

# **Incorporação do extrato de folhas de tramazeira (*Sorbus aucuparia*) fermentadas no pão**

**Hellen Freire Rodrigues**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de  
Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e  
Segurança Alimentar*

Orientado por  
Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho  
Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

**Bragança  
2025**



*Árvore da tramazeira no Parque Natural de Montesinho*

Estudo no âmbito do projeto Tramonte



## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a coragem necessária para iniciar e seguir este caminho em cada etapa desta jornada.

À minha orientadora, Professora Doutora Leticia Estevinho, expresso minha profunda gratidão pelo apoio constante. Sua orientação sempre veio acompanhada de entusiasmo, sabedoria e coerência, sendo essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Luís Dias, expresso minha imensa gratidão pela sua dedicação em todas as etapas deste trabalho, através da sua visão crítica e generosidade em compartilhar conhecimentos.

À Doutora Vanessa Paula, agradeço pela colaboração nas técnicas laboratoriais e pela disponibilidade em auxiliar sempre que necessário, contribuindo de forma prática e valiosa para a execução deste trabalho.

Sou especialmente grata à Natália e à Laís, pela orientação, partilha de conhecimento e apoio ao longo do trabalho. Agradeço também à Diana, Alexandra, Maira, Cacau, Célio, João, Elena, Luana, Dona Fátima, Dona Isabel, aos colegas e amigos de laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar. A presença e colaboração de todos fizeram toda a diferença nesta caminhada.

Ao Instituto Politécnico de Bragança, aos Projetos Tramonte e Certra, e aos colegas dos laboratórios de apoio: Agroindústrias, CIMO e Brigantia EcoPark, deixo meu agradecimento pelo suporte para a realização dos ensaios necessários.

Com todo o meu coração, agradeço à minha mãe, Dulce, e ao meu pai, Aldenilson, por me incentivarem a realizar este projeto. Mesmo à distância, sempre me ofereceram suporte emocional e foram minha base, compreendendo os meus anseios e motivando-me a seguir em frente.

Aos meus amigos do Brasil, que, mesmo de longe, estiveram presentes e me incentivaram ao longo deste percurso. Aos amigos de Bragança, e a tantos outros que estiveram presentes ou passaram pela minha vida durante o período do mestrado, agradeço por me escutarem, me distraírem nos momentos certos e me darem suporte quando mais precisei.

Por fim, agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste projeto, mesmo que não estejam aqui mencionados nominalmente. Cada gesto de apoio foi essencial e será sempre lembrado com carinho.

# Índice

Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas .....	vii
Lista de abreviaturas .....	viii
Resumo .....	x
Abstract.....	xi
Capítulo 1 .....	2
1.1. ENQUADRAMENTO.....	3
1.2. ESTRUTURA DO TRABALHO.....	4
1.3. OBJETIVO GERAL .....	5
1.3.1. Objetivos específicos.....	5
Capítulo 2 .....	7
2.1. TRAMAZEIRA .....	8
2.1.1. Descrição botânica.....	8
2.1.2. Importância etnobotânica e etnofarmacológica.....	9
2.1.3. Compostos bioativos das folhas de <i>Sorbus aucuparia</i> .....	10
2.2. FERMENTAÇÃO .....	13
2.2.1. Benefícios da fermentação .....	15
2.3. PÃO.....	15
2.3.1. Processo de fabrico do pão .....	16
2.3.2. Composição química e nutricional .....	17
2.3.3. Qualidade microbiológica do pão.....	19
Capítulo 3 .....	20
3.1. FOLHA DA TRAMAZEIRA .....	21
3.1.1. Amostragem e tratamento das amostras.....	21
3.1.2. Análises microbiológicas.....	23
3.1.3. Análises físico-químicas.....	25
3.1.4. Otimização de extração de compostos fenólicos.....	28
3.1.4.1. Desenho experimental .....	28
3.1.4.2. Análise das propriedades bioativas do extrato otimizado .....	31
3.2. FERMENTAÇÃO DAS FOLHAS DE TRAMAZEIRA .....	33
3.2.1. Otimização da fermentação .....	33
3.2.2. Análises ao produto fermentado .....	35
3.2.2.1 Análises microbiológicas.....	35
3.2.2.2. Análises de gorduras.....	35
3.2.2.3. Análises das propriedades bioativas do produto fermentado .....	36
3.3. PÃO.....	36
3.3.1. Produção das amostras .....	36
3.3.2. Análises microbiológicas.....	37
3.3.3. Análises físico-químicas.....	38
3.3.4. Análises químicas ao extrato do pão .....	41
3.3.5. Análise colorimétrica.....	41
3.3.6. Análise de textura .....	42
3.3.7. Análise sensorial.....	42

Capítulo 4 .....	43
4.1. FOLHAS DE TRAMAZEIRA .....	44
4.1.1. Secagem das folhas.....	44
4.1.2. Análises microbiológicas.....	44
4.1.3. Gordura total e perfil de ácidos gordos .....	45
4.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS FOLHAS SECAS .....	47
4.2.1. Resultados da metodologia de resposta por superfície.....	47
4.2.2. Extrato das folhas secas nas condições ótimas.....	49
4.3. FERMENTAÇÃO DAS FOLHAS DE TRAMAZEIRA .....	51
4.3.1. Otimização das condições de fermentação.....	51
4.3.2. Análises ao produto fermentado nas condições ótimas.....	53
4.3.3. Extrato do produto fermentado.....	57
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO PÃO .....	59
4.4.1. Análises microbiológicas.....	59
4.4.2. Análises químicas .....	62
4.4.4. Análise de gordura e perfil de ácidos gordos: .....	64
4.4.5. Análise de cor .....	69
4.4.5.1. Crosta do pão .....	69
4.4.5.2. Miolo do pão.....	72
4.4.6. Análise da textura .....	73
4.4.6.1. Crosta do pão .....	74
4.4.6.2. Miolo do pão.....	76
4.4.7. Propriedades bioativas.....	77
4.4.8. Análise sensorial.....	79
5. Conclusão .....	83
Perspetivas futuras.....	85
Referências bibliográficas .....	86
Anexo I.....	97

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa da distribuição da <i>Sorbus aucuparia</i> em Portugal Continental .....	8
<b>Figura 2.</b> Árvores de tramazeira .....	9
<b>Figura 3.</b> Processo de fermentação alcoólica .....	14
<b>Figura 4.</b> Localização do Pólis de Bragança no mapa.....	21
<b>Figura 5.</b> Secagem das folhas em estufa.....	22
<b>Figura 6.</b> Seleção das folhas de tramazeira .....	22
<b>Figura 7.</b> Processo de trituração das folhas e ensacamento.....	22
<b>Figura 8.</b> Placas de Petri e tubos de ensaio com diferentes meios de cultura utilizadas para efetuar as análises microbiológicas .....	23
<b>Figura 9.</b> Placas SimPlate .....	25
<b>Figura 10.</b> Soluções filtradas dos ensaios realizados com o desenho experimental.....	29
<b>Figura 11.</b> Amostras de PC, P0,5% de EFTF e P2,0% de EFTF .....	37
<b>Figura 12.</b> Análise de <i>Salmonella</i> spp utilizando kit 1-2TEST .....	38
<b>Figura 13.</b> Perda de peso das folhas em função do tempo durante a secagem de folhas da tramazeira .....	44
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico padrão (FAME Supelco) de ácidos gordos por cromatografia gasosa.....	46
<b>Figura 15.</b> Representação 3D dos resultados dos compostos fenólicos totais (TPC), compostos flavonoides totais (TFC) e atividade antioxidante (DPPH) para o desenho experimental RSM .....	48
<b>Figura 16.</b> Análise de TLC de gel de sílica dos extratos obtidos em cada ensaio do desenho experimental (14 extratos hidroetanólicos). Na análise usou-se o eluente Tolueno – Acetato de etila – Ácido fórmico (60:30:5), visualizado a 365 nm.....	49
<b>Figura 17.</b> Microplaca do ensaio de atividade antimicrobiana do EFT contra <i>E. coli</i> (linha superior) e <i>B. cereus</i> (linha inferior). CN - Controle Negativo; CP – Controle Positivo.....	50
<b>Figura 18.</b> Gráfico de crescimento de <i>Escherichia Coli</i> e <i>Bacillus cereus</i> para avaliar a atividade antimicrobiana. T0 – tempo 0h; T24 – tempo 24h .....	51
<b>Figura 19.</b> Fermentação conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando diferentes concentrações de inóculo e nutrientes, para os tempos 0, 24, 48 e 72 horas .....	52
<b>Figura 20.</b> Comparação do perfil de ácidos gordos entre FTS e PF por cromatografia gasosa. FTS – Folhas de tramazeira secas; PF – Produto fermentado .....	56
<b>Figura 21.</b> Ensaio utilizando a linha celular Caco-2, extratos de folhas de tramazeira e extrato de folhas de tramazeira fermentadas .....	59
<b>Figura 22.</b> Perfil de ácidos gordos ao longo do tempo: comparação entre PC, P0,5% e P2,0% em T0 e T96.....	66
<b>Figura 23.</b> Avaliação sensorial da amostra controlo (nº 789) - parâmetros de aparência, aroma, textura e sabor .....	80
<b>Figura 24.</b> Avaliação sensorial da amostra com 0,5% de extrato fermentado incorporado (nº 456) - parâmetros de aparência, aroma, textura e sabor.....	81
<b>Figura 25.</b> Avaliação sensorial da amostra com 2,0% de extrato fermentado incorporado (nº 123) - parâmetros de aparência, aroma, textura e sabor.....	81
<b>Figura 26.</b> Resultado da avaliação sensorial das amostras de pão .....	82

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Teor de ácidos carboxílicos nas folhas de tramazeira, mg/kg .....	11
<b>Tabela 2.</b> Compostos bioativos identificados nos extratos de folhas de tramazeira.....	12
<b>Tabela 3.</b> Composição nutricional dos pães de trigo e pão integral .....	18
<b>Tabela 4.</b> Desenho experimental para determinar condições ótimas para extração hidroetanólica .....	28
<b>Tabela 5.</b> Desenho experimental da fermentação das folhas .....	34
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos nas microbiológicas das amostras de folhas secas (FTS)44	
<b>Tabela 7.</b> Teor de fenóis totais, flavonóides, atividade antioxidante DPPH, poder redutor FRAP e Mfec, no extrato de FTS .....	49
<b>Tabela 8.</b> Taxa específica de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
<b>Tabela 9.</b> Análise microbiológica das amostras de FTS e PF em diferentes tempos ....	54
<b>Tabela 10.</b> Índices de aterogenicidade e trombogenicidade, razão PUFA/SFA e razão n-6/n-3 do produto fermentado.....	57
<b>Tabela 11.</b> Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante DPPH, FRAP e poder redutor (g/de folhas secas) .....	58
<b>Tabela 12.</b> Análise microbiológica do pão: controlo, pão com 0,5% de extrato de folhas fermentadas de tramazeira e pão com 2,0% de extrato de folhas fermentadas de tramazeira .....	61
<b>Tabela 13.</b> Resultados da caracterização nutricional dos pães .....	63
<b>Tabela 14.</b> Composição de ácidos gordos em folhas de tramazeira e produtos fermentado (FTS e PF) e pães com diferentes percentuais de extrato fermentado em T0 e T96 .....	67
<b>Tabela 15.</b> Índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT), Razão PUFA/SFA e Razão n-6/n-3 em amostras de extrato e pães com diferentes concentrações e tempos de armazenamento .....	68
<b>Tabela 16.</b> Análise da cor das amostras de pão (crosta e miolo) nos tempos T0 e T96	70
<b>Tabela 17.</b> Propriedades texturais da crosta e miolo dos pães controlo e enriquecidos com extrato fermentado de folhas em diferentes concentrações e tempo de armazenamento .....	75
<b>Tabela 18.</b> Análises dos compostos bioativos e propriedades antioxidantes dos pães..	78

## Lista de abreviaturas

AG - Ácido gálico

AOAC - Association of Official Analytical Chemists (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)

APN - Associação Portuguesa de Nutrição

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATP - Adenosina trifosfato

aW - Atividade de água

BHI - Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)

BP - Baird-Parker Agar (Meio de Baird-Parker)

CFT - Compostos fenólicos totais

CIM - Concentração mínima inibitória

CyE - Cianidina Equivalente

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança alimentar

EFTF - Extrato de folhas de tramazeira fermentado

ESA - Escola Superior Agrária

ESF - Extrato seco das folhas

FADH - Flavin adenine dinucleotide (Flavina adenina dinucleótido reduzida)

FAF (Panel) - The Panel on Food Additives and Flavourings (Painel de Peritos em Aditivos e Aromas Alimentares)

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

FDA - Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FRAP - Poder Antioxidante de Redução do Ferro

FTS - Folhas de tramazeira secas

GAE - Expresso em ácido gálico

GC - Gas Chromatography (Cromatografia gasosa)

GRAS - Generally Recognized As Safe (Geralmente Reconhecido como Seguro)

IA - Índice de aterogenicidade

INCF - Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

ISO - International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)

IT - Índice de trombogenicidade  
LAB - Bactérias ácido lácticas  
LPO - Lipid Peroxidation (Peroxidação lipídica)  
LPS - Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo)  
Mfec - Método de ferrocianeto modificado  
MH - Muller-Hilton  
MP - Matéria prima  
MUFA - Monounsaturated Fatty Acids (Ácidos gordos monoinsaturados)  
MYP - Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (Meio de Cultura para *Bacillus cereus*)  
NAD - Nicotinamide adenine dinucleotide (Nicotinamida adenina dinucleótido)  
NADH - Nicotinamide adenine dinucleotide (Nicotinamida adenina dinucleótido reduzido)  
NP - Norma Portuguesa  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PAC - Proantocianidina  
PC - Pão controlo  
PCA - Plate Count Agar  
PEFT - Pão com extrato de folhas de tramazeira  
PF - Produto fermentado  
PUFA - Polyunsaturated Fatty Acids (Ácidos gordos polinsaturados)  
QT - Quantidade total  
RSM - Response Surface Methodology (Metodologia de Superfície de Resposta)  
SFA - Saturated Fatty Acids (Ácidos gordos saturados)  
TEAA - Atividade antioxidante equivalente ao trolox  
TLC - Thin Layer Chromatography (Cromatografia em camada fina)  
TPA - Textural Profile Analysis (Análise do Perfil Textural)  
UFC - Unidade formadora de colónia

## Resumo

Estete estudo avaliou a incorporação de um extrato fermentado de folhas de tramazeira (*Sorbus aucuparia*) como ingrediente funcional no pão, visando reforçar valor nutricional, actividade antioxidante e estabilidade microbiológica. As folhas secas de tramazeira revelaram contagens microbianas reduzidas ( $\sim 3 \log \text{UFC mL}^{-1}$ ) e teor lipídico de 0,37 %, dominado por ácido palmítico; os índices de aterogenicidade (1,86) e trombogenicidade (0,70) indicaram perfil gordo moderadamente saudável.

A extracção de fitoquímicos foi otimizada por metodologia de superfície de resposta, variando etanol (24–95 %) e pH (0,9–5,1). A condição óptima (60 % etanol, pH 3,0) forneceu 244 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  de fenóis totais, 67 mg EQ  $\text{g}^{-1}$  de flavonoides e capacidade antioxidante de 84  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ . Ensaio FRAP e Mfec corroboraram o elevado poder redutor, e o extracto inibiu *Bacillus cereus*, evidenciando potencial conservante.

A fermentação alcoólica do extracto com *Saccharomyces cerevisiae* foi delineada experimentalmente. O ensaio ideal (5 g folhas, 0,20 g glicose, 1,4 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $10^5 \text{ mL}$  inóculo) gerou taxa específica de crescimento de  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . O extrato fermentado apresentou 844 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  de fenóis, 199 mg EQ  $\text{g}^{-1}$  de flavonoides e actividade antioxidante de 351 mg eq. Trolox  $\text{g}^{-1}$  (DPPH) e 8,8 mg eq. ácido ascórbico  $\text{g}^{-1}$  (FRAP).

Produziram-se pães com farinha Barbela: controlo e formulações com 0,5 % e 2,0 % de extrato. Durante 96 h de armazenamento, não houve crescimento de bolores, leveduras nem patogénicos nas amostras enriquecidas, ao contrário do controlo. O valor energético manteve-se estável ( $\sim 245 \text{ kcal } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e o teor proteico aumentou, sobretudo com 2,0 %. Perfis de ácidos gordos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico) não agravaram índices de risco cardiovascular.

A adição do extrato reduziu a luminosidade ( $L^*$ ) e conferiu tom avermelhado, efeito atribuído a pigmentos fenólicos. A textura mostrou endurecimento; contudo, a formulação com 0,5 % preservou maciez próxima do pão fresco. Na prova sensorial, esta formulação obteve melhor aceitação, conciliando funcionalidade e agradabilidade.

Conclui-se que o extrato fermentado de folhas de tramazeira é um aditivo natural promissor, capaz de desenvolver pães mais saudáveis, de rótulo limpo e maior vida útil comparado ao pão controlo, alinhados com as atuais tendências de consumo e com a valorização de recursos silvestres.

**Palavras-chave:** tramazeira; trigo Barbela; pão; extrato hidroetanólico; fermentação; aditivos naturais.

## Abstract

This study evaluated the incorporation of a fermented extract of rowan leaves (*Sorbus aucuparia*) as a functional ingredient in bread, aiming to enhance nutritional value, antioxidant activity and microbiological stability. The dried leaves showed low microbial counts ( $\sim 3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) and a lipid content of 0.37 %, dominated by palmitic acid; the atherogenicity (1.86) and thrombogenicity (0.70) indices indicated a moderately healthy fat profile.

The extraction of phytochemicals was optimized by response surface methodology, varying ethanol (24-95 %) and pH (0.9-5.1). The optimum condition (60 % ethanol, pH 3.0) provided 244 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  of total phenols, 67 mg EQ  $\text{g}^{-1}$  of flavonoids and an antioxidant capacity of 84  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ . FRAP and Mfec tests corroborated the high reducing power, and the extract inhibited *Bacillus cereus*, showing preservative potential.

The alcoholic fermentation of the extract with *Saccharomyces cerevisiae* was experimentally designed. The ideal test (5 g leaves, 0.20 g glucose, 1.4 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $10^5$  mL inoculum) generated a specific growth rate of  $0.15 \text{ h}^{-1}$ . The fermented extract showed 844 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  of phenols, 199 mg EQ  $\text{g}^{-1}$  of flavonoids and antioxidant activity of 351 mg eq. Trolox  $\text{g}^{-1}$  (DPPH) and 8.8 mg eq. ascorbic acid  $\text{g}^{-1}$  (FRAP).

Breads were produced with Barbela flour: control and formulations with 0.5% and 2.0% extract. During 96 h of storage, there was no growth of molds, yeasts or pathogens in the enriched samples, unlike the control. The energy value remained stable ( $\sim 245 \text{ kcal } 100 \text{ g}^{-1}$ ) and the protein content increased, especially with 2.0 %. Fatty acid profiles (palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic) did not worsen cardiovascular risk indices.

The addition of the extract reduced luminosity ( $L^*$ ) and gave a reddish hue, an effect attributed to phenolic pigments. The texture showed hardening; however, the 0.5% formulation preserved softness close to that of fresh bread. In the sensory test, this formulation was better accepted, combining functionality and pleasantness.

It can be concluded that the fermented extract of rowan leaves is a promising natural additive, capable of developing healthier breads with a clean label and a longer shelf life, in line with current consumer trends and the valorization of wild resources.

**Keywords:** rowan; Barbela wheat; bread; hydroethanolic extract; fermentation; natural additives.

# **Capítulo 1**

## **Enquadramento**

### **Estrutura**

## 1.1. Enquadramento

A presente dissertação realizou-se no âmbito da tese do mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, no Instituto Politécnico de Bragança.

Num cenário global de crescente preocupação com a saúde e o bem-estar, a busca por alimentos mais saudáveis e nutritivos tornou-se uma prioridade para consumidores, produtores e indústria. É cada vez mais evidente que optar por alimentos que promovam a saúde e a sustentabilidade é essencial não apenas para o bem-estar individual, mas também para a proteção do planeta.

A sustentabilidade na produção e no comércio de alimentos é um dos maiores desafios atuais e exige uma abordagem abrangente e integrada. Nesse contexto, as plantas destacam-se como fontes valiosas de compostos bioativos, enquanto os subprodutos agrícolas emergem como recursos relevantes para a obtenção de substâncias naturais que contribuam para a preservação da qualidade e segurança dos alimentos.

Uma das grandes dificuldades na produção de alimentos é a manutenção do tempo de vida de prateleira do produto sem comprometer a saúde do consumidor. As alterações causadas por microrganismos deteriorantes e patogênicos, para além de reduzirem a qualidade do produto, também apresentam riscos para a segurança alimentar. Tradicionalmente, para contornar estes problemas eram utilizados, principalmente, aditivos sintéticos, no entanto, estas substâncias estão associadas a potenciais prejuízos para a saúde, como alergias, toxicidade a longo prazo ou efeitos adversos quando ingeridas em excesso. Além disso, muitos consumidores têm demonstrado preocupação com o impacto dos aditivos químicos no meio ambiente. Neste contexto, há uma procura crescente por alternativas naturais que preservem as propriedades organolépticas dos alimentos, garantindo sabor, textura e aroma, sem comprometer a sua segurança.

A tramazeira (*Sorbus aucuparia*), que está presente principalmente no Parque Natural de Montesinho, atualmente é mais conhecida pelos frutos ricos em compostos bioativos, no entanto as folhas também têm uma composição em compostos biológicos promissora. Esses atributos tornam os frutos e as folhas um recurso promissor para a formulação de aditivos naturais, capazes de substituir total ou parcialmente os conservantes artificiais em alimentos, originando produtos mais atrativos saudáveis. Não são do nosso conhecimento estudos efetuados sobre a caracterização físico-química e capacidade biológica das folhas de tramazeira.

O trigo Barbela, uma variedade tradicional de trigo cultivado no norte de Portugal, é valorizado por sua adaptação às condições desfavoráveis e pela sua

composição nutricional e características organolépticas que o tornam ideal para a produção de pães diferenciados tradicionais, que conjugam tradição e inovação.

A utilização de ingredientes com propriedades funcionais, como as folhas de tramazeira (praticamente não estudadas) e do trigo Barbela, uma variedade tradicional, destaca a importância de valorizar recursos agrícolas locais, favorecendo a produção de alimentos mais equilibrados e ambientalmente responsáveis. Essa estratégia não apenas responde às exigências atuais por maior diversidade e qualidade dos alimentos, mas também resgata e mantém vivas as heranças culturais.

Também, o pão, alimento amplamente consumido em Portugal e importante na dieta mediterrânica, permite inovar conjugando o respeito pelas tradições locais com as práticas alimentares mais saudáveis e sustentáveis. A integração de ingredientes naturais e funcionais reforçam a importância do pão como um componente essencial da alimentação, combinando valores culturais, avanços tecnológicos e benefícios para a saúde.

O trabalho desenvolvido nesta tese insere-se nos projetos TRAMONTE (Financiado pela Fundação 'la Caixa', com apoio do BPI e em parceria com a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e CERTRA (financiado pela União Europeia, através do Next Generation EU, e pelo PRR (Plano de Recuperação e Resiliência da República).

