- Khanom, A., Shammi, T., & Kabir, M. S. (2016). Determination of microbiological quality of packed and unpacked bread. *Stamford Journal of Microbiology*, 6(1), 24-29.
- Koletta, P., Irakli, M., Papageorgiou, M., & Skendi, A. (2014). Physicochemical and technological properties of highly enriched wheat breads with wholegrain non wheat flours. *Journal of Cereal science*, 60(3), 561-568.

- Kosík, T., Lacko-Bartosová, M., & Kobida, L. (2014). Free phenol content and antioxidant activity of winter wheat in sustainable farming systems. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3, 247.
- Kunkee, R. E. & Amerine, M. A. (1970). Yeasts in wine-making. In: Rose, A.H. & Harrisom, J.S., eds. *The Yeasts*. London, Academic Press, V3, 5-71.
- Lei N.º 75/2009. (2009). Estabelece normas com vista à redução do teor de sal no pão bem como informação na rotulagem de alimentos embalados destinados ao consumo humano. *Diário da República N.º155, 1ª Série*, 12 de agosto de 2009, 5225.
- Liu, S. Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International journal of food microbiology*, 83(2), 115-131.
- Li, W., Pickard, M. D., & Beta, T. (2007). Evaluation of antioxidant activity and electronic taste and aroma properties of antho-beers from purple wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8958-8966.
- Monteiro, A C. (1935). *Trigos Portugueses (Estudo da sua distribuição no País)*. Boletim no. 17 - Série A de Estação Agrária Central, da Divisão, Ensaio de Sementes e Melhoramento das Plantas. Lisboa: Direção Geral dos Serviços Agrícolas, Ministério da Agricultura.
- Monteiro, J. S., Farage, P., Zandonadi, R. P., Botelho, R. B. A., de Oliveira, L. de L., Raposo, A., Shakeel, F., Alshehri, S., Mahdi, W. A., & Araújo, W. M. C. (2021). A Systematic Review on Gluten-Free Bread Formulations Using Specific Volume as a Quality Indicator. *Foods*, 10(3), 614.
- Nascimento, A. C., Santiago, S., Santos, M., Mesquita-Bastos, J., & Calhau, M. A. (2019). Pão do norte de Portugal: Um estudo interventivo com vista a reduzir o teor de sal no pão, *Boletim Epidemiológico, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*, 24(5), 28-30.

- Nordstrom, K. (1962). Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. III. Participation of coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*, 68(5), 398-407.
- Norma Portuguesa (NP) 4405:2002, Regras gerais para contagem de microrganismos (2002). Contagem de colónias a 30°C.
- León, A. E., Rosell, C. M., Gómez Pallarés, M., Brites, C., Haros, M., Trigo, M. J., Islas, R. P., Sira, E. E. P., Márcia, A. G, Gilberto, I., Concha, C. O. C., Ritva, R., Gladys, C., Rafael, M. O., Lúcia, V. Q., Isabel, C. R., Cecília, M. P., Márcia, A. G., Gabriela, T. P., Pablo, D. R., Cristina, M., Bonastre, O., Patrícia, R., & Benedito Mengod, C. (2007). De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. ISEKI-Food.
- Portaria nº 254/2003 (2003). Características e regras de rotulagem, acondicionamento, transporte, armazenagem e comercialização das farinhas destinadas a fins industriais e a usos culinários, e das sêmolos destinadas ao fabrico de massas alimentícias e a usos culinários.
- Portaria nº52/2015 (2015). Características dos diferentes tipos de pão
- Preston, K. R. (1989). Effects of Neutral Salts of the Lyotropic Series on the Physical Dough Properties of a Canadian Red Spring Wheat Flour. *Cereal Chemistry*, 66(2), 144-148.
- Raigond, P., Ezekiel, R., & Raigond, B. (2015). Resistant starch in food: A review: Resistant starch in food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1968– 1978.
- Ribeiro, A.D. (2021). Levain: Da origem ao pão. *Padoca do Alex – Escola de Panificação e Padaria* (consultado em março de 2024).
- Rizzon, M. Z., da Cunha, G. F., & Villas-Boas, V. (2017). Fermentação do Pão e do Vinho: Uma Proposta de Ação Interdisciplinar. *Scientia cum Indústria*, 5(3), 129-136.

- Rosell, C. M. (2012). Nutritionally enhanced wheat flours and breads. In *Breadmaking: Improving Quality*. (2nd ed.). USA: Woodhead Publishing.
- Santos, M. I., Correia, C., Campos M. I. C. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, 64, 66-68.
- Teixeira, A. K. M., Silva, R. R., Lima, C. M. G., Pagnossa, J. P., Gonçalves, J. T. T., Barbosa, A. A., Oliveira, M. C. M., & Santana, R. F. (2020). Whole grain bread preserved with lemon juice: a comparative study/Pão integral conservado com suco de limão: um estudo comparativo. *Brazilian Journal of Development*, 5(12), 33381-33391.
- Trinh, L. (2013). Gas cells in bread dough. School of Chemical Engineering and Analytical Science, The University of Manchester (United Kingdom).
- Vasconcelos, J. D. C. (1933). Trigos portugueses ou de há muito cultivados no país: subsídios para o seu estudo botânico. Serviço de Publicidade e Biblioteca da Direcção Geral da Acção Social Agrária. Separata do Boletim de Agricultura. Ano I - Números 1 e 2; 1a Série. 150 Lisboa, Portugal.
- Vianna, F. S. V., Redoschi, G., Lage, M. F., Ikemoto, M. Y., & Coelho, S. T. (2020). *Manual prático de panificação SENAC*. Editora Senac São Paulo.
- Weekend bakery. (2018). Understanding flour types. Retrieved from <https://www.weekendbakery.com/posts/understanding-flour-types/> (Consultado em fevereiro de 2024).
- Wiggins, C. (1998). Proving, baking and cooling. In *Technology of breadmaking*. Springer, Boston, MA.
- Wrigley, C. (2016). Wheat: An Overview of the Grain That Provides 'Our Daily Bread' Reference Module in Food Science: Elsevier.

Zhang, S., Liu, S. L., Shen, L. S., Chen, S. C., He, L. H., & Liu, A. L. (2022). Current Research in Food Science. Application of near-infrared spectroscopy for the nondestructive analysis of wheat flour: A review, 1305-1312.