## **1.2. Estrutura do trabalho**

O trabalho encontra-se organizado em cinco capítulos, o primeiro apresenta a “Estrutura, enquadramento e objetivos da tese”, onde se destaca a crescente busca por alimentos saudáveis e sustentáveis. Utilizou-se o pão produzido a partir do trigo barbela (*Triticum aestivum L.em. Thell*) para avaliar o efeito a incorporação de ingredientes funcionais como as folhas da tramazeira fermentadas na melhoria nutricional e na valorização de recursos locais, alinhando-se a práticas agrícolas mais responsáveis e à preservação da biodiversidade.

No segundo capítulo apresenta-se a introdução ao tema, com a fundamentação teórica, que reúne as informações obtidas através de pesquisa bibliográfica, necessária para a realização do estudo. Inclui a caracterização química e bioativa da tramazeira, a aplicação de extratos naturais em alimentos, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas de compostos fenólicos, e informações relevantes sobre tecnologia de panificação.

No terceiro capítulo são apresentados os “Materiais e métodos”, descrevendo as metodologias utilizadas para avaliar as propriedades bioativas das folhas secas e das folhas fermentadas de tramazeira, processo de formulação dos pães com diferentes concentrações de extrato, e técnicas que nos permitiram avaliar a qualidade microbiológica, as propriedades físico-químicas e a apreciação sensorial dos produtos desenvolvidos.

No quarto capítulo “Resultados e Discussões”, apresentam-se os resultados obtidos ao longo do trabalho, interpretando-os e discutindo-os com base noutros trabalhos similares encontrados na bibliografia.

No quinto e último capítulo, “Conclusão”, apresenta-se de forma sumária uma reflexão sobre os pontos cruciais do trabalho. São destacados os principais resultados alcançados, bem como as limitações e as contribuições do estudo para a investigação e a indústria. São também sugeridas perspectivas para trabalhos futuros que possam aprofundar ou expandir os nossos resultados.

### **1.3. Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo global avaliar a capacidade de utilizar as folhas de tramazeira fermentadas, como conservante e aditivo natural num produto alimentar (pão produzido com cereais tradicionais). Pretende-se valorizar os recursos biológicos locais e a promoção de práticas agrícolas sustentáveis com foco na criação de produtos inovadores.

#### **1.3.1. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

- Com base num desenho experimental, iremos avaliar o melhor solvente para extrair os compostos fenólicos do extrato de folhas de tramazeira;
- Otimizar o processo fermentativo das folhas de tramazeira conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando um desenho experimental;
- Determinar os fenóis e flavonóides totais das folhas “*in natura*” e no extrato fermentado;
- Estudar as propriedades bioativas (antioxidante e antimicrobiana) das folhas “*in natura*” e antioxidante do extrato fermentado;

- Produzir pão, utilizando um trigo tradicional (trigo barbela tipo 150);
- Avaliar o efeito do extrato fermentado das folhas no tempo de vida de prateleira do pão, realizando análises químicas, físico-químicas, microbiológicas e características sensoriais;
- Utilizar técnicas colorimétricas para analisar as propriedades físicas das várias formulações de pão variando a concentração de extrato de folhas de tramazeira fermentadas;
- Avaliar a textura das amostras de pão;
- Avaliar o efeito da incorporação das folhas de tramazeira fermentadas na bioatividade do pão;
- Verificar a aceitabilidade do produto através de análise sensorial por painel de consumidores.

## **Capítulo 2**

### **Referencial teórico**

## 2.1. Tramazeira

### 2.1.1. Descrição botânica

A *Sorbus aucuparia* é uma árvore do género *Sorbus*, pertencente à família Rosaceae, conhecida vulgarmente como tramazeira, sorveira ou freixo da montanha (Sołtys, 2020; McAllister, 2005). É uma das espécies mais importantes do género *Sorbus*, devido à sua resistência a condições adversas, tem uma vasta distribuição natural em áreas com altitudes baixas e elevadas, desde as costas atlânticas da Europa até à Península de Kamchatka (Yousefzadeh et al., 2021). Esta árvore encontra-se espalhada por toda a Europa, desde as regiões árticas, tais como, Islândia, Rússia, Fenoscândia, até ao sul da Europa: Espanha, Itália, Balcãs. Também pode ser encontrada na Ásia Menor (Cáucaso) e no norte da Europa, Norte da Ásia (Sibéria, Norte da China), bem como nos Estados Unidos e no Canadá como árvore ornamental (Räty et al., 2016; Raspe et al., 2000).

Em Portugal, esta árvore é considerada autóctone, cresce tipicamente nas orlas de florestas de caducifólias e pinhais e, ocasionalmente em matos densos. É comumente observada na Beira Alta, particularmente em áreas de relevo montanhoso no Noroeste, na Beira Baixa, na Serra da Estrela, no Minho e em Trás-os-Montes (Terra Fria, no Centro-Norte e em zonas do Centro-Oeste com relevos calcários) (ICNF, 2020, Portela-Pereira et al., 2023) (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa da distribuição da *Sorbus aucuparia* em Portugal Continental  
(Fonte: 1. Jardim botânico UTAD)

Esta árvore é composta por raízes robustas e fibrosas e apresenta numerosas flores brancas dispostas em inflorescências, que brotam na primavera. Quando cultivada em condições favoráveis, pode atingir uma altura média de 12 a 15 metros. No entanto, em regiões com recursos limitados para o crescimento, pode permanecer sempre como

arbusto (Portela-Pereira et al., 2023; Rätty et al., 2016).

O tronco possui casca lisa, de coloração cinzenta acastanhada e rugosa. Os frutos têm forma arredondada e são geralmente vermelhos ou laranja. A árvore possui copa circular e folhas caducas de aspeto pinado, medindo cerca de 10 a 25 cm de comprimento. Normalmente, as folhas são compostas por 9 a 19 pares de folíolos de forma alongada, sem pecíolo perceptível, medindo cada um deles aproximadamente 2 a 6 cm. Apresentam ápice pontiagudo, margens serrilhadas e cor verde-escura, tornando-se alaranjadas no outono (Rätty et al., 2016; Fay et al., 2022; Sarv., 2020).

A tramazeira é uma espécie importante para a biodiversidade, pois fornece alimento e abrigo para muitos animais, nomeadamente aves, mamíferos e insetos e contribui também para a restauração ecológica, favorecendo a revitalização de áreas degradadas (ICNF, 2020; Rätty et al., 2016).

Na Figura 2 podem-se observar as árvores da tramazeira com folhas e frutos maduros.



**Figura 2.** Árvores de tramazeira

### **2.1.2. Importância etnobotânica e etnofarmacológica**

As plantas têm sido utilizadas desde a antiguidade em todo o mundo pelas suas propriedades terapêuticas. Estas propriedades estão associadas aos seus compostos fitoquímicos, especialmente os metabolitos secundários, que são fontes extraordinárias de compostos bioativos de valor acrescentado (Chandran et al., 2020). Na medicina tradicional eram utilizadas no tratamento de várias doenças o que permitiu avaliar a sua aplicação em etnofarmacologia (Vinagre et al., 2019).

A importância etnofarmacológica e etnobotânica da tramazeira destaca a interação entre as comunidades locais e a planta, explorando as suas aplicações tradicionais para a saúde, alimentação, artesanato e promovendo a preservação e sustentabilidade.

De acordo com Neves et al. (2009) a folha de tramazeira, é utilizada popularmente pelos habitantes locais, nos concelhos de Trás-os-Montes, Norte de Portugal, para o tratamento de tosse, problemas digestivos, distúrbios gastrointestinais, e como diurético.

ICNF (2020), Sołtys, (2020), Kültür, (2007) e Shikov et al. (2014) reportaram que as flores, folhas e frutos comestíveis da *S. aucuparia* eram tradicionalmente utilizados pelas suas propriedades diuréticas, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antiaterogénicas, vasoprotectoras, vasorelaxantes e antidiarreicas. Kavak et al. (2019), utilizaram as folhas de tramazeira para o tratamento da prostatite, cancro e diarreia, indicando efeito citotóxico nestas patologias.

Um estudo efetuado sobre a utilização de plantas silvestres e cultivadas na área da montanha Konjuh (nordeste da Bósnia e Herzegovina) revelou que a tramazeira era utilizada com sucesso para o tratamento de doenças do estômago, obstipação, hemorragia uterina, doenças renais, carências em vitaminas C e E, e para a prevenção da gota e das hemorróidas O chá da casca da árvore era empregado na Estónia como remédio natural para tratar doenças cancerosas (Sak, 2014). Na Grécia, os frutos desta planta têm sido aplicados como agentes antidiabéticos (Šavikin et al., 2017).

Convém salientar, que os dados sobre os efeitos das folhas de *Sorbus aucuparia* para a saúde humana são escassos ou inexistentes, no entanto os estudos preliminares efetuados são promissores e sugerem que esta planta pode atuar como um coadjuvante natural no tratamento de diversas doenças.

### **2.1.3. Compostos bioativos das folhas de *Sorbus aucuparia***

Krivoruchko et al. (2013) demonstrou que as folhas de *S. aucuparia* apresentavam 30 ácidos carboxílicos, dos quais 19 eram ácidos gordos e 4 aromáticos. Os ácidos dominantes (mg/kg) foram o palmítico (3793,5), o cítrico (1929,5), o málico (1825,5) e o oxálico (1288,0) (Tabela 1).

Sarv et al. (2020), reportaram que as folhas e as inflorescências de *Sorbus spp.* contém, geralmente quantidades mais elevadas de fenóis totais (CFT) do que os frutos. Estes investigadores também identificaram o ácido ferúlico e o kaempferol nas folhas desta planta.

**Tabela 1.** Teor de ácidos carboxílicos nas folhas de tramazeira, mg/kg*(Fonte: Krivoruchko, E. V. et al., 2013)*

<b>Ácido</b>	<b>Quantidade em folhas</b>
Caproico	44,8
3-Hexenóico	28,3
2-Hexenóico	–
Caprílico	48,0
Oxálico	1288,0
Pelargónico	23,3
Malónico	176,9
Fumárico	25,2
Succínico	174,5
Cáprico	–
Benzoico	232,1
Metoxisuccínico	–
Fenilacético	13,2
Salicílico	18,7
Láurico	83,9
3-hidroxi-2-metilglutárico	–
Mirístico	365,0
Málico	1825,5
Pentadecanóico	39,8
Azelaico	372,0
Palmítico	3793,5
Palmitoleico	207,1
Margárico	423,9
Cítrico	1929,5
Esteárico	305,4
Oleico	303,1
Vacénico	25,9
Linoleico	248,2
Linolénico	825,5
Isocítrico	–
Vanílico	–
Araquico	136,4
11-icosénico	–
11,13-Eicosadienoico	–
Heneicosanóico	23,6
Beénico	58,2
Erúxico	–
Lignocerínico	63,3
Ferúlico	45,4

Os resultados obtidos por Olszewska & Michel (2009) e Olszewska et al. (2010), para os compostos bioativos e para a capacidade antioxidante presentes nos extratos de folhas de *Sorbus aucuparia*, utilizando como solvente de extração uma solução hidro-metanólica 70% (v/v), apresentam-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Compostos bioativos identificados nos extratos de folhas de tramazeira

(Fonte: Olszewska & Michel, 2009, Olszewska et al., 2010)

Parâmetros identificados	Dados 2009	Dados 2010
<b>Ácidos fenólicos</b>	QT: 9,09	QT: 8,23
<b>QT em GAE (%) ou conforme especificado</b>	Ácido neoclorogénico: 1,15 Ácido clorogénico: 2,75	Ácido neoclorogénico: 0,51 Ácido clorogénico: 1,90
	<b>Flavonóides:</b>	<b>Flavonóides:</b>
<b>PAC em CyE (%) ou conforme especificado</b>	Quercetina: 0,835 Kaempferol: 0,188 PAC: 3,84	Quercetina: 0,903 Kaempferol: 0,157 PAC: 3,59
<b>Atividade Antioxidante</b>		
<b>EC50 (µg/mL) ou conforme especificado</b>	DPPH: 24,10	DPPH: 27,47
<b>TEAA, mmol/g ou LPO%</b>	TEAA: 0,628	TEAA: 0,54 LPO: 58,69
<b>FRAP, mmol Fe<sup>2+</sup>/g ou conforme especificado</b>	2,148	-

QT – Quantidade total; GAE – Expresso em ácido gálico; PAC - Flavonoides/Proantocianidinas; DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; CyE - Cianidina Equivalente; EC50 - Concentração Efetiva 50%; TEAA - Atividade antioxidante equivalente ao trolox; LPO - Inibição da Peroxidação Lipídica; FRAP - Poder Antioxidante de Redução Férrica.

Sołtys et al. (2020) em seus estudos, reportaram nas folhas de tramazeira a presença de ácidos orgânicos simples, principalmente málico, cítrico e oxálico.

Olszewska (2011) demonstrou que os extratos de folhas de tramazeira mostraram uma relação positiva entre o potencial antioxidante e a quantidade de fenóis totais. Além disso, estudos realizados por Bobinaitė et al. (2020) e Liepiņa et al. (2013) reforçaram a relevância dessa planta, evidenciando que a sua atividade antimicrobiana estava correlacionada com os seus metabólitos secundários.

No nosso estudo iremos comparar a importância para a saúde das folhas da tramazeira “*in natura*” e fermentadas, uma vez que não existirem estudos sobre os efeitos

da utilização de um produto fermentado nas características do pão, nomeadamente na conservação e bioatividade. Adicionalmente, como reportado na literatura iremos ainda avaliar o efeito da fermentação na bioatividade dos compostos fenólicos presentes nos produtos naturais.

## 2.2. Fermentação

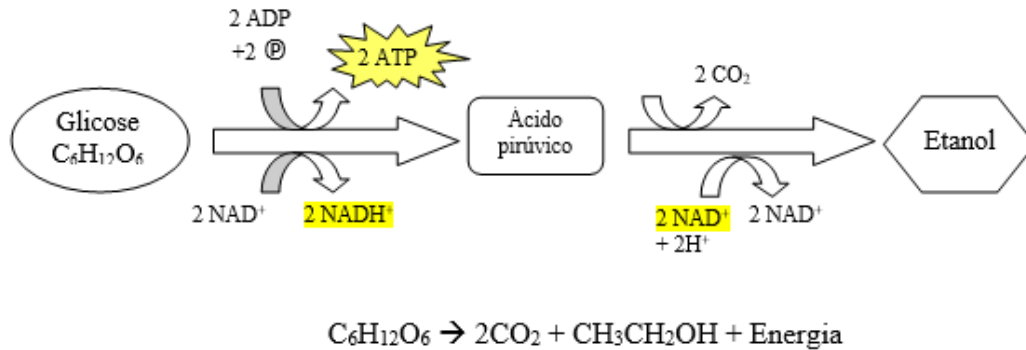
A fermentação é um processo biológico natural amplamente estudado e explorado ao longo dos anos, utilizado principalmente para a produção de bebidas e alimentos. Além disso, cumpre uma função essencial no tratamento de resíduo de águas e na produção de biocombustíveis. Trata-se de um procedimento simples, com baixo consumo de energia e custos operacionais reduzidos (Freitas, 2021; Maicas, 2020).

O processo fermentativo pode ocorrer de forma espontânea ou ser conduzido por microrganismos específicos, como leveduras (fermentação alcoólica), e bactérias ácido-láticas (LAB) na fermentação láctica. Nesse estudo, iremos dar particular relevância à fermentação alcoólica, um processo que, geralmente é conduzido por leveduras pertencentes ao género *Saccharomyces*, sendo *S. cerevisiae* a mais utilizada. Esta levedura tem grande importância para várias aplicações biotecnológicas devido às suas características únicas, destacando-se pela capacidade de fermentar uma ampla variedade de açúcares, incluindo glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, além disso, conseguem crescer em ambientes ácidos, com pH aproximadamente 3,5 (Seixas, 2022; Parapouli et al., 2020; Maicas, 2020).

O processo fermentativo inicia-se pela via glicolítica (Figura 3) em que a glucose é convertida em duas moléculas de piruvato. Durante esta reação, os eletrões da glucose são transferidos para a coenzima  $\text{NAD}^+$ , que atua no transporte de moléculas, resultando na formação de NADH (Freitas, 2021).

Nas etapas seguintes, os eletrões transportados pelo NADH participam em várias reações que culminam na produção de ATP. As leveduras, como microrganismos anaeróbios facultativos, podem produzir ATP quer na presença quer na ausência de oxigénio. Na ausência de oxigénio, os eletrões do NADH são utilizados para converter o piruvato em etanol e dióxido de carbono, completando o processo fermentativo. O metabolismo fermentativo das leveduras, além de assegurar a produção de energia em condições limitantes de oxigénio, é importante para a manutenção do equilíbrio das reações de oxidação-redução, enquanto direciona os fluxos metabólicos para a produção

de diversos produtos secundários, fundamentais em processos biotecnológicos e industriais (Duncan et al., 2023; Freitas, 2021; Maicas, 2020).



**Figura 3.** Processo de fermentação alcoólica  
(Fonte: Freitas, 2021)

No entanto, quando há disponibilidade de oxigênio, em condições aeróbias, as leveduras utilizam um metabolismo alternativo, a respiração celular. Nesse processo, o piruvato produzido durante a glicólise é convertido em acetil-CoA e entra no ciclo de Krebs, resultando na produção de NADH e FADH<sub>2</sub>. Estes transportadores alimentam a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, onde o oxigênio atua como aceitador final, permitindo a formação de ATP por fosforilação oxidativa. Este metabolismo aeróbio pode produzir até 38 ATP por molécula de glicose (Pires et al., 2015).

Além das diferenças metabólicas, a fermentação pode ocorrer de duas formas principais, dependendo do meio utilizado: em meio líquido ou em meio sólido. Na fermentação em meio líquido, há a presença de água livre, enquanto na fermentação em meio sólido a disponibilidade de água é reduzida, sendo o próprio substrato responsável por fornecer a umidade necessária para o crescimento e sobrevivência dos microrganismos (Erskine et al., 2023).

Assim, a escolha do meio de cultura e a dinâmica do processo fermentativo, influenciam diretamente as características dos produtos finais obtidos. Neste contexto, a fermentação é importante em diversas aplicações industriais e biotecnológicas, mas também contribui para melhorar as propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos, trazendo benefícios à saúde.

### **2.2.1. Benefícios da fermentação**

Durante a fermentação, a digestibilidade dos compostos bioativos dos alimentos aumenta traduzindo-se na melhoria das capacidades antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório (Mariod & Fatima, 2022). A libertação de compostos bioativos, a conversão enzimática conduzida por microrganismos e a atividade probiótica são os principais responsáveis por estas propriedades benéficas. Além disso, os produtos fermentados ajudam a equilibrar a microbiota intestinal, reduzindo a presença de bactérias prejudiciais, contribuindo assim para regular a flora intestinal. O seu consumo também pode aliviar problemas como prisão de ventre e dores estomacais.

A fermentação destaca-se ainda pelo facto de reduzir o poder alergénico de determinados alimentos, como mariscos, soja e leite. De acordo com o reportado por Pi et al. (2022), este efeito pode ser potencializado combinando a fermentação com tratamentos adicionais, como, por exemplo aquecimento e ultrassom.

Convém salientar, que os efeitos benéficos da fermentação alcoólica podem ser reforçados utilizando culturas iniciadoras, como as bactérias LAB. Estas bactérias produzem ácidos láctico e acético, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas, que contribuem favoravelmente para a saúde do consumidor e para a conservação dos produtos alimentares (Stoll et al., 2021; Pi et al., 2022).

Apesar de potenciais vantagens da fermentação, os estudos sobre a biodisponibilidade e a bioacessibilidade dos compostos resultantes deste processo são escassos, carecendo de estudos adicionais.

Neste trabalho efetuaram-se as fermentações das folhas da tramazeira para verificar se aumenta a disponibilidade de compostos fenólicos, permitindo obter um extrato com melhores propriedades bioativas. Uma segunda fermentação, ocorre com a produção de pão com e sem extrato das folhas fermentadas com o objetivo de verificar as suas potencialidades, através da avaliação do tempo de prateleira e propriedades bioativas.

### **2.3. Pão**

Com efeito, conhecido como "a essência da vida", o pão já é fabricado desde 10.000 a.C., durante o período neolítico e da expansão da agricultura, sendo as sementes o principal ingrediente. Alguns dos papiros Egípcios mais antigos faziam referência ao primeiro pão com uma forma semelhante ao atual, e incluíam também instruções sobre o processo de fabrico (Kourkouta et al., 2017).

Tal como referido anteriormente, o pão é considerado um alimento base na alimentação humana em todo o mundo, especialmente na Europa, África e Sudeste Asiático. É um alimento multifuncional e prático que pode ser incorporado numa dieta saudável e equilibrada (Bortoluzzi, 2020).

Na cultura portuguesa, o pão é mais do que um alimento, é um símbolo de tradição e identidade. Presente nas refeições diárias e em celebrações, desempenha um papel essencial na manutenção dos laços comunitários e sociais (Soares, 2014).

Segundo Martínez-Monzó et al., (2013), as principais tendências para o consumo de pão estão ligadas à saúde, ao prazer e à conveniência. Neste contexto, Baleia et al. (2021), reporta que se verificou um aumento no consumo de pão de forma, de cerca de 19,4%, pelas crianças e um aumento de 21,9% de pão tradicional pelas famílias, durante o período de pandemia da COVID-19. Segundo análise da Informa D&B, o setor de panificação e pastelaria industrial teve um crescimento de 12,8% em 2023, alcançando uma faturação e 1.060 milhões de euros (IAImentar, 2023).

### **2.3.1. Processo de fabrico do pão**

As novas tendências na panificação focam-se no desenvolvimento de produtos funcionais, isto porque os consumidores procuram alimentos saudáveis, com um período de vida alargada, considerando a qualidade microbiológica e a preservação da qualidade (Mitelut et al., 2021).

De acordo com as diretrizes da Portaria n.º 52/2015, “o pão é produzido através da amassadura, fermentação e cozedura, em condições apropriadas, de farinhas de trigo, centeio, triticale ou milho, separadas ou misturadas, conforme os tipos definidos pela legislação. Além disso, o pão é preparado com água potável e fermento (levedura), podendo também incluir sal e outros ingredientes, como aditivos e auxiliares tecnológicos (enzimas), respeitando as condições estabelecidas por lei”. É um processo que envolve ações mecânica e térmica, intervindo uma série de reações físico-químicas, microbiológicas e bioquímicas complexas (Della et al., 2014).

A farinha é o principal ingrediente e a sua qualidade depende do tipo de grão e do grau de moagem. Moagens mais finas tendem a reduzir o amido e aumentar componentes da casca como fibras insolúveis e minerais (Kourkouta et al., 2017). No sistema português, as farinhas são classificadas por números que indicam o grau de refinação. Quanto maior o número, menos refinada é a farinha e mais fibras contém. Assim, o pão integral

autêntico deve conter farinha de trigo tipo 150 ou de centeio tipo 170 (Portaria n.º 52/2015).

A fermentação é a fase mais crítica do fabrico, pois determina a qualidade final do pão. A levedura de padeiro *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada devido à sua capacidade de produzir gás uniformemente, adaptar-se a variações de pH, temperatura e concentrações de sal e açúcar, bem como formar compostos aromáticos (Heitmann et al., 2018). Esta levedura, considerada segura pela EFSA (Panel & Herman, 2023), apresenta 30–33% de matéria seca, 40,6–58% de proteínas, 35–45% de carboidratos, 5–7,5% de minerais, 4–6% de lípidos e vitaminas. Além da levedura convencional, podem ser utilizados *sourdoughs* (massas lêvedas naturais), compostos por leveduras e bactérias ácido-lácticas (LAB), que conferem características sensoriais específicas, como aroma e sabor (Carbonetto et al., 2018). Durante a fermentação (1–2 h), as leveduras consomem os hidratos de carbono da farinha, produzindo CO<sub>2</sub>, álcool e compostos aromáticos, influenciando diretamente o perfil sensorial do pão (Hernández-Parada et al., 2022; Maicas, 2020).

A cozedura ocorre entre 160 e 250 °C e é determinante para a textura e estrutura do pão. Técnicas inadequadas de cozedura podem comprometer todo o processo anterior (Cappelli, 2021). Após a cozedura, o pão arrefece e pode ser embalado à temperatura ambiente, em atmosfera modificada, refrigerado ou congelado, o que influencia diretamente o seu prazo de validade (dos Santos, 2020).

Neste contexto, é de salientar o uso de variedades tradicionais de trigo como o trigo Barbela (*Triticum aestivum* L. em. Thell), utilizado neste trabalho na sua forma integral. Esta variedade é cultivada sobretudo em Trás-os-Montes e apresenta boa adaptação a solos pobres e ácidos (Carvalho, 1933). O interesse crescente por cereais antigos está relacionado com a preservação da biodiversidade e com as propriedades sensoriais diferenciadas dos seus produtos (Cappelli et al., 2021).

### **2.3.2. Composição química e nutricional**

Este produto tem um elevado valor nutritivo. Os hidratos de carbono são o principal macronutriente no pão, desempenhando, principalmente, a função de fornecer energia ao organismo. A maioria dos hidratos de carbono presentes no pão são complexos, principalmente na forma de amido. Esses hidratos de carbono complexos são absorvidos mais lentamente do que os simples (APN, 2018).

A maioria dos pães contém proteínas vegetais e baixo teor de gordura. Contém fibras e vitaminas essenciais, como a tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina e o ácido fólico, possui ainda minerais, por exemplo, fósforo, magnésio, cálcio e potássio, enquanto o sódio, o ferro e o iodo também estão disponíveis, mas em quantidades menores (Shanmugave et al., 2020; Demirtaş et al., 2018; Kourkouta et al., 2017). Na Tabela 3, encontra-se a composição nutricional do pão de trigo e do pão de centeio.

**Tabela 3.** Composição nutricional dos pães de trigo e pão integral  
(*Fonte: Adaptado de Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (2023)*)

Por 100(g)	Pão de trigo	Pão de Centeio
Energia [kcal]	290	232
Lípidos [g]	2,2	3
Ácidos gordos saturados [g]	0,5	0,7
Ácidos gordos monoinsaturados [g]	0,3	0,4
Ácidos gordos polinsaturados [g]	0,8	1,1
Ácido linoleico [g]	0,8	1,1
Hidratos de carbono [g]	57,3	39,9
Açúcares [g]	2,1	2,2
Fibra [g]	3,8	7,4
Proteínas [g]	8,4	7,6
Sal [g]	1,5	1,2
Água [g]	26,2	40,3
Folatos [µg]	29	32
Cinza [g]	2,09	1,78
Sódio [mg]	610	500
Potássio [mg]	120	220
Cálcio [mg]	43	55
Fósforo [mg]	160	250
Magnésio [mg]	31	93
Ferro [mg]	2,2	3

A composição nutricional do pão varia com o tipo de farinha (refinadas ou integral) e dos ingredientes adicionais, como oleaginosas, frutas secas, sementes, azeitonas, entre outros. Pães feitos com farinhas menos refinadas, como o pão de centeio integral e o pão de trigo integral, têm um maior conteúdo de fibras, ácidos gordos poli-insaturados, vitaminas do complexo B e minerais (APN, 2018; Seixas, 2022).

### 2.3.3. Qualidade microbiológica do pão

Para assegurar a qualidade microbiológica do pão, é essencial adotar práticas rigorosas de higiene e controle de qualidade em todas as etapas da produção, desde a seleção da matéria-prima até o armazenamento final (Rahman et al., 2022).

Os grãos de cereais e seus produtos estão expostos à contaminação pós-colheita, durante o armazenamento, pré e pós-processamento. Os gêneros de fungos mais comuns relacionados com perdas em produtos de padaria pertencem aos gêneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Endomyces*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Na prática normal de panificação, os bolores não sobrevivem ao processo de cozedura do pão. Ao contrário, as micotoxinas produzidas por agentes patogênicos das culturas e fungos de deterioração alimentar são relativamente estáveis ao calor (Axel et al., 2017; Garcia et al., 2019). Tendo em vista os riscos para a saúde pública, o Regulamento (UE) 2023/915 estabelece os teores máximos permitidos de micotoxinas em cereais e produtos transformados.

Geralmente, os pães possuem teores de humidade relativamente elevados e atividade de água ( $a_w$ ) que oscila entre 0,94 a 0,97, o valor de pH é de aproximadamente de 6,0, sendo que pães fatiados, pré-embalados e embalados pertencem aos produtos de padaria mais suscetíveis à deterioração por fungos. Isto deve-se ao facto da embalagem impedir a perda de humidade das fatias de pão, criando condições de multiplicação adequadas para os fungos. Os pães embalados logo após a cozedura, sem adição de conservantes, têm uma vida de prateleira de apenas alguns dias, quando armazenados, à temperatura ambiente (Axel et al., 2017; Seixas, 2022).

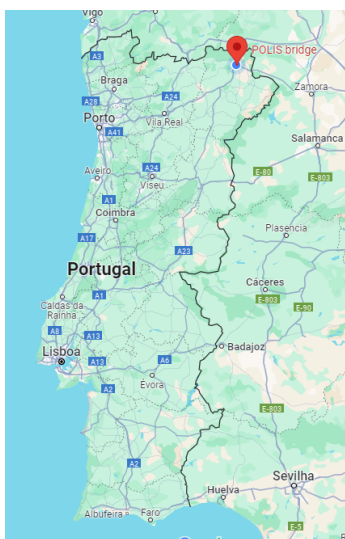
## **Capítulo 3**

### **Materiais e métodos**

### 3.1. Folha da tramazeira

#### 3.1.1. Amostragem e tramento das amostras

O presente trabalho foi realizado no laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança, na cidade de Bragança em Portugal. As amostras utilizadas, consistiram em folhas de tramazeira, coletadas na região do Pólis (Figura 6), na cidade de Bragança, Norte de Portugal. A colheita ocorreu durante os meses de setembro, outubro e novembro do ano de 2023.



**Figura 4.** Localização do Pólis de Bragança no mapa

(Fonte: Google maps)

De cada árvore, com auxílio de uma tesoura de poda, foram recolhidas amostras de folhas juntamente com o pecíolo. As amostras foram ensacadas e encaminhadas para o laboratório, onde se realizou a separação das folhas, selecionando apenas as folhas que não apresentassem dano aparente, como possíveis ataques de pragas ou doenças (Figura 7). Descartaram-se os pecíolos e as folhas selecionadas foram divididas em dois grupos (um deles para o controlo de secagem), pesadas e secas em estufa com ventilação (modelo INCU-Line VWR) à temperatura de 40°C, durante o período de 62 horas, conforme se pode observar na Figura 8. Para controlar o processo de secagem separou-se uma porção de folhas (7,0 g) que foram pesadas periodicamente para acompanhar a perda de água. No primeiro dia, pesou-se de 20 em 20 minutos, deixando sempre 10 minutos para esfriar no excicador, após retirar da estufa. Nos dias seguintes foram tiradas e pesadas amostras de hora em hora, até peso constante.



**Figura 5.** Secagem das folhas em estufa



**Figura 6.** Seleção das folhas de tramazeira

Após o processo de secagem, as folhas foram moidas no moinho (IKA TUBE-MILL) até se obter um pó fino (Figura 9), que é descrito como folhas de tramazeira secas (FTS). O pó obtido foi colocado em sacos plásticos com fecho Zip e armazenado no congelador a  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até posterior utilização.



**Figura 7.** Processo de trituração das folhas e ensacamento.

**Análise de humidade:** A determinação do teor de humidade das folhas de tramazeira foi realizada através da técnica de perda de peso por secagem em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ , conforme o método oficial da AOAC nº 925.10. Inicialmente, pesaram-se 5 g de folhas, que foram transferidas para placas de Petri previamente secas em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  por uma hora, resfriadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e, em seguida, pesadas.

As amostras foram então colocadas na estufa a 105°C e pesadas periodicamente até que atingissem peso constante. O teor de humidade foi calculado em percentagem, de acordo com a Equação 1.

**Equação 1.** Determinação do percentual de humidade

$$\% \text{ humidade} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa seca}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

A partir do valor obtido da percentagem de humidade, o rendimento de secagem foi obtido entre a relação a massa final e a massa inicial (Equação 2).

**Equação 2.** Percentual de rendimento de secagem

$$\text{Rendimento}(\%) = 100 - \% \text{ de humidade}$$

### 3.1.2. Análises microbiológicas

Para avaliar a qualidade microbiológica das FTS foram analisados os seguintes parâmetros: contagem total de bolores e leveduras, contagem total de aeróbios mesófilos, pesquisa e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* (Figura 10), bem como, pesquisa e contagem de esporos de clostrídeos sulfitos redutores. Para a realização das análises, pesou-se 1 g da amostra de FTS e misturou-se com 9 mL de água peptonada estéril em tubo de Falcon estéril, obtendo assim a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta primeira diluição, realizaram-se diluições sucessivas, adequadas para cada parâmetro a analisar. Todas as análises foram realizadas em duplicado.



**Figura 8.** Placas de Petri e tubos de ensaio com diferentes meios de cultura utilizadas para efetuar as análises microbiológicas

**Contagem total de bolores e leveduras:** A contagem total de bolores e leveduras foi realizada através do método de contagem em placa, conforme a descrito na norma ISO 21527-2 (2008). A técnica consiste na utilização do meio de cultura seletivo e diferencial Ágar Rosa Bengala, previamente esterilizado e distribuído em placas de Petri estéreis. Foi inoculado, 0,1 mL de cada diluição (descrito no início da secção 3.1.2.) nas placas de Petri contendo o meio de cultura. O inóculo foi espalhado à superfície das placas com um espalhador de vidro. As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas para a contagem de leveduras e por até 120 horas para a contagem de bolores. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de amostra (UFC/g), calculados a partir da Equação 3.

**Equação 3.** Contagem de Microrganismos de cada amostra

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

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

*V- volume de inóculo semeado em cada placa;*

*n1- número de placas da primeira diluição contada;*

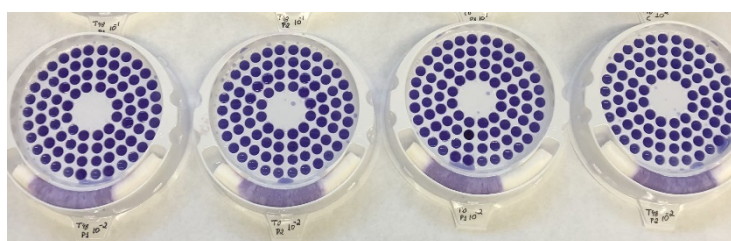
*n2- número de placas da segunda diluição contada;*

*d- diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens.*

**Contagem total de aeróbios mesófilos:** A contagem total de bactérias aeróbias mesófilas foi efetuada seguindo a Norma Portuguesa 4400-1 (2002,) através do método de contagem em placa por incorporação do inóculo utilizando o meio de Plate Count Ágar (PCA). Foi colocado 1 ml de cada diluição de FTS (ver início da secção 3.1.2.), em placas de Petri estéreis, posteriormente adicionou-se o meio de cultura e agitou-se. De seguida, as placas foram incubadas a 30°C durante 48 a 72 horas. ao fim desse tempo contaram-se as colónias formadas e os resultados foram expressos em UFC/g.

**Pesquisa e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*:** Para esta análise, foi utilizado o kit Simplate desenvolvido pela empresa Bio Control e aprovado pelo método AOAC 2005.03 (2005). O meio desidratado foi reconstituído com 100 mL de água destilada estéril. Posteriormente, 9 mL desse meio foram transferidos para tubos de ensaio

estéreis, onde se adicionou 1 mL de cada diluição das amostras FTS (ver início da secção 3.1.2.). Após homogeneização, a solução de cada tubo foi vertida para uma placa SimPlate (Figura 11). Os 84 poços de cada placa foram preenchidos com movimentos circulares, o excesso de líquido foi absorvido pela esponja lateral. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas. Após incubação, a identificação de coliformes totais foi realizada através da contagem dos poços com alteração de cor do meio (azul para rosa). A placa SimPlate foi então exposta a uma camara UV de 365 nm e contaram-se os poços que emitiam fluorescência. Os resultados foram calculados com base numa Tabela de conversão fornecida pelo fabricante e expressos em UFC/g.



**Figura 9.** Placas SimPlate

**Pesquisa e contagem de esporos de clostrídeos sulfito redutores:** A pesquisa e quantificação de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi realizada de acordo com a norma ISO 15213 (2003), pelo método de incorporação, num meio de cultura seletivo e diferencial Iron Sulphite Ágar. Num primeiro passo, para inativar a amostra, 1 mL de cada diluição (ver início da secção 3.1.2.) foi colocado em tubos de ensaio estéreis que foram incubados a 80°C, em banho-maria, durante 10 minutos. Após arrefecimento das amostras, foram adicionados 15 mL do meio de cultura a cada tubo e após solidificação do meio, adicionou-se mais 5 mL do meio. De seguida, os tubos foram incubados à temperatura de 37°C, durante 5 dias. A presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi avaliada pela deteção de colónias negras ou escuras.

### **3.1.3. Análises físico-químicas**

**Análises de gorduras:** O teor de gordura total das amostras foi determinado pelo método AOAC 920.85 (1920), que se baseia na extração contínua de lípidos pelo método Soxhlet, utilizando hexano como solvente de extração. Para a análise, 5 g da amostra de FTS foram pesadas para cartuchos de papel filtro de Watman que foram colocados no extrator

Soxhlet. Adicionaram-se 170 mL de hexano num balão de fundo achatado, previamente tarado e seco a 105°C. O balão foi acoplado ao Soxhlet. O sistema foi mantido sob aquecimento a 50°C, permitindo que o solvente evaporasse e condensasse continuamente, promovendo a extração das gorduras da amostra por aproximadamente 6 horas. Após o período de extração, o balão com o resíduo de gordura extraída foi transferido para uma estufa, onde permaneceu a 105°C por uma hora para garantir a evaporação completa do solvente residual. Posteriormente, o balão foi resfriado em exsiccador à temperatura ambiente e pesado novamente para determinar a quantidade de gordura extraída. Para o cálculo da percentagem de gordura presente na amostra foi utilizada a Equação 4.

#### **Equação 4.** Determinação teor de gordura

$$\text{Teor de gordura (\%)} = \frac{mf - mb}{mi} * 100$$

*mf* = massa final da amostra

*mb* = massa do balão vazio

*mi* = massa inicial da amostra

**Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa:** A determinação do perfil de ácidos gordos foi realizada por cromatografia gasosa, de acordo com a metodologia reportada por Shingfield et al. (2006). Para tal, pesou-se cerca de 0,1 g da amostra de gordura obtida no ensaio descrito no ensaio de análise de gorduras (secção 3.1.3.), para um tubo de ensaio, registrando-se a massa. Em seguida, foram adicionados 2 mL de n-hexano e 0,3 mL da solução metanólica de KOH 2 mol/L. A mistura foi deixada em repouso durante 45 minutos. Após esse período, adicionou-se sulfato de sódio anidro para secar a fase orgânica. A fase orgânica (n-hexano) seca foi filtrada, através de uma seringa com filtro de nylon, para um vial de vidro. As amostras foram armazenadas a 0°C até serem analisadas por cromatografia gasosa (GC). Para análise por GC usou-se o equipamento da marca DANI modelo GC1000 com injetor split/splitless e um detetor FID. A coluna usada foi uma Zebron ZB-FAME de tamanho 30 m x 0,25 mm com 0,20 µm de espessura de fase estacionária com 5 m de pré-coluna. O programa do gradiente de temperatura do forno foi o seguinte: durante 2 minutos, manteve-se a temperatura inicial da coluna de a 100°C; subiu a 10°C/min até aos 140°C; de seguida, subiu a 3°C/min até aos 190°C e depois subiu a 30°C/min até aos 260°C; mantendo a temperatura constante

durante 2 min. O fluxo do gás de arrasto (H<sub>2</sub>) foi de 1,1 mL/min, medido a 100°C. A temperatura do injetor foi 250°C e a do detetor 260°C. Relativamente ao detetor temos uma pressão de make-up com o gás nitrogénio de 0,6 bar e de ar reconstituído tipo K de 0,91 bar. A amostra (1 µL) foi injetada na coluna com um “split” de 1:40. A análise dos resultados foi efetuada com recurso ao programa CSWDataApex versão 1.7. A identificação dos ácidos gordos no cromatograma foi efetuada por comparação dos tempos de retenção com os obtidos com uma mistura padrão de ésteres metílicos (37-Component FAME Mix da Supelco).

**Índice de aterogenicidade e índice de trombogenicidade:** A avaliação do índice de aterogenicidade (IA) e índice de trombogenicidade (IT) permitem entender os efeitos dos ácidos gordos (AG) na saúde cardiovascular, auxiliando na identificação de fatores de risco para doenças como aterosclerose e trombose. Esta abordagem permite avaliar a qualidade nutricional dos lípidos, reforçando a importância da escolha de alimentos ricos em fontes lipídicas saudáveis na alimentação (Tilami & Kouřimská, 2022). Os índices foram calculados a partir dos dados obtidos na secção anterior de determinação do perfil de ácidos gordos (secção 3.1.3). O IA relaciona os principais ácidos gordos saturados pró-aterogénicos, como o C14:0 (ácido mirístico), C16:0 (ácido palmítico) e C18:0 (ácido esteárico), com os ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs), e polinsaturados (PUFAs n-6 e n-3), que possuem efeito protetor contra a aterosclerose. Valores baixos de IA indicam uma maior proporção de ácidos gordos insaturados, que favorecem a saúde cardiovascular. O cálculo foi realizado de acordo com Ulbricht e Southgate (1991), seguindo a Equação 5.

**Equação 5.** Cálculo do índice de aterogenicidade

$$IA = \frac{C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0}{\Sigma MUFA + \Sigma PUFA\ n - 6 + \Sigma PUFA\ n - 3}$$

O IT expressa a relação entre ácidos gordos saturados e os principais antitrombóticos, incluindo MUFAs e PUFAs. Valores mais baixos de IT indicam uma menor predisposição à formação de trombos (coágulos sanguíneos formados nas veias ou artérias). O cálculo foi expresso com a Equação 6.

### Equação 6. Cálculo do índice de trombonenicidade

$$IT = \frac{C14:0 + C16:0 + C18}{0,5 \times MUFA + 0,5 \times PUFA-n6 + 3 \times PUFA-n3 + PUFA-n3 / PUFA-n6}$$

## 3.1.4. Otimização de extração de compostos fenólicos

### 3.1.4.1. Desenho experimental

Para otimizar a composição da solução hidroetanólica extrativa de compostos fenólicos das folhas, foi adotada a metodologia de superfície de resposta (RSM). Para estudar a influência da percentagem de etanol e do valor de pH utilizou-se um desenho experimental composto por 14 ensaios diferentes. O intervalo de pH variou entre 0,87 e 5,14 (ajustado com diferentes concentrações de ácido clorídrico), enquanto a percentagem de etanol oscilou entre 60,0 e 95,4%, conforme indicado na Tabela 4. O tratamento de dados obtidos segundo a metodologia de superfície de resposta (RSM) foi realizado com o software R para determinar o ponto ótimo para os fatores estudados.

**Tabela 4.** Desenho experimental para determinar condições ótimas para extração hidroetanólica

Ensaio	Etanol (%)	pH
1	60	3,01
2	60	3,01
3	85	4,50
4	60	3,01
5	35	1,50
6	35	4,50
7	85	1,50
8	60	3,01
9	24	3,01
10	95,4	3,01
11	60	0,87
12	60	5,14
13	60	3,01
14	60	3,01

O procedimento de extração foi conduzido adicionando 2,5 g de FTS a 25 mL de solução hidroetanólica, conforme o desenho experimental, sob agitação contínua por 24 h à temperatura ambiente. De seguida, a mistura foi filtrada com papel de filtro, e a solução obtida foi armazenada em tubos Falcon sob refrigeração a -24°C (Figura 12).



**Figura 10.** Soluções filtradas dos ensaios realizados com o desenho experimental

Como variáveis de resposta, foram utilizados os resultados obtidos nas soluções do desenho experimental aplicando os métodos analíticos para a determinação dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante pelo método DPPH e cromatografia por camada fina (TLC). As análises foram realizadas em triplicado. Com base nos resultados, definiram-se as condições experimentais ótimas para obtenção do extrato mais promissor, conforme o modelo de superfície de resposta (RSM).

**Determinação dos compostos fenólicos totais:** A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton et al. (1999), com adaptações. Para a análise dos fenóis totais pipetaram-se 0,5 mL de cada extrato obtido no desenho experimental, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% (v/v), e 2,0 mL de carbonato de sódio a 10%. A solução resultante foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse intervalo, foi medida a absorvância das soluções a 760 nm em espectrofotômetro (UV-3100PC VWR). Os cálculos foram realizados com base numa curva de calibração obtida utilizando o padrão ácido gálico (AG), sendo os resultados expressos em miligramas de equivalentes de AG por g de amostra.

**Determinação de flavonoides totais por método  $AlCl_3$ :** A análise dos flavonoides totais das folhas, foi realizado conforme descrito por Woisky & Salatino. (1998). Adicionou-se em tubos de ensaio 2,5 mL de cada extrato obtido no desenho experimental, preparadas a partir de 1 mL de extrato reidratado com solução hidroetanólica em balão de 10mL, com 2,5 mL de  $AlCl_3$  a 2%. Agitou-se os tubos em vórtex e deixou-se repousar por 1 hora, à

temperatura ambiente. A absorvância foi medida em tubo de quartzo em espectrofotômetro (UV-3100PC VWR) a 425 nm. Os cálculos foram realizados com base em uma curva de calibração construída utilizando quercetina (Q) como padrão. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina por g de amostra.

**Determinação da atividade antioxidante por método DPPH:** O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), descrito por Hatano et al. (1988), foi utilizado para determinar a atividade antioxidante. Para realizar a análise, pipetaram-se 0,3 mL de cada extrato obtido no desenho experimental 2,7 mL do reagente DPPH ( $2.0 \times 10^{-4}$  M). As soluções foram mantidas no escuro durante 60 minutos e posteriormente leram-se as absorvâncias em espectrofotômetro (UV-3100PC VWR) a 517 nm. Os resultados expressaram-se em miligramas equivalentes de trolox por g.

**Cromatografia por camada fina (TLC):** Com o objetivo de visualizar as diferenças entre os extratos obtidos pelo desenho experimental efetuou-se a análise por TLC de acordo com a metodologia descrita por Sherma et al. (2003). Foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV254 (20x20 cm, da Macherey-Nagel). Para aplicação das amostras na placa, foi traçada uma linha fina a 1,5 cm da base e marcaram-se pontos, espaçadas de 1cm, para determinar o local da aplicação das amostras. De seguida, marcou-se uma linha adicional a 8,5 cm da base, indicando o limite de migração da fase móvel (frente do solvente) e aplicou-se 4  $\mu$ L de amostra com uma seringa de vidro. Depois preparou-se um eluente (fase móvel) composto por clorofórmio, acetato de etilo e ácido fórmico (15:45:5). Esta solução foi transferida para a câmara cromatográfica, que foi saturada com papel de filtro embebido na fase móvel para manter a humidade constante. A placa TLC, contendo as soluções aplicadas, foi colocada na câmara com a linha de aplicação voltada para a fase móvel. A câmara foi fechada para garantir um ambiente controlado, e deixada em repouso até se observar a migração dos adequada dos componenters ao longo da placa. Após a separação, a placa foi retirada da câmara e colocada numa estufa a 50°C durante 5 minutos para secagem completa, posteriormente, observou-se à luz ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 365 nm, utilizando a câmara UV (CN-15LL). A fluorescência dos compostos permitiu visualizar e identificar qualitativamente manchas relacionadas com grupos de compostos separados.

### 3.1.4.2. Análise das propriedades bioativas do extrato otimizado

Para a preparação do extrato, pesou-se 5 g de FTS, adicionou-se 50mL da solução hidroetanólica otimizada, sob agitação constante durante 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado e o solvente evaporado num evaporador rotativo (IKA HB10), resultando na obtenção do extrato seco das folhas (ESF) na concentração de 1,6mg/mL. O extrato (ESF) foi utilizado para quantificar os compostos fenólicos totais, flavonoides totais, avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, conforme descritos na secção 3.1.4.1. Para estas análises, o ESF foi reidratado com 10 mL da solução hidroetanólica otimizada. No entanto, devido à alta concentração da amostra reidratada, foi necessário realizar uma diluição adicional, pipetando 1 mL dessa solução para um balão de 25 mL cujo volume total foi ajustado com solução enólica.

Também, foi determinada a capacidade antioxidante pelos métodos FRAP e ferrocianeto modificado (Mfec), a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

**Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP:** A atividade antioxidante pelo método FRAP foi avaliada conforme descrito por Berker et al. (2007). Para a preparação do reagente FRAP, misturou-se a solução tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), TPTZ 10 mM [2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] e  $\text{FeCl}_3$  20 mM, na proporção de 10:1:1, respetivamente. A amostra do ESF foi preparada de acordo com as diluições realizadas na secção 3.1.4.1., sendo pipetado 0,1 mL em tubo de ensaio, seguidas da adição de 3 mL do reagente FRAP e 0,3 mL de água desionizada. As soluções foram mantidas no escuro durante 6 minutos, e, posteriormente, as suas absorvâncias foram medidas num espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido ascórbico com base numa curva de calibração para o ácido ascórbico.

**Determinação da atividade antioxidante pelo método de ferricianeto modificado (Mfec):** A determinação da capacidade antioxidante pelo método do ferricianeto modificado (MFec), foi efetuada conforme descrito por Paula et al. (2023). Para isso, foi preparado a amostra do EFS de acordo com as diluições apresentada na secção 3.1.4.1. Posteriormente foi adicionado 1,0 mL da amostra em tubos de ensaio, 5,0 mL de água deionizada, 1,5 mL de HCl (1M), 1,5 mL de solução de ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1%), 0,5 mL do reagente SDS (1%) e 0,5 mL da solução de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (0,2%). Incubou-se a mistura em banho-maria a 50°C por

20 minutos. Após a incubação, a solução foi resfriada à temperatura ambiente, e a absorbância foi medida a 750 nm utilizando um espectrofotômetro (UV-3100PC VWR). Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido ascórbico, através da realização de uma curva de calibração utilizando como padrão o ácido ascórbico.

**Atividade antimicrobiana:** Para avaliar a atividade antimicrobiana do ESF, foi utilizada a técnica de microdiluição em placa de 96 poços, descrito por Paula (2012), com ligeiras modificações. Como material biológico utilizou-se *Bacillus cereus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa). Para a preparação das suspensões bacterianas, as estirpes foram previamente cultivadas em 50 mL de meio líquido de Mueller-Hinton (MH) e incubadas a 37°C com agitação por aproximadamente 4 horas, até atingirem a fase logarítmica de crescimento, numa concentração padrão de 0,5 na escala de McFarland ( $1 \times 10^7$  UFC/mL). O extrato das folhas secas foi diluído diretamente na placa de 96 poços (diluições seriadas). Inicialmente, 100 µL de meio Muller Hinton (MH) foram adicionados a cada poço. Nos primeiros poços, foi adicionada a concentração mais alta do extrato seco otimizado (4 mg/mL, dissolvido em DMSO 10%), que foi diluída em série até alcançar a menor concentração. Em seguida, foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana a cada poço. Para controlo do ensaio, foram incluídos um controlo positivo, contendo meio de cultura e inóculo para garantir o crescimento bacteriano, e um controlo negativo, contendo apenas meio de cultura para verificar possíveis contaminações. A microplaca foi incubada numa incubadora orbital (Orbital Incubator SI500) a 37°C com agitação contínua por 24 horas. Após esse período, a absorbância foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO. O parâmetro utilizado para avaliar o efeito do ESF foi a Concentração Mínima Inibitória (CMI), definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir visivelmente o crescimento do microrganismo em estudo.

**Atividade citotóxica:** A atividade citotóxica foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SRB), utilizando a linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), conforme descrito por Abreu et al. (2011). O ensaio teve como objetivo determinar a toxicidade do ESF, uma vez que a incorporação de produtos naturais em alimentos deve ter o estatuto GRAS (ingredientes geralmente reconhecido como seguro para o Homem e para os animais), de acordo com a legislação da FDA (Food and Drugs Administration), ingredientes considerados GRAS não exigem

aprovação prévia, desde que sua segurança seja suportada por dados científicos disponíveis publicamente e amplamente reconhecida por especialistas qualificados. Assim, a avaliação da toxicidade é essencial para garantir que o ingrediente não cause danos a humanos e animais, atendendo ao mesmo padrão de segurança exigido para aditivos alimentares.

A técnica baseia-se na cultura de células em fase de crescimento exponencial, as quais são inoculadas em placas de 96 poços e expostas a seis diluições seriadas de cada composto testado, utilizaram-se 8 mg de extrato otimizado de folhas secas diluídos em 1 mL de água destilada, nas concentrações finais de 125,00, 31,25, 7,81, 1,95, 0,49 e 0,12 µM. Após 72 horas de exposição, as células foram fixadas pela adição de 25 µL de ácido tricloroacético (TCA) frio a 50% (p/v), sendo posteriormente incubadas por 60 minutos a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com água desionizada e secas. Para a coloração, foi adicionada uma solução de vermelho sulforodamina B 0,1% p/v (SRB) em ácido acético a 1%, 50 µL a cada poço, e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. O corante não ligado foi removido através de lavagens com ácido acético a 1%, as placas foram novamente secas ao ar. Posteriormente, o corante aderido foi solubilizado com 100 µL de uma solução de base Tris a 100 mM. A densidade ótica foi avaliada num leitor de placas automatizado (Biotek Elx800) a um comprimento de onda de 540 nm. Posteriormente, construíram-se curvas de dose-resposta relacionando o teor do composto com linhagem celular testada.

## **3.2. Fermentação das folhas de tramazeira**

### **3.2.1. Otimização da fermentação**

A otimização da fermentação das folhas de tramazeira foi efetuada com base num desenho experimental utilizado o programa R para o tratamento de dados. A fermentação foi conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* segundo o reportado por Dulf et al. (2016). Foram realizados 15 ensaios distintos, variando os seguintes parâmetros: teor em nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), quantidade glicose, proporção de amostra de folhas de tramazeira secas e concentração inicial de inóculo de levedura (Tabela 5). Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers de 25 e 50 mL. Após a pesagem, foram adicionados os sais, 25 mL de NaCl a 0,003%, autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. As amostras das folhas secas (FTS) foram pesadas e pasteurizadas em banho-maria (Julabo SW23) a 85°C por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente dos Erlenmeyers

contendo os diferentes meios de cultura, foi adicionada a amostra. Após o arrefecimento dos Erlenmeyers, foram adicionadas as concentrações de inóculo descritas na Tabela 5. Os frascos foram então vedados com rolhas de borracha, nas quais estavam acoplados dispositivos “*airlock*” tipo S, permitindo a liberação dos gases produzidos durante a fermentação e evitando a contaminação pelo meio externo. A incubação foi realizada em uma incubadora orbital (Incubated Shaker SIF6000R) a 25°C. As fermentações foram monitorizadas diariamente durante 72 horas, avaliando as unidades formadoras de colônias (UFCs).

**Tabela 5.** Desenho experimental da fermentação das folhas

<b>Ensaio</b>	<b>Inóculo</b>	<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(g)</b>	<b>Glicose(g)</b>	<b>Amostra(g)</b>
<b>1</b>	10 <sup>6</sup>	0,8	0,80	7
<b>2</b>	10 <sup>7</sup>	1,4	1,40	5
<b>3</b>	10 <sup>5</sup>	1,4	0,20	5
<b>4</b>	10 <sup>7</sup>	0,2	0,20	5
<b>5</b>	10 <sup>7</sup>	1,4	0,20	2,5
<b>6</b>	10 <sup>5</sup>	1,4	1,40	2,5
<b>7</b>	10 <sup>5</sup>	0,2	0,20	2,5
<b>8</b>	10 <sup>6</sup>	0,8	0,80	7
<b>9</b>	10 <sup>7</sup>	0,2	1,40	2,5
<b>10</b>	10 <sup>7</sup>	1,4	0,20	2,5
<b>11</b>	10 <sup>5</sup>	0,2	0,20	2,5
<b>12</b>	10 <sup>7</sup>	0,2	1,40	5
<b>13</b>	10 <sup>5</sup>	0,2	0,20	5
<b>14</b>	10 <sup>5</sup>	1,4	1,40	5
<b>15</b>	10 <sup>6</sup>	0,8	0,80	7

Com base nos valores obtidos nos diferentes ensaios foi determinada a taxa de crescimento  $\mu_c$  (Equação 7). Posteriormente, para obter o produto fermentado a incorporar no pão, utilizaram-se as condições experimentais mais adequadas para crescimento da levedura, e posteriormente esta foi efetuada em maior escala, de modo a obter os extratos que seriam incorporados a pão.

### Equação 7. Cálculo da taxa de crescimento

$$\mu_C = \frac{\ln(UFC_f) - \ln(UFC_i)}{t_f - t_i}$$

$\mu$  = taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ );

$UFC_i$  = contagens de colônias no tempo inicial

$UFC_f$  = contagem no final da fase exponencial

$t_f - t_i$  = intervalo de tempo correspondente

## 3.2.2. Análises ao produto fermentado

### 3.2.2.1 Análises microbiológicas

Para a avaliação microbiológica do produto fermentado (PF), a contagem total de bolores e leveduras, contagem total de aeróbios mesófilos, esporos de clostrídios sulfito-redutores foi realizada conforme descrito na Secção 3.1.2.

**Pesquisa e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*:** Esta análise foi realizada em meio seletivo, cromogénico CHROMagar™ para detecção e contagem de Coliformes e *E. coli*, segundo a norma ISO 9308-1 (2014). O meio foi hidratado e esterilizado conforme indicação do fabricante. Foram realizadas diluições seriadas decimais do PF, como descrito na secção 3.1.2. Inoculou-se 0,1 mL de cada diluição das amostras nas placas de Petri contendo meio e incubou-se a 30°C durante 24 horas. A contagem foi realizada com base na coloração das colónias, uma vez que o meio contém um substrato cromogénico para a enzima  $\beta$ -galactosidase, normalmente produzida por coliformes. A hidrólise desse substrato origina um produto de cor rosada ou avermelhada, permitindo a deteção visual dos coliformes. Além disso, o meio inclui um segundo substrato cromogénico específico para a enzima  $\beta$ -glucuronidase, presente na maioria das estirpes de *Escherichia coli*. A hidrólise desse substrato resulta em um produto de coloração azul ou violeta, diferenciando *E. coli* dos coliformes totais.

### 3.2.2.2. Análises de gorduras

A análise de gordura do PF, a identificação do perfil de ácidos gordos, por cromatografia gasosa e o cálculo dos índices de IA e IT, seguiram as metodologias descritas na secção 3.1.3.

### **3.2.2.3. Análises das propriedades bioativas do produto fermentado**

Para as análises químicas do produto fermentado, a amostra foi inicialmente congelada e posteriormente submetida à liofilização. Após este processo, o PF foi submetido a extração de compostos fenólicos de acordo com o descrito na secção 3.1.4.1. A partir do extrato seco, definido como extrato de folhas de tramazeira fermentadas (EFTF), 1 g foi reidratado com 10 mL da solução hidroetanólica otimizada, sendo esta solução utilizada para as análises químicas, incluindo determinação dos compostos fenólicos totais, flavonóides totais, atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e ferricianeto modificado, conforme as metodologias apresentadas na secção 3.1.4.2. com ligeiras modificações. Para o tempo inicial (T0), foi utilizada uma alíquota de 1 mL da solução reidratada, diluída em 10 mL da solução hidroetanólica otimizada. Para o tempo final (T72), as amostras foram diluídas em 25 mL da mesma solução otimizada.

**Atividade citotóxica:** A atividade citotóxica no produto fermentado foi avaliada seguindo o procedimento descrito na secção 3.1.4.2.

## **3.3. Pão**

### **3.3.1. Produção das amostras**

A farinha utilizada para a confeção do pão foi da variedade Portuguesa trigo barbela T150 orgânico, foi adquirida à empresa Farinhas Paulino Horta, LDA, localizada em Alenquer. As demais matérias-prima foram obtidas em comércio local.

Produziram-se nove amostras de pão, cada uma de aproximadamente 140 g. A formulação utilizada para cada amostra incluiu 100 g de farinha de trigo da variedade Barbela, 1,0 g de fermento biológico seco, 0,7 g de sal e 70 mL de água. As amostras de pão foram diferenciadas sendo 3 amostras controlo (PC), sem adição de extrato fermentado, 3 amostras com incorporação de 0,5% de EFTF (P0,5) e 3 amostras com 2,0% de EFTF (P2,0), conforme apresentado na Figura 13. Após a preparação, os pães foram armazenados em sacos de papel, simulando condições de armazenamento típicas do mercado.



**Figura 11.** Amostras de PC, P0,5% de EFTF e P2,0% de EFTF

### 3.3.2. Análises microbiológicas

Para avaliar a qualidade microbiológica do pão, foram pesados 5 g de cada amostra em cada tempo avaliado (T0, T48 e T96), transferidos para um saco plástico estéril e homogeneizados com 45 mL de água peptonada, para obter a diluição  $10^{-1}$ . A suspensão obtida foi utilizada para a realização das análises microbiológicas.

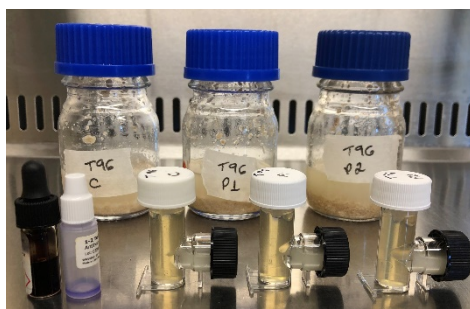
As análises foram conduzidas, à exceção da pesquisa e contagem de *Bacillus cereus*, pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, conforme descrito na secção 3.1.2. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

**Pesquisa e contagem de *Bacillus cereus*:** A quantificação de *Bacillus cereus* foi realizada pela técnica de contagem em placa, de acordo com a norma ISO 7932 (2004). As amostras foram submetidas a diluições decimais, conforme indicado na secção 3.1.2. Posteriormente 0,1 mL de cada diluição foi transferido para a superfície de placas de Petri contendo meio de cultura (MYP), meio seletivo para *B. cereus*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas, e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de amostra de pão (UFC/g).

**Pesquisa e contagem de *Staphylococcus aureus*:** A metodologia NP 4400-1 (2002) foi utilizada para a quantificação de *Staphylococcus aureus*, recorrendo ao meio de cultura Baird-Parker (BP) enriquecido com gema de ovo. As amostras foram submetidas a diluições decimais, conforme indicado na secção 3.1.2., e 0,1 mL de cada diluição foi inoculado em placas de Petri contendo o meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 a 48 horas. As colónias de *S. aureus* apresentam características específicas, formando coloração preta com um halo claro ao redor, o que facilita sua identificação. Após a incubação, as colónias foram contadas para determinar a quantidade

de unidades formadoras de colónias (UFC), permitindo uma quantificação precisa e confiável para o controlo microbiológico dos alimentos. Para a identificação de estafilococos coagulase positiva, uma pequena amostra de cada colónia foi retirada e inoculada em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, 0,1 mL de cada cultura foi transferido para um novo tubo estéril, ao qual foram adicionados 0,3 mL de plasma de coelho. Os tubos foram incubados novamente a 37°C por mais 4 a 6 horas. No final foi avaliada a coagulação do plasma, considerando-se coagulase positiva (*S aureus*) quando o coágulo formado ocupava mais de três quartos do volume inicial do líquido.

**Pesquisa de *Salmonella*:** Para detetar *Salmonella spp* utilizou-se o método 1-2TEST, homologado pela AOAC 989.13 (2000) e desenvolvido pelas empresas BioControl e Ambifood (Figura 14). Para esta análise, foi realizado um pré-enriquecimento da amostra em água peptonada a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas conforme descrita na secção 3.1.2. Seguidamente, preparou-se o kit 1-2TEST. O teste foi considerado positivo quando se verificou a formação de uma banda de imunoprecipitação, resultante da reacção entre anticorpos específicos e os antígenos de *Salmonella spp*.



**Figura 12.** Análise de *Salmonella spp* utilizando kit 1-2TEST

### 3.3.3. Análises físico-químicas

Foram determinados os teores de humidade, cinzas, pH, proteínas, gordura, hidratos de carbono e valor energético. As análises foram realizadas nos tempos 0h (T0) e 96h (T96), em duplicado.

**Análise de humidade:** A determinação do teor de humidade foi realizada conforme descrito na secção 3.1.1, com algumas adaptações. A principal alteração consistiu na

utilização de 2 g de amostra, colocados em cadinhos para a secagem. O teor de humidade foi calculado em percentagem, de acordo com a Equação 1 (secção 3.1.1).

**Análise do teor de cinzas:** A análise de cinzas é um método utilizado para quantificar a quantidade total de minerais e outros compostos inorgânicos presentes numa amostra. O princípio baseia-se na queima completa da matéria orgânica, deixando apenas o resíduo inorgânico, correspondente às cinzas. A determinação do teor de cinzas foi realizada de acordo com o método oficial da AOAC nº 923.03 (1923).

Para esta análise, os cadinhos vazios foram calcinados numa estufa a 105°C durante 1 hora, resfriados em excicador até atingirem a temperatura ambiente e, posteriormente, pesados para determinação da sua massa e identificação. Em seguida, aproximadamente 2 g de cada amostra de pão (massa inicial) foram pesadas e transferidas para os respetivos cadinhos, sendo posteriormente incineradas em mufla a 550°C por 12 horas, tempo necessário para que a amostra fique de cor cinza-clara a branca, indicando que toda a matéria orgânica foi eliminada.

Após esse período, os cadinhos foram retirados da mufla e colocados num dessecador para arrefecimento e pesados. O teor de cinzas foi calculado através da seguinte Equação 8.

**Equação 8.** Teor de cinzas (%)

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{mf - mc}{mi - mc} * 100$$

*mf* = massa do cadinho com a amostra após secagem

*mc* = massa do cadinho vazio

*mi* = massa inicial do cadinho com a amostra

**Determinação do pH:** A determinação de pH das amostras foi realizada de acordo com o método oficial da AOAC nº 943.02 (1943). Para esta análise, foram pesadas 3 g de cada amostra de pão e adicionados 30 mL de água desionizada. A mistura foi submetida a agitação contínua em placa agitadora durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi deixada em repouso por 10 minutos e, em seguida, filtrada. A medição do pH foi realizada utilizando um eléctrodo acoplado a um potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

**Determinação do teor de proteínas:** Para determinar o teor de proteína total nas amostras de pão, foi seguido o método aprovado pela AOAC nº 950.36 (1950). Inicialmente, 2 g de cada amostra de pão foram transferidas para tubos de digestão Kjeldahl. Adicionou-se 12 mL de ácido sulfúrico concentrado e duas pastilhas de catalisador (99,9% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,1% Se) por tubo. Os tubos foram então colocados num bloco digestor a 420°C por 60 minutos. Após o arrefecimento das amostras até aproximadamente 50°C, procedeu-se à destilação numa unidade destiladora semiautomática. Seguidamente realizou-se a titulação com uma solução de HCl 0,2 N, anotando-se o volume consumido para o cálculo do teor de azoto, que foi posteriormente convertido em proteína (Equação 9).

**Equação 9.** Teor de azoto (%)

$$\text{Azoto (\%)} = \frac{V * [HCl] \times 0,014}{m} \times 100$$

*v = volume (mL) gasto na titulação*

*[HCl] = concentração de HCl utilizado (0,2m)*

*0,014 = fator de conversão de azoto*

*m = massa da amostra*

**Análises de gorduras:** A análise de gordura das amostras de pão, a identificação do perfil de ácidos gordos, e o cálculo de IA e de IT, seguiram as metodologias descritas na secção 3.1.3. As análises foram realizadas em duplicado.

**Determinação de hidratos de carbono e valor energético:** O teor de hidratos de carbono, foi calculado pela diferença dos componentes humidade, cinzas, gordura e proteína, utilizando a Equação 10.

**Equação 10.** Hidratos de carbono (%)

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

O valor energético foi calculado de acordo com o descrito pelo Regulamento

(UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho (2011), sendo determinado com base nos teores de macronutrientes (proteínas, lipídios e carboidratos) presentes nas amostras de pão, utilizando os valores de conversão padrão para cada um desses componentes. A energia foi calculada pela soma das energias fornecidas por cada macronutriente, utilizando os seguintes fatores de conversão: 4 kcal/g para proteínas, 4 kcal/g para carboidratos e 9 kcal/g para lipídios, conforme a Equação 11.

**Equação 11.** Valor energético (Kcal)

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

### 3.3.4. Análises químicas ao extrato do pão

Para efetuar estas análises, as amostras foram trituradas, depois, pesou-se 1 g da amostra para um gobelé, e adicionou-se 25 mL da solução hidroetanólica otimizada anteriormente. A mistura foi colocada em placa de agitação, à temperatura ambiente, durante aproximadamente 24 horas. Após este período, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo.

A partir do extrato foram determinados o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e ferricianeto modificado, seguindo as metodologias descritas nas secções 3.1.4.2., com ligeiras modificações.

### 3.3.5. Análise colorimétrica

A análise de cor das amostras de pão foi realizada com um colorímetro Konica Minolta, modelo CR-400. O procedimento foi realizado em triplicado para todas as amostras, utilizando uma fatia de pão por medição, sendo avaliado a crosta e o miolo, colocando-as sobre fundo branco para garantir uniformidade. Os resultados obtidos foram expressos nos sistemas CIELAB. Foram avaliadas as coordenadas L\*, a\*, b\*, C\* e h(C) (CIELAB). A coordenada L\* (ou L) representa a luminosidade, a\* indica o conteúdo de vermelho (+) a verde (-), e b\* refere-se ao conteúdo de amarelo (+) a azul (-), o C\* que indica a intensidade ou pureza da cor e o parâmetro h que indica a tonalidade ou a cor propriamente dita e fornece uma visão tridimensional da cor. O aparelho foi previamente

calibrado com um padrão branco de referência.

### **3.3.6. Análise de textura**

Utilizou-se um texturômetro TA.XT Plus – Stable Micro Systems (Vienna Court, Godalming, Reino Unido), equipado com uma célula de carga de 30 kgf. O perfil de textura (TPA), que simula a mastigação humana por meio de duas compressões consecutivas da amostra, foi realizado com a sonda cilíndrica de alumínio P/36R. A velocidade de aproximação e afastamento da sonda foi ajustada para 3 mm/s, e a posição-alvo definida para 30% de compressão, com início a partir de uma força de 10 g. Os resultados foram integrados e processados por meio de uma macro desenvolvida para quantificar os principais parâmetros de textura, incluindo dureza, fraturabilidade, adesividade, flexibilidade, coesividade, viscosidade e resiliência. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

### **3.3.7. Análise sensorial**

Com o objetivo de avaliar a aceitação e a preferência das três amostras de pão: uma amostra controle (sem adição do extrato fermentado), outra com 0,5% e 2% de extratos fermentados realizou-se a análise sensorial por consumidores não treinados. As amostras foram apresentadas aos participantes de forma aleatória, sendo codificadas para evitar viés de reconhecimento. Os participantes preencheram um questionário que incluía perguntas sobre dados demográficos (nacionalidade, idade, gênero e nível de escolaridade) e hábitos de consumo de pão (frequência e tipo de pão consumido). Em seguida, avaliaram as amostras quanto à intensidade percebida de atributos sensoriais (aparência, aroma, textura e sabor) utilizando uma escala hedônica de cinco pontos. Por fim, os avaliadores indicaram a sua amostra favorita e a sua intenção de compra. O estudo foi conduzido garantindo a privacidade dos participantes, que foram informados sobre o inquérito apresentado (ver inquérito em anexo).

## **Capítulo 4**

### **Resultados e discussões**

## 4.1. Folhas de tramazeira

### 4.1.1. Secagem das folhas

Durante o processo de secagem das folhas da tramazeira na estufa a 40°C, realizou-se o controlo do peso de uma amostra de folhas (7,0 g) ao longo do tempo (horas) (Figura. 15).



**Figura 13.** Perda de peso das folhas em função do tempo durante a secagem de folhas da tramazeira

Observou-se que, nas primeiras 9 horas, houve uma diminuição acentuada no peso, indicando uma rápida perda de água. Após este tempo, a redução de peso estabilizou-se, mantendo-se quase constante nas horas subsequentes, sugerindo que a maior parte da água foi eliminada nas 30 horas iniciais. Este comportamento foi observado por Kaveh et al. (2024), num estudo efetuado com folhas de hortelã, demonstraram que a perda água no início do processo de secagem foi elevada. O teor humidade final das folhas foi de 55,25% e rendimento de secagem de 44,75%.

### 4.1.2. Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas realizados na amostra de folhas de tramazeira secas estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados obtidos nas microbiológicas das amostras de folhas secas (FTS)

Amostra	Bolores e leveduras (log UFC/mL)	Mesófilos totais (log UFC/mL)	Coliformes totais (log UFC/mL)	<i>E. coli</i> (log UFC/mL)	Clostrídios (UFC/mL)
FTS	3,02±0,05	3,42±0,05	4,61±0,01	<10	<10

FTS – Folhas de tramazeira secas; UFC – Unidade formadora de colónias

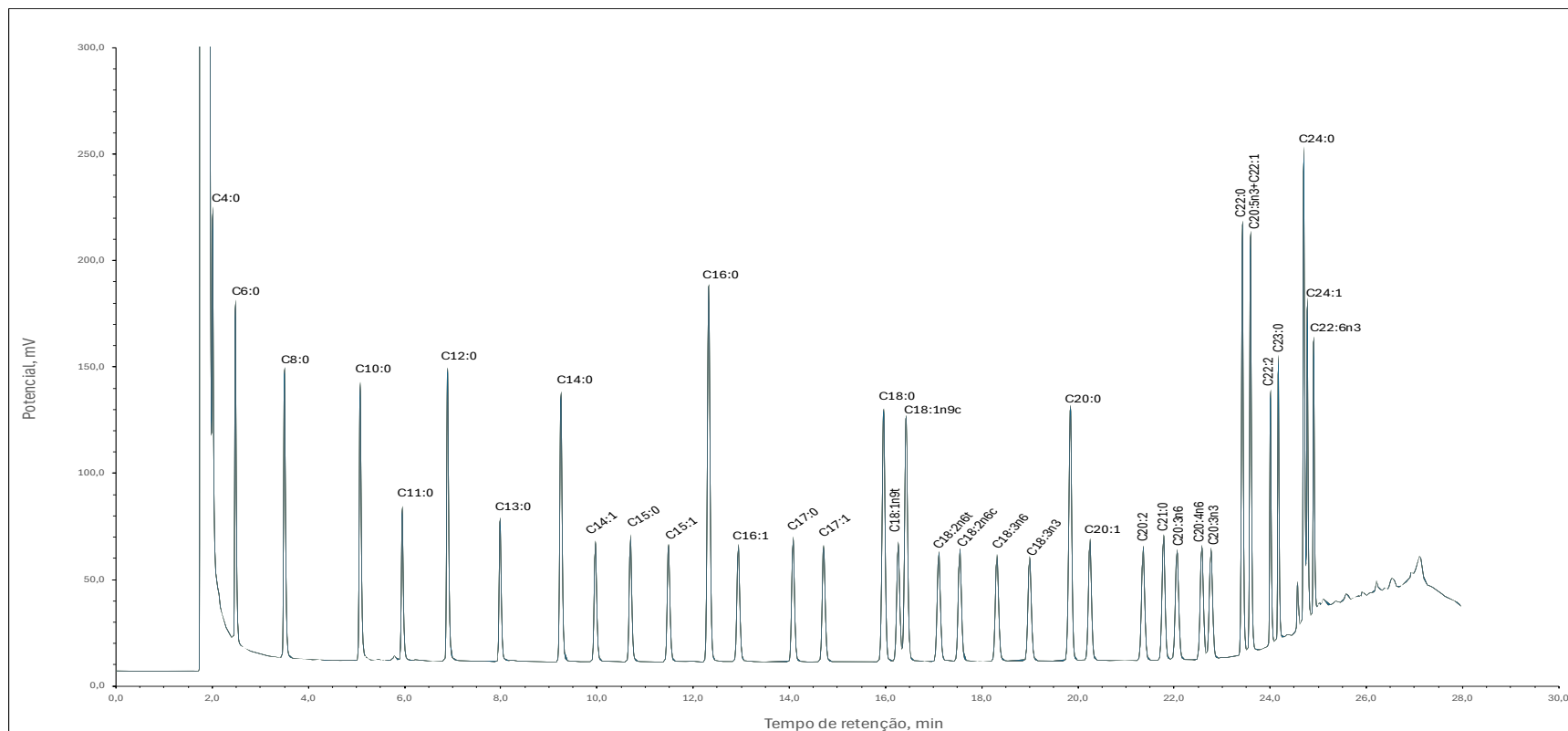
A amostra de folhas de tramazeira secas (FTS) apresentaram contagem de bolores e

leveduras de  $3,02 \pm 0,05$  log UFC/mL e de mesófilos totais de  $3,42 \pm 0,05$  log UFC/mL, valores compatíveis com a microbiota típica de materiais vegetais expostos ao meio ambiente. Segundo reportado por Milani (2017), é comum os tecidos vegetais serem colonizados por bactérias epífitas e endofíticas, as quais podem desempenhar funções benéficas como promoção de crescimento vegetal ou controle biológico de patógenos. A contagem de coliformes totais observada ( $4,61 \pm 0,01$  log UFC/mL), sugere possível contaminação por fontes ambientais como solo, água ou contato com animais. Resultados semelhantes foram observados por Carrijo et al. (2024), que observaram a presença de coliformes totais e termotolerantes em 50% das amostras de plantas medicinais analisadas, salientando a importância do controle microbiológico na garantia da qualidade sanitária desses produtos. Apesar da presença de coliformes totais, *E. coli* não estava presente na amostra analisada, a ausência de esporos de clostrídios, indica que não houve condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos anaeróbios esporulados.

#### 4.1.3. Gordura total e perfil de ácidos gordos

**Teor total de gordura:** O teor total de gordura presente na amostra de folhas da tramazeira secas (FTS) foi de  $0,37 \pm 0,06\%$ , um resultado inferior ao reportado para as folhas de *Piper betle L.* nas variedades *Banarasi* ( $0,80 \pm 0,04\%$ ) e *Meetha* ( $0,78 \pm 0,02\%$ ), conforme descrito por Sarma et al. (2018). Esta diferença pode ser atribuída a fatores como a diversidade entre espécies.

**Perfil de ácidos gordos:** O perfil de ácidos gordos das FTS foi determinado por cromatografia gasosa, utilizando o perfil cromatográfico padrão - FAME Supelco (Figura 16). Foram identificados os seguintes ácidos gordos: ácido decanoico (C10:0), ácido undecanoico (C11:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido linoleico (C18:2n6c) e ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n3). Este perfil representa tanto os compostos saturados quanto os insaturados (monoinsaturados e polinsaturados) presentes na fração lipídica



**Figura 14.** Perfil cromatográfico padrão (FAME Supelco) de ácidos gordos por cromatografia gasosa

C6:0 (Ácido hexanoico), C8:0 (Ácido octanoico), C10:0 (Ácido decanoico), C11:0 (Ácido undecanoico), C12:0 (Ácido dodecanoico), C13:0 (Ácido tridecanoico), C14:0 (Ácido mirístico), C14:1 (Ácido mirístico insaturado), C15:0 (Ácido pentadecanoico), C15:1 (Ácido pentadecanoico insaturado), C16:0 (Ácido palmítico), C16:1 (Ácido palmitoleico), C17:0 (Ácido heptadecanoico), C17:1 (Ácido heptadecanoico insaturado), C18:0 (Ácido esteárico), C18:1n9t (Ácido elaídico), C18:1n9c (Ácido oleico), C18:2n6t (Ácido trans-linoleico), C18:2n6c (Ácido linoleico), C18:3n6 (Ácido gamalinolênico), C18:3n3 (Ácido alfa-linolênico), C20:0 (Ácido araquídico), C20:1 (Ácido eicosenoico), C20:2 (Ácido eicosadienoico), C21:0 (Ácido heneicosanoico), C20:3n6 (Ácido dihomo-gamma-linolênico), C20:4n6 (Ácido araquidônico), C20:3n3 (Ácido eicosatrienoico), C22:0 (Ácido behênico), C20:5n3 (Ácido eicosapentaenoico), C22:1 (Ácido erúxico), C22:2 (Ácido docosadienoico), C23:0 (Ácido tricosanoico), C24:0 (Ácido lignocérico), C22:6n3 (Ácido docosaheptaenoico)

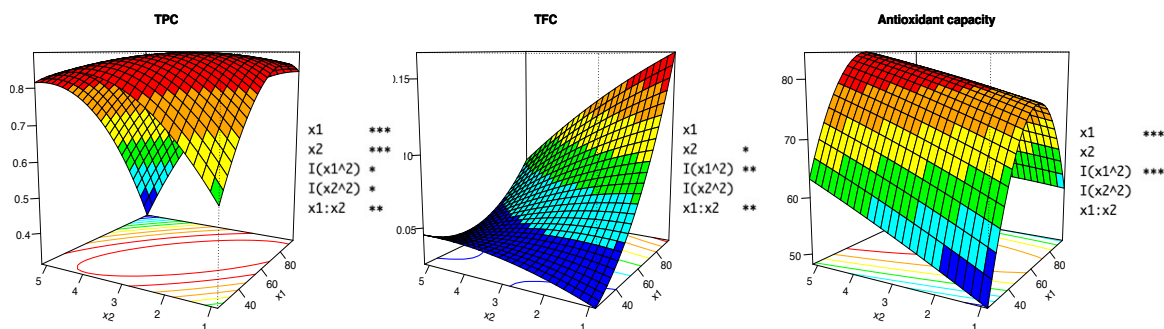
O ácido palmítico foi o componente predominante. Resultados semelhantes foram apresentados por Kumar et al. (2021) em folhas de manga, destacando a presença de ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9c), linoleico (C18:2n6c) e  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3), sugerindo que a composição lipídica, que caracteriza por uma combinação de ácidos saturados e insaturados, que pode contribuir para potenciais aplicações nas indústrias alimentar e nutracêutica.

**Índice de aterogênicidade e índice de trombogenicidade:** O valor calculado de IA foi de 1,86 indicando uma presença considerável de ácidos gordos saturados em relação aos insaturados. O valor calculado de IT foi de 0,7, o que sugere um potencial moderado para a formação de trombos (Menotti et al., 2024). A razão PUFA/SFA de 0,49 demonstra que os ácidos gordos polinsaturados estão em menor proporção do que os saturados, sendo que a baixa razão n-6/n-3 de 0,2, indica um perfil lipídico rico em ácidos gordos ómega-3, o que está associado a potenciais efeitos positivos anti-inflamatórios e cardiovasculares (Soares et al., 2023). No estudo de Usman et al. (2024), sobre as características físico-químicas e a composição de ácidos gordos de vegetais folhosos da Nigéria, foram analisadas cinco amostras, das quais a amostra *Solanum macrocarpon* apresentou valores próximos aos obtidos para as FTS, observando uma razão PUFA/SFA de 0,50 e uma razão n-6/n-3 de 1,22, valores idênticos aos encontrados no nosso estudo, isto é uma semelhança no perfil lipídico.

## 4.2. Otimização da extração de compostos fenólicos nas folhas secas

### 4.2.1. Resultados da metodologia de resposta por superfície

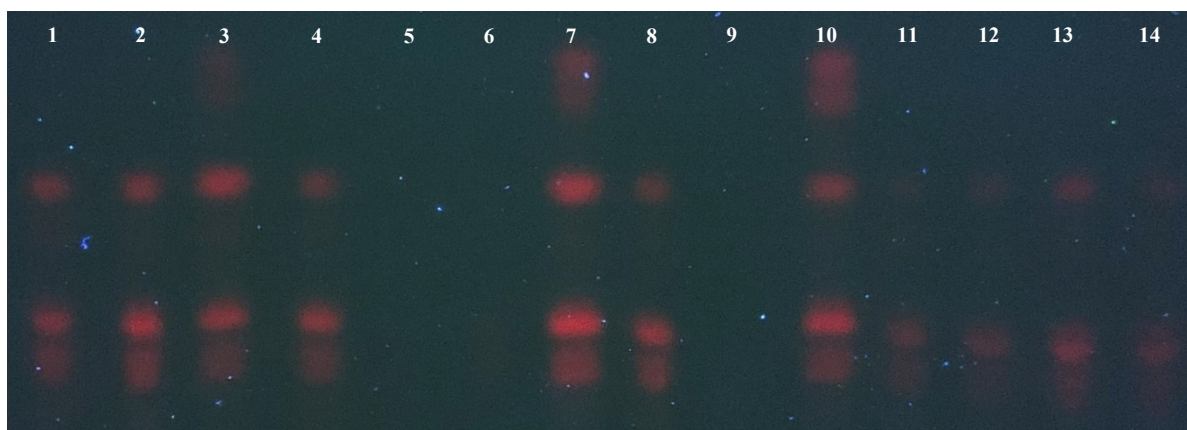
No estudo de otimização da extração de compostos fenólicos utilizando a metodologia de resposta por superfície (RSM) avaliou-se como respostas, a extração de compostos fenólicos totais, o teor de flavonoides totais e a atividade antioxidante usando o desenho experimental descrito na secção 3.1.4.1. A Figura 17 apresenta a representação 3D de cada uma destas respostas em função dos fatores em estudo (pH e % de etanol na solução extratora; variáveis independentes). O modelo RSM revelou que as variáveis independentes, representadas pelo teor de etanol (%) ( $X_1$ ), na faixa de 24,0 a 95,4, e pelo pH ( $X_2$ ), variando de 0,87 a 5,14, influenciaram os resultados.



**Figura 15.** Representação 3D dos resultados dos compostos fenólicos totais (TPC), compostos flavonoides totais (TFC) e atividade antioxidante (DPPH) para o desenho experimental RSM  $x_1$  = concentração de etanol (%) e  $x_2$  = pH. Na legenda lateral: termos do modelo RSM com indicação da sua significância: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Os níveis de significância das variáveis independentes do modelo apresentadas nas legendas de cada gráfico da Figura 17, inferiores a 0,05, sugerem que as relações identificadas são estatisticamente robustas e fiáveis. A solução hidroetanólica extratora ótima foi definida como a mistura de 60% de etanol e 40% de água desionizada, que correspondeu ao valor do ponto central do desenho experimental definido. Nestas condições, a solução extratora hidroetanólica ótima indica um elevado teor de TPC e de atividade antioxidante, bem como, um valor médio de fenóis totais. Os resultados obtidos confirmam a hipótese inicial de que, quer a percentagem de etanol quer o pH influenciaram significativamente a extração de compostos fenólicos totais e flavonoides, no entanto a atividade antioxidante apenas esteve dependente da % de etanol. A RSM permitiu visualizar a interação entre estas variáveis e identificar as condições ótimas para a obtenção dos melhores resultados.

**Cromatografia de camada fina:** Na Figura 18 podemos observar os resultados do TLC do extrato de folhas de tramazeira obtidos em cada ensaio do desenho experimental referido anteriormente (14 ensaios; secção 3.1.4.1.). A Figura permitiu a visualização dos grupos de compostos extraídos em diferentes condições de pH e % de etanol, verificando-se que os extratos apresentam variabilidade quer na intensidade das manchas quer no número de manchas presentes. A presença de múltiplas bandas com diferentes intensidades e posições indica a separação de compostos fenólicos e outras substâncias bioativas presentes no extrato. De referir, que a intensidade de uma mancha está relacionada com a concentração de compostos com propriedades semelhantes. No entanto, não se tem qualquer indicação de quais os compostos com maior impacto na análise de compostos fenólicos totais flavonoides e atividade antioxidante. De referir que, no ponto ótimo (ensaios 1, 2, 4, 8, 13 e 14), os compostos extraídos podem ser aqueles que influenciam mais as três respostas analisadas.



**Figura 16.** Análise de TLC de gel de sílica dos extratos obtidos em cada ensaio do desenho experimental (14 extratos hidroetanólicos). Na análise usou-se o eluente Tolueno – Acetato de etila – Ácido fórmico (60:30:5), visualizado a 365 nm

#### 4.2.2. Extrato das folhas secas nas condições ótimas

**Caraterização química:** Os parâmetros avaliados nas análises químicas do extrato hidroetanólico ótimo do extrato de folhas (ESF) incluem o teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides, capacidade antioxidante, avaliada pelo método DPPH, bem do poder redutor, utilizando dois métodos diferentes: FRAP e ferricianeto modificado (Mfec). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Teor de fenóis totais, flavonóides, atividade antioxidante DPPH, poder redutor FRAP e Mfec, no extrato de FTS

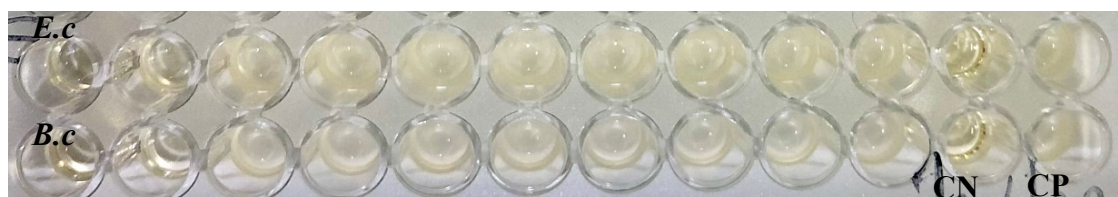
Amostra	Fenóis mg EAG/ g FTS	Flavonoides mg EQ/ g FTS	DPPH ETrolox/ g FTS	FRAP mg EAA/ g FTS	Mfec mg EAA/ g FTS
ESF	244,16±1,17	67,246±1,01	84,32±0,77	3,00±0,12	0,47±0,04

DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila; FRAP - Poder Antioxidante de Redução do Ferro; Mfec - ferricianeto modificado; EAG – equivalente ácido gálico; EQ – equivalente a Quercetina; ETrolox – equivalente a Trolox; EAA – equivalente ácido ascórbico; ESF - Extrato seco de folhas

A amostra de ESF revelou uma quantidade considerável de compostos fenólicos e flavonoides. As análises realizadas demonstraram que o extrato possui capacidade antioxidante, sendo eficaz tanto na eliminação de radicais livres, observada pelo método DPPH, quanto no seu poder redutor, indicado pelo ensaio FRAP e pelo método Mfec, demonstrando o potencial do extrato como uma fonte natural de antioxidantes, mostrando-se promissor para aplicações como aditivo alimentar funcional. Sarv et al. (2020) reportaram valores de DPPH entre 24,10 e 27,47g/g para extratos metanólicos de folhas de tramazeira.

Observou-se que o EFT apresentou atividade antioxidante consideravelmente superior. Essa diferença pode ser atribuída a fatores como a localização geográfica, época da colheita, técnicas de extração e padrão de referência utilizado.

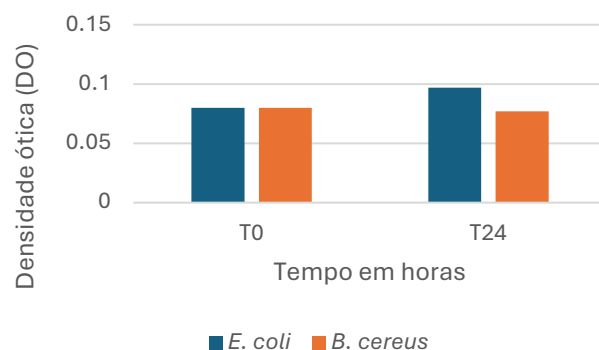
**Atividade antimicrobiana:** A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada conforme descrito na secção 3.1.4.2, em que foi avaliado o efeito do extrato seco das folhas de tramazeira contra as bactérias *Escherichia coli* (bactéria Gram negativa) e *Bacillus cereus* (bactéria Gram positiva). Na Figura 19 observa-se a microplaca utilizada nos ensaios, na qual a primeira linha corresponde ao ensaio com *E. coli* e a segunda, com *B. cereus*. Consta-se que o primeiro poço da linha referente ao *B. cereus* não apresentou turbidez visível, comportamento compatível com o controlo negativo, uma vez que a presença de turbidez indica crescimento microbiano. Esta observação está de acordo com os controlos utilizados (CN - controlo negativo e CP - controlo positivo) e foi confirmada pela leitura da densidade ótica num leitor de microplacas, que permitiu quantificar o efeito inibitório do extrato.



**Figura 17.** Microplaca do ensaio de atividade antimicrobiana do EFT contra *E. coli* (linha superior) e *B. cereus* (linha inferior). CN - Controle Negativo; CP – Controle Positivo

Os resultados obtidos a partir da leitura da densidade ótica revelaram comportamentos distintos entre os microrganismos testados (Figura 20). Verificou-se que *E. coli* apresentou um aumento da densidade ótica nesse período, indicando que o extrato não foi capaz de inibir o seu crescimento nas concentrações testadas. Em contraste, o crescimento de *Bacillus cereus* foi inibido, o que está em concordância como reportado por Motlhatlego et al. (2018), que relataram ação inibitória de extratos de folhas de *Newtonia spp.* contra *B.cereus*, evidenciando o potencial de extratos vegetais no controlo de microrganismos patogénicos Gram-positivos.

A inibição do crescimento de *B. cereus* pode ser explicada pelas diferenças estruturais das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, especialmente ao nível da membrana celular.



**Figura 18.** Gráfico de crescimento de *Escherichia Coli* e *Bacillus cereus* para avaliar a atividade antimicrobiana. T0 – tempo 0h; T24 – tempo 24h

Por ser Gram-positiva, *B. cereus* apresenta uma única membrana citoplasmática, envolvida por uma parede constituída por uma camada espessa de peptidoglicano, que confere rigidez à célula, com ácidos lipoteicoicos aderidos a essa camada. *E. coli*, por sua vez, é Gram-negativa e possui duas membranas lipídicas (citoplasmática e externa), com uma camada fina de peptidoglicanos entre elas, além de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa. Essa estrutura complexa atua como uma barreira seletiva, o que dificulta a ruptura da membrana (Tavares et al., 2020).

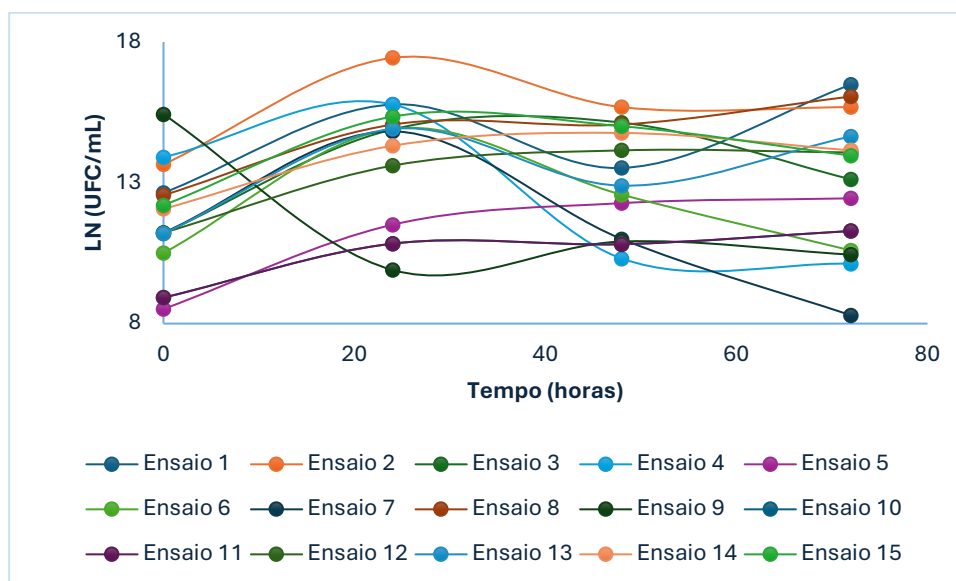
### 4.3. Fermentação das folhas de tramazeira

#### 4.3.1. Otimização das condições de fermentação

A otimização das condições de fermentação é importante para garantir a eficiência e a reprodutibilidade do processo. A Figura 21 sumária a cinética de crescimento da levedura (resposta) nos 15 ensaios definidos pelo desenho experimental, sendo as variáveis independentes: quantidade de inóculo, concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , teor de glicose e quantidade amostra.

Observa-se uma variabilidade considerável entre os ensaios, no que diz respeito ao efeito das diferentes combinações de parâmetros testados no crescimento da levedura.

Na tabela 8 apresentam-se os valores da taxa específica de crescimento microbiano ( $\mu\text{c}$ ) em três intervalos consecutivos de 24 horas, bem como respectivos tempos de duplicação celular (TD).



**Figura 19.** Fermentação conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentrações de inóculo e nutrientes, para os tempos 0, 24, 48 e 72 horas

Os resultados obtidos refletem a variação no desempenho da levedura em resposta às diferentes condições experimentais utilizadas.

Os ensaios 1, 8 e 15, efetuados nas mesmas condições experimentais (ponto central), apresentaram a mesma taxa de crescimento, o que demonstra a estabilidade e reprodutibilidade dos ensaios, reforçando a confiança nos dados obtidos e na adequação do modelo estatístico.

Observou-se que os ensaios com alta concentração de inóculo ( $10^7$  UFC/mL) (ensaios 9 e 4), apresentaram taxas de crescimento mais baixas e alcançaram a fase estacionária logo nas primeiras 24h após inoculação, sugerindo uma possível limitação de nutrientes devido à alta densidade celular inicial. Nestas condições, o crescimento  $\mu_c$  foi influenciado pelo teor de amostra, sendo o fator limitante o nitrato de amónio.

Os ensaios com concentrações elevadas de glicose (1,4 g), como os ensaios 6 e 14, apresentaram crescimento exponencial por um período mais prolongado, embora sem apresentar, necessariamente, uma taxa específica elevada. Nos ensaios 3, 7, 11 e 13 com inóculo mais baixo ( $10^5$  UFC/mL), baixa concentração de glicose e quantidade moderada de amostra, observou-se que a taxa específica de crescimento ( $\mu_c$ ) foi geralmente elevada (entre 0,13 e 0,15  $h^{-1}$ ), mesmo sob condições com baixa disponibilidade de nutrientes. O que sugere que, a combinação destes parâmetros pode ter minimizado efeitos inibitórios dos produtos resultantes dos metabolitos secundários da levedura aumentando a biodisponibilidade de nutrientes.

**Tabela 8.** Taxa específica de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*

Ensaio	Lag (h)	$\mu_c$ (h <sup>-1</sup> )	Tempo de duplicação (h)
1	0	0,13	5,30
2	0	0,16	4,39
3	0	0,15	4,51
4	0	0,08	8,88
5	0	0,12	5,55
6	0	0,18	3,77
7	0	0,15	4,61
8	0	0,10	6,63
9	0	0,04	3,00
10	0	0,10	8,67
11	0	0,13	2,99
12	0	0,08	6,97
13	0	0,15	4,47
14	0	0,09	7,41
15	0	0,13	5,28

Para avaliar a influência combinada das variáveis independentes sobre a taxa específica de crescimento da levedura, foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), utilizando um modelo quadrático com termos lineares (fatores individuais), quadráticos (quantidade de fatores) e interativos (fatores combinados). O modelo apresentou um  $R^2 = 0,968$ , explicando 96,8% da variabilidade observada na resposta. Os fatores mais significativos foram o inóculo ( $p = 0,003$ ), a amostra ( $p = 0,020$ ) e suas interações com o  $NH_4NO_3$ , bem como entre si. Além disso, os termos quadráticos correspondentes ao inóculo, à glicose e à amostra revelaram-se estatisticamente significativos indicando um comportamento não linear, em que valores muito elevados dessas variáveis podem comprometer o desempenho da levedura. Nesse contexto, o ensaio 3 destacou-se por apresentar uma das taxas específicas de crescimento mais elevadas, correspondendo a um tempo de duplicação de 4,51 horas, evidenciando a eficiência da levedura sob as condições testadas. Estes resultados estão de acordo com as observações de Walker e Stewart (2016), que salientam a importância da disponibilidade de nutrientes, como o  $NH_4NO_3$ , para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. A análise da RSM corrobora esta influência positiva, ao passo que níveis excessivos de inóculo e glicose indicaram possíveis efeitos inibitórios em concentrações elevadas.

#### 4.3.2. Análises ao produto fermentado nas condições ótimas

No seguimento do trabalho efetuou-se a fermentação de FTS nas condições ótimas

selecionadas. Para o produto fermentado (PF) foram realizadas análises microbiológicas, determinação do teor de gorduras, perfil de ácidos gordos, índice e aterogenicidade e índice de trombogenicidade.

O PF sofreu o processo de extração hidroetanólico otimizado definido na secção 3.1.4.1. O extrato seco obtido, definido como EFTF, foi submetido a análises químicas para avaliar a bioatividade e atividade citotóxica.

**Análises microbiológicas:** Na Tabela 9 apresentam-se os valores médios obtidos na fermentação otimizada para os tempos T0 e T72 horas. Estes resultados foram comparados com os obtidos para as folhas FTS apresentados na secção 4.1.2.

**Tabela 9.** Análise microbiológica das amostras de FTS e PF em diferentes tempos

Amostra	Bolores e leveduras (log UFC/mL)	Mesófilos totais (log UFC/mL)	Coliformes totais (log UFC/mL)	<i>E. coli</i> (log UFC/mL)	Clostrídios (log UFC/mL)
FTS	3,02±0,05 <sup>b</sup>	3,42±0,05 <sup>a</sup>	4,61±0,01	<10	<10
PF T0	3,77±0,01 <sup>a</sup>	3,55±0,08 <sup>a</sup>	<10	<10	<10
PF T72	2,92±0,04 <sup>b</sup>	2,58±0,007 <sup>b</sup>	<10	<10	<10

FTS – Folhas de tramazeira secas; PF – Produto fermentado; T0 – Tempo 0; T96 – Tempo 96; UFC – Unidade formadora de colónias. As letras junto aos valores (a-b) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores, determinadas pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ). Valores com letras diferentes são significativamente diferentes entre si

Com base nos resultados da análise de bolores e leveduras, a ANOVA apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p = 0,001$ ) verificando-se que a fermentação provocou inicialmente um aumento da contagem de bolores e leveduras (T0), o que era previsível uma vez que a fermentação foi conduzida por leveduras, seguido de uma redução significativa ao final de 72 horas (T72), aproximando-se dos valores iniciais das folhas de tramazeira secas, sugerindo que o processo fermentativo inibiu o crescimento destes microrganismos. Relativamente à contagem de microrganismos mesófilos totais verificam-se diferenças altamente significativas entre os grupos ( $p = 0,001$ ) e, de acordo com o teste de Tukey, a fermentação provocou uma redução significativa dos microrganismos mesófilos ao fim de 72 horas, indicando um possível efeito antimicrobiano da fermentação possivelmente associado à produção de ácidos e/ ou etanol, por *S. cerevisiae*.

Além disso, na amostra fermentada não foi detetada a presença de coliformes totais,

*E. coli*, bem como de esporos de clostrídios sulfito redutores em nenhuma. Este efeito corrobora os resultados obtidos por Santana Filho (2018), que demonstrou que, na fermentação de folhas de Tabaco, a contagem microbiana também diminuiu progressivamente. Desta forma, a fermentação pode constituir uma estratégia benéfica para melhorar a qualidade microbiológica das folhas, reduzindo microrganismos indesejáveis contribuindo para uma maior segurança e estabilidade do produto final.

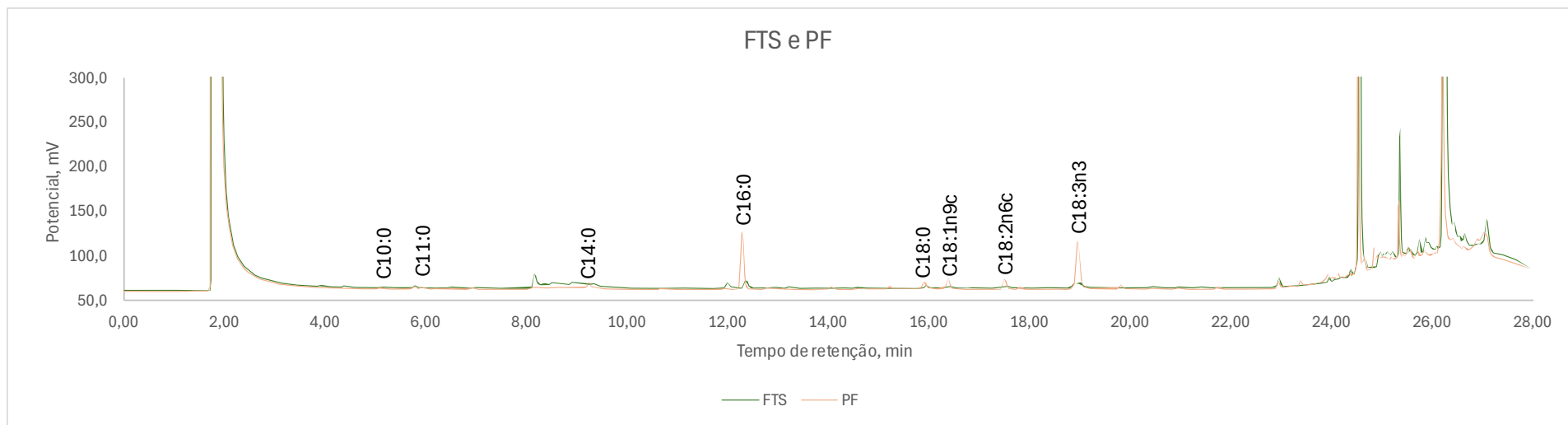
**Análise da gordura total:** O teor de gordura total na amostra do produto fermentado foi de  $0,35 \pm 0,02\%$ . Comparando com os valores obtidos nas amostras de folhas secas, apresentados na secção 4.1.3, constata-se que foram estatisticamente iguais ( $p = 0,866$ ).

**Perfil de ácidos gordos:** A Figura 22 sumaria a comparação entre a folhas de tramazeira (resultados apresentados na secção 4.1.2), e o produto fermentado.

Os principais ácidos gordos identificados nas amostras foram: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido linoleico (C18:2n6c) e ácido linolénico (C18:3n3). Constatou-se também quantidade moderada de ácido mirístico.

No produto fermentado, o ácido palmítico foi também o predominante, mas a concentração foi mais baixa do que a observada nas folhas. Observou-se um aumento na concentração de ácido linolénico, enquanto o teor de ácido esteárico diminuiu significativamente.

Apesar das variações observadas, a análise estatística indicou que as diferenças entre as concentrações individuais dos ácidos gordos do fermentado e das folhas não foram estatisticamente significativas, uma vez que os valores de  $p$  obtidos nas ANOVAs foram superiores a 0,05. Estes resultados sugerem que a fermentação não provocou alterações expressivas na composição lipídica das folhas, indicando que as variações detetadas podem ser provavelmente atribuíveis à variabilidade natural da amostra.



**Figura 20.** Comparação do perfil de ácidos gordos entre FTS e PF por cromatografia gasosa. FTS – Folhas de tramazeira secas; PF – Produto fermentado  
 C10:0 (ácido decanoico ou ácido caprílico); C11:0 (ácido undecanoico); C14:0 (ácido mirístico); C16:0 (ácido palmítico); C18:0 (ácido esteárico); C18:1n9c (ácido oleico); C18:2n6c (ácido linoleico); C18:3n3 (ácido alfa-linolênico – ALA)

**Índice de Aterogenicidade e Índice de Trombogenicidade:** foram calculados no produto fermentado e apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Índices de aterogenicidade e trombogenicidade, razão PUFA/SFA e razão n-6/n-3 do produto fermentado

Amostra	IA	IT	PUFA/SFA	n-6/n-3
Produto fermentado	1,53	0,52	0,67	0,21

IA – Índice de aterogenicidade; IT - Índice de trombogenicidade; PUFA - Ácidos gordos polinsaturados; SFA - Ácidos gordos saturados; n-6/n-3 - Relação entre ácidos gordos ómega-6 e ómega-3

Comparando os resultados da FTS, apresentados na secção 4.1.3, com os do produto fermentado, observa-se que a fermentação reduziu ligeiramente os índices de IA (1,53) e IT (0,70), sugerindo uma composição mais favorável para a saúde cardiovascular do consumidor fermentado. Além disso, a relação PUFA/SFA (ácidos gordos poli-insaturados/ácidos gordos saturados) aumentou de 0,49 para 0,67, indicando uma maior proporção de ácidos gordos poli-insaturados no produto fermentado. A razão n-6/n-3 foi praticamente idêntica nos dois produtos analisados (0,20 para FTS e 0,21 para PF). Importa destacar que os índices PUFA/SFA e n-6/n-3 obtidos estão dentro dos limites recomendados pela OMS (2003), isto é: acima de 0,45 e abaixo de 4,0, respetivamente.

#### 4.3.3. Extrato do produto fermentado

**Análises químicas:** A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para o extrato fermentado nos diferentes tempos (T0 e T72), possibilitando uma comparação com os dados do ESF apresentados anteriormente na secção 4.2.2 (Tabela 7). São analisados o teor de fenóis totais, flavonoides, capacidade antioxidante pelo método DPPH e o poder redutor equivalente em ácido ascórbico (Mfec).

Os dados demonstram uma variação nos parâmetros analisados entre as amostras EFT, EFTF T0 e EFTF T72. Observa-se um aumento nos teores de fenóis, flavonoides e na capacidade antioxidante (DPPH, FRAP e MFEC) ao longo do tempo. A amostra EFTF T72 apresentou os maiores valores para todos os parâmetros, indicando um aumento significativo na concentração de compostos bioativos. A atividade antioxidante também aumentou, evidenciada pelo aumento do DPPH, FRAP e Mfec. O teor deste último triplicou. Estes resultados indicam que a fermentação favoreceu a libertação e/ou modificação química de compostos bioativos, o que pode ter implicações positivas para aplicações funcionais e

nutricionais.

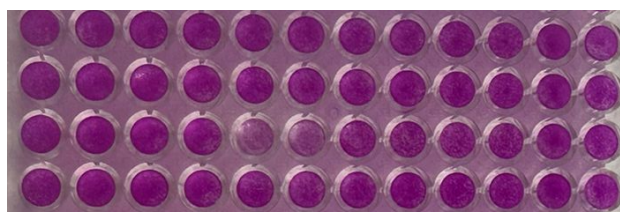
**Tabela 11.** Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante DPPH, FRAP e poder redutor (g/de folhas secas)

Amostra	Fenóis mg eq. AG	Flavonoides mg eq. Q	DPPH mg eq. Trolox	FRAP mg eq. Ác. ascórbico	Mfec, mg eq. Ác. ascórbico/g
EFT	244,16±1,17 <sup>b</sup>	67,246±1,01 <sup>c</sup>	84,32±0,77 <sup>c</sup>	3,00±0,12 <sup>c</sup>	0,47±0,04 <sup>c</sup>
EFTF T0	343,79±4,40 <sup>b</sup>	79,43±0,79 <sup>b</sup>	146,13± 1,61 <sup>b</sup>	3,76±0,24 <sup>b</sup>	0,75± 0,04 <sup>b</sup>
EFTF T72	844,17±1,27 <sup>a</sup>	198,75±2,23 <sup>a</sup>	351,10±4,03 <sup>a</sup>	8,83±0,23 <sup>a</sup>	1,74±0,01 <sup>a</sup>

EFT – extrato de folhas de tramazeira; EFTF - extrato de folhas de tramazeira fermentado; DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila; FRAP - Poder Antioxidante de Redução do Ferro; Mfec - ferricianeto modificado; eq - equivalente; AG – Ácido gálico; Q – Quercetina; Ác – Ácido. As letras junto aos valores (a-c) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores, determinadas pelo teste ANOVA (p<0,05). Valores com letras diferentes são significativamente diferentes entre si

Freitas (2021), avaliou folhas de videira fermentadas, os valores observados foram inferiores, com fenóis totais de  $32,32 \pm 3,64$  mg eq. ácido gálico/g, flavonoides totais de  $17,41 \pm 26,79$  mg eq. quercetina/g e capacidade antioxidante medida pelo método DPPH de  $37,65 \pm 2,18$  mg eq. Trolox/g, indicando uma capacidade de eliminação de radicais livres relativamente baixa. O método FRAP revelou um valor de  $79,34 \pm 6,74$  mg eq. Fe (II)/g, sugerindo um potencial antioxidante moderado comparativamente com as folhas de tramazeira. De acordo com Ivanović et al. (2022), os extratos metanólico e etanólico de *Achillea millefolium* apresentaram fenóis entre 27,69–28,92 mg GA/g e FRAP entre 22,44–22,50 mg Fe<sup>2+</sup>/g. Em comparação, valores iniciais do extrato de folhas de tramazeira (EFT) foi mais reduzido. No entanto, a fermentação em T72 aumentou significativamente esses valores (fenóis: 844,17 mg eq. AG/g; FRAP: 8,83 mg eq. ácido ascórbico/g), evidenciando a intensificação dos compostos bioativos. Ziemelewska et al. (2021), avaliou o efeito do tempo de fermentação no conteúdo de compostos bioativos com propriedades cosméticas e dermatológicas de extratos de Kombucha de *Ilex paraguariensis*, demonstrou que a fermentação aumentou significativamente o teor de compostos bioativos, incluindo ácidos fenólicos, xantinas e flavonoides. Além disso, os extratos fermentados apresentaram maior atividade antioxidante e propriedades benéficas para a pele, como inibição de enzimas degradativas e aumento da hidratação. Estas observações reforçam que o processo fermentativo pode potencializar a liberação de compostos fenólicos e melhorar sua bioatividade, o que está em concordância com os resultados obtidos no produto fermentado das folhas de tramazeira.

**Citotoxicidade:** Os ensaios realizados para avaliar a citotoxicidade dos extratos de folhas de tramazeira e do extrato de folhas fermentadas, demonstram que o valor de  $GI_{50}$  (concentração do extrato necessária para inibir 50% do crescimento celular), para os extratos de folhas de tramazeira e de tramazeira fermentada foi superior a 400  $\mu\text{g/mL}$ , indicando que, até a concentração máxima testada (400 $\mu\text{g/mL}$ ), não ocorreu inibição da proliferação celular, sugerindo que os extratos parecem não demonstrar citotoxicidade para as células testadas. Na Figura 23 pode-se observar a cor rosada, nos poços da microplaca, em todas as concentrações testadas, indicando viabilidade celular.



**Figura 21.** Ensaio utilizando a linha celular Caco-2, extratos de folhas de tramazeira e extrato de folhas de tramazeira fermentadas

Estes resultados contrastam com os de Esghaei et al. (2018), que relataram citotoxicidade celular do extrato hidroetanólico de *Camellia sinensis* em concentrações superiores a 400 $\mu\text{g/mL}$ . O mesmo foi observado por de Reda et al. (2017) em extratos aquosos de folhas de *Moringa oleifera*, estes reportam citotoxicidade em células da linhagem Caco-2, com  $IC_{50}$  entre 200 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Estas diferenças podem estar relacionadas às diferentes composições químicas dos extratos, refletindo a variabilidade nos compostos bioativos, às suas potenciais atividades citotóxicas, bem como às concentrações testadas.

## 4.4. Caracterização do pão

### 4.4.1. Análises microbiológicas

A análise microbiológica do pão é essencial para avaliar a sua qualidade e segurança ao longo do tempo de armazenamento. Os resultados presentes na Tabela 12 indicam que bolores e leveduras começaram a ser detetados a partir de T48 ( $0,17 \pm 0,21$  log UFC/g), com ligeiro aumento até T96 ( $0,47 \pm 0,21$  log UFC/g). No entanto, nas amostras contendo extrato de folhas de tramazeira fermentada (PEFT 0,5% e PEFT 2,0%), não se verificou crescimento destes microrganismos em nenhum dos tempos analisados, sugerindo um possível efeito fungicida do extrato.

A análise estatística dos resultados de mesófilos totais, indicam que a amostra controle apresentou uma contagem significativamente superior de microrganismos mesófilos ao longo do tempo, enquanto nas amostras com extrato de tramazeira fermentada a contagem foi mais baixa mantendo-se constante ao longo do armazenamento, indicando um possível efeito inibitório no crescimento destes microrganismos. Camboa (2019) também constatou a presença de mesófilos totais em pães, relatando valores de  $\leq 10^2$  UFC/g.

Em relação aos coliformes totais, *E. coli*, esporos de clostrídios sulfito redutores, *B. cereus*, *S. aureus* coagulase positiva e *Salmonella spp*, não foram detetados (dentro do limite de detecção do método utilizado) em nenhuma das amostras analisadas. Isso indica que, tanto o processo de fabrico, quanto os ingredientes utilizados garantiram boas condições de higiene e segurança.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a adição de extrato de folhas de tramazeira fermentado (0,5% e 2,0%), exerce um efeito inibitório na multiplicação de bolores e leveduras e de aeróbios mesófilos. Esse efeito pode ser atribuído à presença de compostos bioativos no extrato, como fenóis e flavonoides, conhecidos por suas propriedades antimicrobianas.

Conforme referido por Vermelho et al. (2024), os ingredientes do pão podem favorecer a proliferação de microrganismos durante as etapas de preparação, processamento, embalagem e armazenamento. Após o cozimento, a carga microbiana é reduzida, sobrevivendo principalmente microrganismos formadores de esporos, como algumas bactérias e fungos resistentes ao calor. Segundo Eliseeva et al. (2021), as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em pães enriquecidos com quinoa variaram entre 25 e 60 UFC/g, enquanto os bolores foram detetados em teores que oscilaram entre de 20 a 48 UFC/g, Comparativamente, no presente estudo, as contagens de mesófilos foram significativamente menores, variando entre 1,10 e 1,26 log UFC/g ( $\approx 12,6-18$  UFC/g), e mantiveram-se estáveis ao longo do tempo. Além disso, não houve crescimento de bolores nas amostras com extrato fermentado, contrastando com os valores mais elevados observados no estudo com quinoa. No nosso estudo *B. cereus* estavam ausentes no pão controle e no pão adicionado o extrato de folhas de tramazeira fermentadas, no entanto os autores referidos anteriormente no pão com extrato de quinoa, observaram contagens de *Bacillus spp.* que variaram de 20 a 60 UFC/g.

**Tabela 12.** Análise microbiológica do pão: controlo, pão com 0,5% de extrato de folhas fermentadas de tramazeira e pão com 2,0% de extrato de folhas fermentadas de tramazeira

<b>Amostra</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>Bolores e leveduras (log UFC/g)</b>	<b>Mesófilos totais (log UFC/g)</b>	<b>Coliformes totais (log UFC/g)</b>	<b><i>E. coli</i> (log UFC/g)</b>	<b>Clostrídios (log UFC/g)</b>	<b><i>B. cereus</i> (log UFC/g)</b>	<b><i>S. aureus</i> coagulase positiva</b>	<b><i>Salmonella</i></b>
<b>PC</b>	<b>T0</b>	<10	3,26 ± 0,08 <sup>b</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
	<b>T48</b>	0,17 ± 0,21	3,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
	<b>T96</b>	0,47 ± 0,21	3,77 ± 0,01 <sup>a</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
<b>P0,5%</b>	<b>T0</b>	<10	3,10 ± 0,10 <sup>b</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
	<b>T48</b>	0	3,10 ± 0,14 <sup>b</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
	<b>T 96</b>	0	3,16 ± 0,02 <sup>b</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
<b>P2,0%</b>	<b>T0</b>	0	3,16 ± 0,02 <sup>b</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
	<b>T48</b>	0	3,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente
	<b>T96</b>	0	3,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	Ausente

PC – Pão controlo; P0,5% – Pão com 0,5% de extrato de folhas fermentadas de tramazeira; P2,0% – Pão com 2% de extrato de folhas fermentadas de tramazeira; UFC – Unidades formadoras de colónias. As letras junto aos valores (a-b) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores, determinadas por ANOVA. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes entre si (p < 0,05)

#### 4.4.2. Análises químicas

Os resultados das análises químicas das amostras de pão estão apresentados na Tabela 13. Verificou-se um aumento de pH de todas as amostras analisadas ao longo do armazenamento. O pão controle apresentou um aumento de pH de 5,84 para 5,99, enquanto as amostras com PEFT (0,5 e 2%) variaram de 5,97 para 6,02 e de 6,03 para 5,98, respectivamente. Em comparação, pães funcionais contendo farinha de polpa de tomate (TPF) apresentaram valores de pH entre 5,4 e 6,2 (Brighina et al., 2024). A humidade do pão controle aumentou de 34,07% para 38,38%, enquanto as amostras com PEFT mostraram variações menores, indicando maior retenção de humidade, possivelmente devido aos compostos bioativos do extrato. O teor de cinzas também variou entre as amostras ao longo do tempo de armazenamento. A amostra controle apresentou uma redução, enquanto as amostras com extrato fermentado de tramazeira evidenciaram variações: um aumento de 1,11% para 1,75% em PEFT 0,5% e uma redução de 1,64% para 1,52% em PEFT 2,0%. Cacak-Pietrzak et al. (2019) observou um aumento no teor de cinzas com a adição de *Cistus incanus* L., alcançando valores máximos de 1,10% no pão suplementado com de 5% do extrato. Os teores de proteína permaneceram relativamente estáveis em todas as amostras ao longo do tempo, com uma ligeira redução nas amostras controle e nas amostras com 0,5% e 2,0% de extrato em T0 e T96.

O teor de gordura também apresentou uma pequena redução ao longo do tempo em todas as amostras analisadas. Seixas (2022) avaliou a incorporação de bagas de sabugueiro fermentadas no pão, tendo obtidos teores de proteína inferiores (entre 7,93% e 8,44%) aos valores observados no presente estudo (entre 8,34% e 9,81%). Adicionalmente, a adição de PEFT 2,0% resultou na maior estabilidade proteica, com uma redução mínima às 96 horas (9,81% para 9,72%), enquanto nas formulações de Seixas (2022) os teores de proteína apresentaram maior variação ao longo do tempo de armazenamento. Em relação ao teor de gordura, os pães enriquecidos com EFTF apresentaram valores ligeiramente superiores. No entanto, ambos os estudos indicam teores abaixo da recomendação da APN (2016), que estabelece um limite de 3 g de gordura por 100 g de pão. Esses valores podem ser justificados pela ausência de fontes adicionais de gordura, como azeite, óleo ou manteiga, na formulação do pão.

**Tabela 13.** Resultados da caracterização nutricional dos pães

<b>Amostra</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>Humidade (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Gordura (%)</b>	<b>HDC (g/100g)</b>	<b>VE (Kcal/100g)</b>
<b>PC</b>	<b>T0</b>	5,84±0,01 <sup>b</sup>	34,07±0,33 <sup>b</sup>	1,73±0,02 <sup>a</sup>	8,84±0,33 <sup>ab</sup>	0,43±0,03 <sup>ab</sup>	54,92 <sup>a</sup>	260,34 <sup>a</sup>
	<b>T96</b>	5,99±0,01 <sup>a</sup>	38,38±0,18 <sup>a</sup>	1,64±0,00 <sup>a</sup>	8,34±0,46 <sup>b</sup>	0,39±0,01 <sup>ab</sup>	51,61 <sup>b</sup>	243,17 <sup>c</sup>
<b>P0,5%</b>	<b>T0</b>	5,97±0,02 <sup>a</sup>	37,91±0,72 <sup>a</sup>	1,11±0,90 <sup>a</sup>	9,25±0,37 <sup>ab</sup>	0,48±0,04 <sup>a</sup>	50,61 <sup>b</sup>	245,35 <sup>bc</sup>
	<b>T 96</b>	6,02±0,06 <sup>a</sup>	37,89±0,50 <sup>a</sup>	1,75±0,01 <sup>a</sup>	8,80±0,19 <sup>ab</sup>	0,41±0,03 <sup>ab</sup>	51,15 <sup>b</sup>	245,08 <sup>bc</sup>
<b>P2,0%</b>	<b>T0</b>	6,03±0,01 <sup>a</sup>	36,47±0,01 <sup>a</sup>	1,64±0,27 <sup>a</sup>	9,81±0,12 <sup>a</sup>	0,36±0,03 <sup>ab</sup>	51,91 <sup>b</sup>	251,28 <sup>b</sup>
	<b>T96</b>	5,98±0,01 <sup>a</sup>	36,93±0,22 <sup>a</sup>	1,52±0,47 <sup>a</sup>	9,72±0,25 <sup>a</sup>	0,34±0,03 <sup>b</sup>	51,16 <sup>b</sup>	247,70 <sup>bc</sup>

PC – Pão controlo; PEFT- Pão com 0,5% de extrato de folhas de tramazeira fermentadas; Pão com 2,0% de folhas de tramazeira fermentadas; T0 – Tempo 0; T96 – Tempo 96; HDC - Hidratos de carbono; VE – Valor energético. As letras junto aos valores (a-c) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores, determinadas pelo teste deANOVA. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes entre si (p < 0,05)

As amostras de pão com extrato fermentado de folhas de tramazeira apresentaram variações nos hidratos de carbono e no valor energético ao longo do tempo. Para a amostra PEFT 0,5%, os hidratos de carbono aumentaram de 50,61 g/100 g para 51,15 g/100 g, enquanto o valor energético sofreu uma leve redução, de 245,35 Kcal/100 g para 245,08 Kcal/100 g. Na amostra PEFT 2,0%, houve uma ligeira diminuição nos hidratos de carbono, de 51,91 g/100 g para 51,16 g/100 g, e no valor energético, de 251,28 Kcal/100 g para 247,70 Kcal/100 g.

Comparativamente, Takwa, et al. (2018), que avaliou a adição de extratos de folhas de *Ocimum basilicum* (manjeriço) no pão, demonstrou um aumento nos hidratos de carbono (de 57 g/100 g para 59 g/100 g) e no valor energético (274 Kcal/100 g para 285 Kcal/100 g), da amostra após 7 dias de armazenamento. Essa diferença pode estar relacionada formulação utilizada em cada estudo, desta forma, fatores como os ingredientes básicos, o tipo e a concentração de aditivos naturais ou sintéticos, bem como diferenças nos métodos de preparo, podem justificar as variações observadas.

A análise estatística dos nossos resultados indica que apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as do T0 do controlo e as restantes amostras para os parâmetros: pH, HDC e VE.

#### **4.4.4. Análise de gordura e perfil de ácidos gordos:**

Os cromatogramas da análise por cromatografia gasosa, estão representados na Figura 24. Os principais ácidos gordos identificados nas amostras foram C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico), C18:1n9c (ácido oleico), C18:2n6c (ácido linoleico) e C18:3n3 (ácido linolénico).

Da comparação do perfil de ácidos gordos do pão com e sem extrato fermentado, com base nas análises realizadas no tempo zero (T0), observou-se que:

- O pão controlo apresentou C18:2n6c como o ácido gordo predominante, seguido por C16:0;
- As amostras P0,5 e P2,0 de extrato apresentaram perfis distintos, com a maior presença de C18:2n6c;
- Na amostra P2,0 T0, observou-se um aumento de C16:1 e C17:1 em comparação ao pão controlo.

Os resultados obtidos das análises após 96 horas (T96) mostraram que:

- O pão controlo sofreu uma alteração considerável no seu perfil lipídico,

com um aumento expressivo de C16:0 (51,48%) e uma redução de C18:2n6c (19,64%);

- Nas amostras de pão com extrato, observou-se um decréscimo de C16:0 (36,35% em P0,5 e 28,22% em P2,0 T96) e um aumento de C18:2n6c (38,86% e 48,34%, respetivamente).

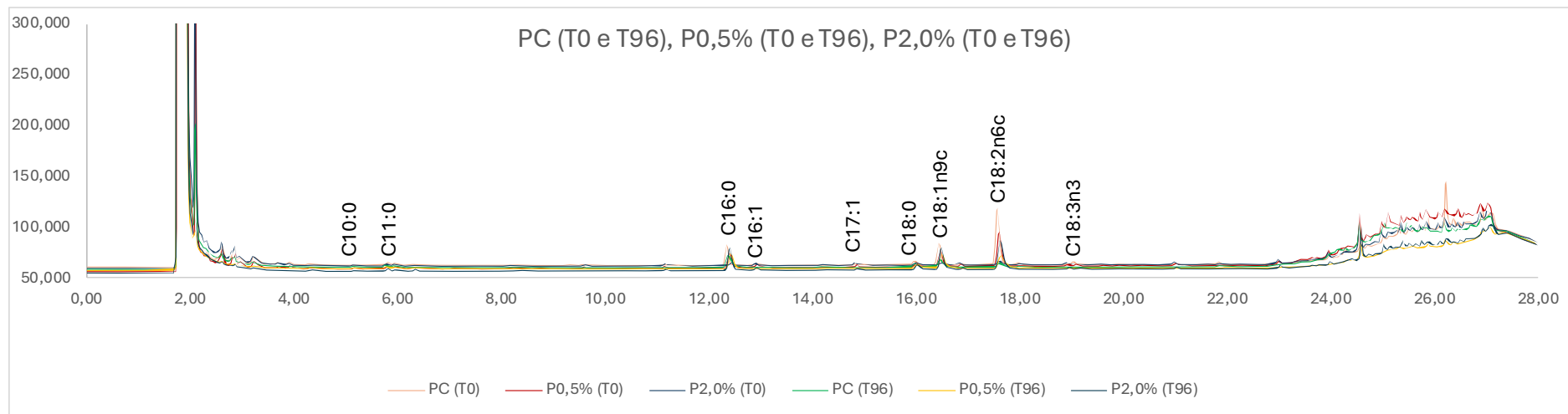
Globalmente, verificou-se que a fermentação influenciou o perfil lipídico do pão, com um aumento da fração saturada no pão sem extrato (PC) e uma maior preservação dos ácidos gordos insaturados nas amostras com extrato fermentado (P0,5 e P2,0). A presença do extrato fermentado parece estar associada à manutenção de ácidos gordos essenciais, como C18:2n6c, possivelmente devido às suas propriedades antioxidantes.

A Tabela 14 apresenta a média e o desvio padrão dos ácidos gordos identificados nos pães, com e sem extrato fermentado, avaliados nos tempos T0 e T96. As diferenças estatísticas entre as formulações são indicadas por letras distintas na mesma coluna ( $p < 0,05$ ). Verifica-se que, ao longo do tempo, ocorreram mudanças nos teores de ácidos gordos, com destaque para uma melhor preservação dos ácidos insaturados nas amostras enriquecidas com extrato fermentado.

A análise estatística por ANOVA de 2 fatores permitiu verificar que não houve diferenças significativas nos extratos obtidos (FT e PF) para o perfil de ácidos gordos obtidos. Este resultado justifica-se pela elevada variabilidade encontrada nas repetições das análises cromatográficas, mostrando que as réplicas dos extratos estão dependentes da amostra usada indicativo que as amostras apresentam grande variabilidade.

A mesma situação foi observada na análise do perfil de ácidos gordos obtido nas réplicas efetuadas. Nos diferentes ensaios a variabilidade foi elevada que se justificou pela variabilidade da amostra e do processo extrativo/derivativo de preparação dos ácidos gordos metilados. No global verificou-se que não foi possível tirar conclusões do efeito dos extratos no perfil dos ácidos gordos, quer para o ensaio FT versus PF, quer para o ensaio do pão com e sem extrato (controlo, com 0,5% ou 2,0% de EFTF) nos dois tempos de armazenagem (0 e 96 horas).

**Índice de aterogenicidade e Índice de trombogenicidade:** Na Tabela 15 observa-se uma alteração nos índices de aterogenicidade e trombogenicidade ao longo do tempo. O IA foi menor no T0 para o pão controle (1,13) e aumentou para 6,16 após 96 horas, sugerindo uma alteração na composição lipídica, com possível degradação dos ácidos gordos insaturados e maior proporção de saturados.



**Figura 22.** Perfil de ácidos gordos ao longo do tempo: comparação entre PC, P0,5% e P2,0% em T0 e T96.

C10:0 (ácido decanoico ou ácido caprílico); C11:0 (ácido undecanoico); C16:0 (ácido palmítico); C16:1 (Ácido palmitoleico); C17:1 (Ácido heptadecanóico insaturado); C18:0 (ácido esteárico); C18:1n9c (ácido oleico); C18:2n6c (ácido linoleico); C18:3n3 (ácido alfa-linolénico – ALA). As letras (a-e) junto aos valores indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores ( $p < 0,05$ ), determinadas por ANOVA.

**Tabela 14.** Composição de ácidos gordos em folhas de tramazeira e produtos fermentado (FTS e PF) e pães com diferentes percentuais de extrato fermentado em T0 e T96

Amostras	C10:0	C11:0	C14:0	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	
<b>Análise das folhas sem e com fermentação</b>											
<b>FTS</b>	1,01±0,56 <sup>a</sup>	1,0±0,77 <sup>a</sup>	3,72±4,12 <sup>a</sup>	49,67±9,92 <sup>a</sup>	nd	nd	9,92±1,81 <sup>a</sup>	2,81±0,72 <sup>a</sup>	5,22±0,85 <sup>a</sup>	26,65±15,62 <sup>a</sup>	
<b>PF</b>	1,04±0,47 <sup>a</sup>	1,05±0,40 <sup>a</sup>	4,33±0,85 <sup>a</sup>	46,76±6,60 <sup>a</sup>	nd	nd	4,90±0,33 <sup>a</sup>	2,71±0,90 <sup>a</sup>	6,70±0,47 <sup>a</sup>	32,50±6,62 <sup>a</sup>	
<b>Análise do pão com e sem extrato das folhas fermentadas</b>											
<b>PC</b>	<b>T0</b>	0,62±0,42 <sup>a</sup>	1,04±0,15 <sup>a</sup>	nd	20,67±0,25 <sup>d</sup>	1,51±0,26 <sup>b</sup>	nd	3,87±0,16 <sup>a</sup>	11,32±0,21 <sup>ab</sup>	58,80±0,09 <sup>a</sup>	2,77±0,09 <sup>a</sup>
	<b>T96</b>	1,57±0,55 <sup>a</sup>	4,02±0,63 <sup>a</sup>	nd	51,47±2,32 <sup>a</sup>	nd	nd	9,48±0,16 <sup>a</sup>	13,79±1,04 <sup>ab</sup>	19,63±2,62 <sup>b</sup>	nd
<b>P0,5%</b>	<b>T0</b>	3,52±2,88 <sup>a</sup>	5,76±4,88 <sup>a</sup>	nd	20,52±3,08 <sup>d</sup>	11,02±11,32 <sup>ab</sup>	nd	4,96±0,18 <sup>a</sup>	9,67±2,07 <sup>b</sup>	38,38±20,46 <sup>ab</sup>	6,14±6,70 <sup>a</sup>
	<b>T 96</b>	1,17±0,59 <sup>a</sup>	1,82±0,37 <sup>a</sup>	nd	36,35±0,22 <sup>b</sup>	nd	nd	6,59±0,53 <sup>a</sup>	15,19±0,95 <sup>a</sup>	38,85±0,33 <sup>ab</sup>	nd
<b>P2,0%</b>	<b>T0</b>	3,96±0,28 <sup>a</sup>	5,86±1,19 <sup>a</sup>	nd	17,25±1,63 <sup>d</sup>	25,59±8,37 <sup>a</sup>	7,24±0,47	12,53±5,66 <sup>a</sup>	1,31±1,14 <sup>c</sup>	23,79±2,15 <sup>b</sup>	nd
	<b>T96</b>	1,11±0,11 <sup>a</sup>	2,63±0,74 <sup>a</sup>	nd	28,21±1,94 <sup>c</sup>	nd	nd	6,83±0,09 <sup>a</sup>	12,84±0,42 <sup>ab</sup>	48,34±1,41 <sup>ab</sup>	nd

FT – Folhas de tramazeira “*in natura*”; PF – Produto fermentado; T0 – Tempo 0 horas; T96 – Tempo 96 horas; nd – não detetado; Ácido cáprico (C10:0), Ácido undecanóico (C11:0), Ácido misrístico (C14:0), Ácido palmítico (C16:0), Ácido palmitoleico (C16:1), Ácido heptadecenoico (C17:1), Ácido esteárico (C18:0), Ácido oleico (C18:1n9c), Ácido linoleico ômega-6 (C18:2n6c), Ácido alfa-linolênico ômega-3 (C18:3n3), As letras junto aos valores (a-c) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores, determinadas por ANOVA. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

Já para o pão enriquecido com 2,0% de extrato fermentado, o IA diminuiu ao longo do tempo (2,75 para 1,84), indicando um efeito positivo da incorporação do extrato na manutenção do perfil lipídico.

**Tabela 15.** Índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT), Razão PUFA/SFA e Razão n-6/n-3 em amostras de extrato e pães com diferentes concentrações e tempos de armazenamento

Amostra		IA	IT	PUFA/SFA	n-6/n-3
PC	T0	1,13	0,38	2,51	21,23
	T96	6,16	3,44	0,32	-
P0,5%	T0	1,51	0,52	1,75	6,25
	T96	2,69	1,53	0,90	-
P2,0%	T0	2,75	2,20	0,80	-
	T96	1,84	1,11	1,38	-

IA – Índice de aterogenicidade; IT - Índice de trombogenicidade; PUFA - Ácidos gordos polinsaturados; SFA - Ácidos gordos saturados; n-6/n-3 - Relação entre ácidos gordos ômega-6 e ômega-3; PC – Pão controle; P0,5% - Pão com 0,5% de extrato fermentado de folhas de tramazeira; Pão com 2,0% de extrato fermentado de folhas de tramazeira; T0 – Tempo 0h; T96 – Tempo 96h.

O IT também aumentou no pão controle ao longo do tempo (0,38 para 3,44), evidenciando um aumento da fração de ácidos gordos saturados. No entanto, nos pães com extrato fermentado, esse aumento foi menos expressivo, e no caso da formulação com 2,0%, houve uma redução de 2,20 para 1,11, sugerindo uma melhor estabilidade dos ácidos gordos com a adição do extrato.

A razão PUFA/SFA diminuiu no pão controle (2,51 para 0,32 em 96 horas), reforçando a perda de ácidos gordos poli-insaturados ao longo do tempo. No entanto, nos pães com extrato, essa redução foi menos drástica, e na formulação com 2,0% de extrato fermentado, houve até um aumento ao longo do tempo (0,80 para 1,38), o que pode indicar um efeito protetor contra a degradação lipídica.

A razão n-6/n-3 foi muito alta no pão controle no tempo 0 (21,23), mas não pôde ser calculada após 96 horas, possivelmente devido à degradação dos ácidos gordos n-3. Nos pães enriquecidos com extrato fermentado, essa razão não pôde ser determinada na maioria das amostras, indicando variações na composição dos ácidos gordos essenciais. Essas variações sugerem modificações no perfil lipídico durante o armazenamento, provavelmente devido à oxidação dos ácidos gordos insaturados, que são mais suscetíveis à degradação. A oxidação lipídica pode afetar significativamente os efeitos dos ácidos gordos na saúde, reduzindo os benefícios dos ácidos n-3 e n-6. O estado de oxidação

desses ácidos geralmente não é relatado em estudos nutricionais, o que pode levar a diferenças nos resultados obtidos (Cao et al., 2024).

#### **4.4.5. Análise de cor**

A avaliação da cor da crosta e miolo do pão preparado revelou diferenças significativas nos parâmetros de luminosidade (L), cromaticidade (a, b, c) e tonalidade (h), dependendo quer da formulação utilizada quer do tempo de armazenamento (Tabela 16).

##### **4.4.5.1. Crosta do pão**

A análise desses parâmetros fornece informações sobre os efeitos da composição e do tempo na aparência da crosta do pão, contribuindo para a compreensão dos fatores que influenciam a qualidade visual do produto:

**Luminosidade (L):** A análise do parâmetro L indicou que a luminosidade da crosta do pão diminuiu significativamente ao longo de 96 horas de armazenamento, o que pode estar associado a processos oxidativos e à degradação de compostos responsáveis pela cor. A amostra controle (PC) apresentou a maior luminosidade, enquanto os ensaios com adição de extrato (P0,5% e P2,0%) evidenciaram valores de L inferiores, o que sugere que a composição das formulações influenciou diretamente a cor da crosta. A interação entre os fatores "Ensaio" e "Tempo" não foi estatisticamente significativa, embora a tendência de redução da luminosidade ao longo do tempo tenha sido observada em todas as amostras.

**Cromaticidade – Parâmetros “a”, “b” e “c”:** O parâmetro "a" revela que a crosta do pão controle apresentou maior tonalidade avermelhada em comparação com as formulações P0,5% e P2,0%, o que reflete uma diferença nas reações de Maillard ou na presença de compostos coloridos nas diferentes formulações. A estabilidade da cor foi semelhante entre os tempos T0 e T96 para todas as amostras, indicando que o tempo de armazenamento não teve um impacto significativo na coloração vermelha da crosta. A interação entre "Ensaio" e "Tempo" foi significativa, sugerindo que a formulação do pão pode afetar a estabilidade da cor da crosta durante o armazenamento. No parâmetro "b", que está relacionado à tonalidade amarela, a amostra P0,5% apresentou os valores mais baixos, indicando uma coloração mais pálida, enquanto as amostras PC e P2,0% mantiveram valores mais elevados e estáveis. Observou-se uma ligeira redução nos valores de "b" ao longo do tempo, mas não foi estatisticamente significativa.

**Tabela 16.** Análise da cor das amostras de pão (crosta e miolo) nos tempos T0 e T96

Amostra		L*	a*	b*	C*	h(C)*
<b>CROSTA</b>						
PC	T0	60,77±0,21 <sup>a</sup>	8,13±0,02 <sup>a</sup>	26,94±0,38 <sup>a</sup>	28,05±0,47 <sup>a</sup>	73,79±0,56 <sup>ab</sup>
	T96	58,72±0,12 <sup>ab</sup>	7,65±0,37 <sup>ab</sup>	25,28±0,46 <sup>ab</sup>	26,42±0,46 <sup>ab</sup>	72,71±0,30 <sup>b</sup>
P0,5%	T0	59,12±0,97 <sup>ab</sup>	7,24±0,33 <sup>b</sup>	24,32±1,09 <sup>ab</sup>	26,01±0,19 <sup>ab</sup>	73,41±0,58 <sup>b</sup>
	T96	58,86±0,33 <sup>ab</sup>	7,06±0,03 <sup>b</sup>	23,31±1,03 <sup>b</sup>	24,36±0,98 <sup>b</sup>	73,48±0,35 <sup>ab</sup>
P2,0%	T0	58,60±0,14 <sup>b</sup>	7,18±0,23 <sup>b</sup>	26,27±1,04 <sup>a</sup>	27,23±1,06 <sup>a</sup>	74,71±0,16 <sup>a</sup>
	T96	58,16±0,73 <sup>b</sup>	7,68±0,01 <sup>ab</sup>	26,19±0,50 <sup>a</sup>	27,30±0,48 <sup>a</sup>	73,65±0,29 <sup>ab</sup>
<b>MIOLO</b>						
PC	T0	61,29±0,09 <sup>ab</sup>	6,58 ± 0,04 <sup>ab</sup>	22,09±0,20 <sup>bc</sup>	22,75±0,54 <sup>a</sup>	73,42±0,04 <sup>bc</sup>
	T96	57,42±0,11 <sup>ab</sup>	5,80 ± 0,43 <sup>ab</sup>	17,46±0,36 <sup>d</sup>	18,20±0,48 <sup>b</sup>	72,41±0,49 <sup>c</sup>
P0,5%	T0	61,29±0,09 <sup>a</sup>	6,63 ± 0,02 <sup>a</sup>	22,88±0,18 <sup>ab</sup>	23,67±0,38 <sup>a</sup>	73,68±0,29 <sup>b</sup>
	T96	57,42±0,11 <sup>bc</sup>	6,35 ± 0,26 <sup>a</sup>	21,83±0,30 <sup>c</sup>	22,93±0,48 <sup>a</sup>	72,26±0,12 <sup>bc</sup>
P2,0%	T0	59,72±1,27 <sup>ab</sup>	6,01 ± 0,23 <sup>b</sup>	23,07±0,11 <sup>a</sup>	23,84±0,05 <sup>a</sup>	75,06±0,26 <sup>a</sup>
	T96	59,69±0,31 <sup>c</sup>	5,87 ± 0,20 <sup>b</sup>	23,00±0,43 <sup>ab</sup>	23,90±0,59 <sup>a</sup>	75,18±0,06 <sup>a</sup>

L – Luminosidade; A – Componente de cor no eixo vermelho-verde; B – Componente de cor no eixo amarelo-azul; C – Chroma ou saturação da cor; h(C) – Ângulo de matiz (*hue angle*); PC – Pão controlo; P0,5% - Pão com 0,5% de extrato fermentado de folhas de tramazeira; Pão com 2,0% de extrato fermentado de folhas de tramazeira; T0 – Tempo 0h; T96 – Tempo 96h. As letras junto aos valores (a-d) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores, determinadas pelo teste de ANOVA. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes entre si (p < 0,05).

Esses resultados sugerem que a formulação P0,5% pode levar a uma crosta mais pálida, enquanto PC e P2,0% mantêm uma cor mais intensa ao longo do armazenamento. O parâmetro "c" revelou uma redução significativa na intensidade da cor saturada nas amostras PC e P0,5% ao longo do tempo, enquanto a amostra P2,0% manteve a intensidade de cor estável. Isso sugere que a formulação P2,0% proporciona maior resistência às alterações de cor durante o armazenamento, provavelmente devido à presença de componentes que estabilizam a crosta. Esse comportamento pode ser vantajoso para o aspecto visual do produto, ao longo do tempo de vida de prateleira.

**Tonalidade (h):** A tonalidade da crosta, medida pelo parâmetro "h", apresentou uma ligeira redução ao longo do tempo, o que indica um leve escurecimento da crosta. A adição de 2,0% do extrato de folhas fermentadas (P2,0%) resultou numa crosta com uma tonalidade mais amarelada ou avermelhada, possivelmente devido a reações de Maillard mais intensas ou a diferenças na composição química das formulações. A interação entre os fatores "Ensaio" e "Tempo" mostrou que, enquanto o tempo reduziu ligeiramente a tonalidade, a formulação P2,0% está associada a uma cor inicial mais intensa.

Em termos gerais, os resultados indicam que tanto a formulação do pão quanto o tempo de armazenamento influenciam significativamente os parâmetros de cor da crosta. A luminosidade (L) apresentou uma redução ao longo do tempo, refletindo possíveis processos de escurecimento ou oxidação, enquanto as variáveis cromáticas "a", "b", e "c" demonstraram variações que dependem da composição das formulações e da estabilidade da crosta durante o armazenamento.

O controle de cor na crosta do pão é fundamental não só para a estética do produto, mas também para a aceitação do consumidor. Os ingredientes adicionados nas formulações P0,5% e P2,0% alteraram de forma significativa a cor da crosta, com P2,0% mostrando uma maior estabilidade ao longo do tempo em comparação com PC e P0,5%. Em contraste, a amostra P0,5% apresentou uma maior variação na tonalidade amarela e vermelha, indicando um impacto potencialmente indesejado na coloração.

Estes resultados sugerem que o tempo de armazenamento e a formulação dos ingredientes têm um impacto considerável na aparência da crosta do pão, e que estratégias para otimizar esses fatores podem melhorar a estabilidade da cor e a aceitação visual do produto final.

#### 4.4.5.2. Miolo do pão

Na análise dos parâmetros de cor do miolo do pão preparado ao longo do tempo de armazenamento e entre as diferentes formulações, obtiveram-se os seguintes resultados:

**Luminosidade (L):** O parâmetro "L", que indica a luminosidade do miolo do pão, apresentou diferenças significativas entre as formulações ao longo do tempo de armazenamento. Inicialmente (T0), a formulação com 0,5% de aditivo (P0,5%) apresentou a maior luminosidade, sugerindo um efeito clareador, enquanto a formulação com 2,0% (P2,0%) apresentou um valor inferior, embora com maior variabilidade. Ao longo do tempo (T96), verificou-se uma redução generalizada na luminosidade, com a formulação P2,0% mostrando o maior decréscimo. Esta redução acentuada em P2,0% sugere uma maior suscetibilidade a processos de oxidação ou reações de escurecimento. Os resultados da ANOVA e dos testes de Tukey confirmaram a influência significativa tanto da formulação como do tempo de armazenamento, reforçando que a escolha do aditivo pode influenciar diretamente a aceitação visual do pão.

**Cromaticidade – Parâmetros “a”, “b” e “c”:** Na componente Vermelha (a) do miolo do pão verificou-se que, inicialmente, a formulação P0,5% apresentou os valores mais elevados, seguida do controle (PC) e P2,0%. Contudo, após 96 horas de armazenamento, houve uma diminuição significativa em todos os ensaios, com a maior perda observada na formulação de controle. A redução da intensidade da cor vermelha ao longo do tempo sugere que a presença de aditivos pode contribuir para uma melhor preservação da tonalidade avermelhada, especialmente na formulação P0,5%. A análise estatística reforçou que tanto a formulação como o tempo de armazenamento tiveram efeitos significativos sobre este parâmetro, evidenciando a importância do aditivo na estabilidade da cor.

A componente amarela da cor, representada pelo parâmetro "b", também apresentou diferenças significativas entre as formulações. A maior intensidade amarela foi observada na formulação P2,0%, tanto inicialmente quanto após 96 horas de armazenamento. Nos ensaios com P0,5% e P2,0%, a tonalidade amarela manteve-se mais estável, enquanto o controle sofreu uma redução acentuada. Os resultados indicam que a adição de 2,0% de aditivo contribui para uma cor mais intensa e estável ao longo do tempo, sugerindo que este extrato pode ajudar a preservar a cor amarela do miolo, ao contrário do controle que perdeu significativamente essa tonalidade.

O parâmetro "C", que reflete a intensidade geral da cor, evidenciou uma

estabilidade relativamente maior nas formulações P0,5% e P2,0% ao longo do tempo, enquanto o controle (PC) apresentou uma diminuição significativa. A incorporação dos extratos testados nas formulações P0,5% e P2,0% parece ter conferido maior resistência às alterações de cor provocadas pela oxidação ou outros processos de envelhecimento. A análise de Tukey confirmou que as formulações modificadas mantiveram a intensidade da cor mais estável em comparação com o controle, indicando que os aditivos podem ter propriedades antioxidantes que retardam as alterações cromáticas.

**Tonalidade (H):** O parâmetro "H", que representa a tonalidade, indicou que a formulação P2,0 manteve os valores mais elevados de tonalidade ao longo do tempo, sugerindo uma maior estabilidade desta característica cromática. A maior variação foi observada no controle, que apresentou uma redução significativa na tonalidade após 96 horas. Este resultado indica que a formulação do pão influencia a tonalidade, sendo que a adição do extrato em maior concentração favoreceu a estabilidade deste parâmetro.

Os resultados globais indicam que a formulação do pão tem um impacto significativo na cor do miolo, com diferentes concentrações do extrato testado apresentando efeitos distintos sobre a luminosidade, intensidade das componentes vermelha e amarela, e estabilidade geral da cor. A formulação P0,5% parece ser mais eficaz em preservar a tonalidade vermelha, enquanto a formulação P2,0% favorece uma maior intensidade e estabilidade da cor amarela. Em geral, a adição de 2,0% de aditivo resultou numa maior resistência à degradação da cor ao longo do tempo, sugerindo que este aditivo pode ter propriedades antioxidantes que contribuem para a manutenção da cor do miolo do pão durante o armazenamento.

Em conclusão, a escolha da formulação pode afetar diretamente a aceitação visual do produto pelos consumidores. A estabilidade da cor, especialmente a tonalidade e intensidade, pode influenciar a percepção de frescura e qualidade do pão, afetando o seu tempo de vida de prateleira e atratividade no mercado.

#### **4.4.6. Análise da textura**

A análise da textura do pão foi realizada na crosta e no miolo, permitindo avaliar as suas propriedades mecânicas ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 17). Foram analisados parâmetros como elasticidade, coesividade, gumosidade, mastigabilidade e resiliência, os quais fornecem informações sobre a estrutura e qualidade sensorial do pão. A comparação entre as diferentes formulações possibilita compreender o impacto da

incorporação do extrato de folhas de tramazeira fermentadas, na textura, bem como possíveis alterações ocorridas durante o armazenamento.

#### **4.4.6.1. Crosta do pão**

A análise estatística realizada sobre a crosta revelou que tanto a elasticidade quanto a coesividade foram significativamente influenciadas pelo fator Tempo. Com um valor de  $p$  muito baixo ( $p = 0,00003$  para elasticidade e  $p = 0,004$  para coesividade), fica evidente que a elasticidade da crosta variou substancialmente ao longo do tempo, indicando que o armazenamento pode afetar as propriedades físicas. No entanto, o fator amostra não apresentou efeito significativo para ambas as variáveis, sugerindo que as diferenças entre as amostras de crosta não são suficientemente pronunciadas para influenciar a elasticidade e a coesividade. A interação entre Tempo e Amostra para a coesividade também foi significativa ( $p = 0,0004$ ), indicando que o impacto do tempo sobre essa propriedade depende do tipo de amostra analisada, o que pode ser explorado em pesquisas futuras para entender melhor os fatores que afetam a coesividade em diferentes condições.

Na avaliação da elasticidade, os resultados apresentaram valores nos produtos com adição do extrato ligeiramente superiores ao pão controle no tempo T0. No entanto, ao longo do armazenamento (T96), observou-se uma diminuição na elasticidade em todas as amostras, o que era esperado devido à perda de água. Apesar disso, o pão P2,0% manteve-se com valores de elasticidade iguais ao P0,5% e com o PC ligeiramente superior, sugerindo que o extrato fermentado pode contribuir para a manutenção da elasticidade da crosta durante o armazenamento.

A coesividade apresentou um aumento progressivo no pão incorporado com os extratos fermentados no tempo T0, indicando que este pode fortalecer as ligações internas da crosta. No tempo T96, a coesividade aumentou no PC e no P2,0%, sendo este o que apresentou o maior valor. Isso indica que o extrato fermentado, especialmente em concentrações mais elevadas, ajuda a manter a integridade estrutural da crosta durante o armazenamento.

Relativamente à gomosidade observou-se uma menor dureza inicial no pão P0,5% em comparação com o PC e o P2,0% no tempo T0. No entanto, houve um aumento na gomosidade em todas as amostras no tempo T96, indicando endurecimento da crosta.

**Tabela 17.** Propriedades texturais da crosta e miolo dos pães controle e enriquecidos com extrato fermentado de folhas em diferentes concentrações e tempo de armazenamento

AMOSTRA	CROSTA					
	Elasticidade	Coesividade	Gumosidade	Mastigabilidade	Resiliência	
PC	T0	0,85±0,02 <sup>ab</sup>	0,58±0,03 <sup>b</sup>	4338,21±24 <sup>d</sup>	3218,84±137,01 <sup>de</sup>	0,32±0,01 <sup>a</sup>
	T96	0,76±0,00 <sup>bc</sup>	0,61±0,02 <sup>ab</sup>	12012,22±15,36 <sup>a</sup>	9390,45±112,44 <sup>a</sup>	0,26±0,01 <sup>b</sup>
P0,5%	T0	0,84±0,28 <sup>b</sup>	0,60±0,01 <sup>ab</sup>	3130,50±47,76 <sup>f</sup>	2656,47±128,27 <sup>e</sup>	0,37±0,01 <sup>a</sup>
	T96	0,73±0,02 <sup>c</sup>	0,59±0,01 <sup>ab</sup>	10782,75±143,20 <sup>b</sup>	7454,63±347,05 <sup>b</sup>	0,26±0,01 <sup>b</sup>
P2,0%	T0	0,87±0,03 <sup>a</sup>	0,66±0,01 <sup>a</sup>	4005,84±14,89 <sup>c</sup>	3493,95±116,84 <sup>d</sup>	0,32±0,01 <sup>a</sup>
	T96	0,73±0,01 <sup>c</sup>	0,50±0,01 <sup>c</sup>	8198,54±154,09 <sup>c</sup>	5947,03±124,40 <sup>c</sup>	0,26±0,01 <sup>b</sup>
<b>MIOLO</b>						
PC	T0	0,82±0,01 <sup>a</sup>	0,58±0,01 <sup>c</sup>	2689,41±65,30 <sup>e</sup>	2255,48±103,01 <sup>e</sup>	0,38±0,01 <sup>a</sup>
	T96	0,78±0,01 <sup>a</sup>	0,60±0,02 <sup>d</sup>	9620,98±476,01 <sup>c</sup>	7476,02±302,61 <sup>c</sup>	0,25±0,00 <sup>bc</sup>
P0,5%	T0	0,78±0,03 <sup>a</sup>	0,75±0,01 <sup>a</sup>	3413,62±172,08 <sup>de</sup>	4389,73±213,62 <sup>d</sup>	0,37±0,01 <sup>ab</sup>
	T96	0,65±0,02 <sup>b</sup>	0,64±0,02 <sup>b</sup>	12627,94±519,81 <sup>b</sup>	8585,63±371,52 <sup>b</sup>	0,31±0,01 <sup>d</sup>
P2,0%	T0	0,79±0,03 <sup>a</sup>	0,68±0,02 <sup>b</sup>	3638,79±20,75 <sup>d</sup>	2883,46±8471,00 <sup>e</sup>	0,33±0,01 <sup>cd</sup>
	T96	0,67±0,03 <sup>b</sup>	0,67±0,01 <sup>b</sup>	14417,51±324,87 <sup>a</sup>	9652,22±392,52 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>cd</sup>

PC – Pão controle; P0,5% - Pão com 0,5% de extrato de folhas de tramazeira fermentado; P2,0% - Pão com 2,0% de extrato de folhas de tramazeira fermentado; T0 – Tempo 0h; T96 – Tempo 96h. As letras junto aos valores (a-e) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores ( $p < 0,05$ ), determinadas pelo teste ANOVA

O pão P2,0% apresentou o menor aumento, sugerindo que o PEFT pode retardar o endurecimento da crosta. O comportamento do parâmetro de mastigabilidade foi semelhante à gomosidade, em que o pão P0,5% apresentou menor mastigabilidade inicial. No tempo T96, houve um aumento em todas as amostras, sendo o pão P2,0% o que apresentou o menor aumento, reforçando a ideia de que o extrato fermentado pode retardar o endurecimento da crosta. A resiliência da crosta apresentou pequenas variações no tempo T0, com valores ligeiramente no pão P0,5%. No tempo T96, observou-se uma diminuição na resiliência em todas as amostras, sem diferenças significativas entre as amostras adicionadas de extrato fermentado.

#### **4.4.6.2. Miolo do pão**

Os resultados indicaram que as variáveis de elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência foram afetadas pelo fator Tempo, com significâncias estatísticas elevadas ( $p < 0,001$  para gomosidade e mastigabilidade). Isso sugere que a estrutura e a textura do miolo alteram ao longo do tempo de armazenamento. O facto de a amostra ter mostrado um efeito significativo também implica que diferentes tipos de miolo podem apresentar características texturais que variaram. A interação entre o tempo e as amostras também foi significativa, indicando que a resposta do miolo ao tempo de armazenamento pode variar significativamente entre as diferentes formulações.

Na avaliação da elasticidade, observou-se que os valores iniciais do PC foram superiores aos das outras amostras, mas com o passar do tempo, todos os valores diminuíram. A coesividade aumentou com a concentração do extrato no tempo T0, indicando que este fortalece as ligações internas do miolo. No tempo T96, observou-se uma diminuição na coesividade do PC e um aumento nos pães com extrato, com estes mantendo maior coesividade.

A gomosidade apresentou um aumento significativo em todas as amostras, com o pão P2,0% apresentando o maior valor. Isso pode indicar que o extrato com concentrações mais elevadas pode aumentar o endurecimento do miolo. Quanto à mastigabilidade, a amostra com 0,5% de extrato apresentou maior mastigabilidade no tempo T0. No tempo T96, houve um aumento acentuado em todas as amostras, sendo maior para a amostra de pão controle. A resiliência apresentou pequenas variações no tempo T0, com o PC apresentando valores ligeiramente superiores. No tempo T96, observou-se uma diminuição deste parâmetro em todas as amostras, sem diferenças

significativas entre as amostras com o extrato incorporado.

Estes resultados corroboram parcialmente as observações de Pirca-Palomino et al. (2024), nomeadamente quanto ao aumento da dureza e da mastigabilidade dos pães ao longo do armazenamento. Contudo, no presente estudo, não foi observada uma redução tão evidente na coesividade, ao contrário do relatado por aqueles autores.

#### **4.4.7. Propriedades bioativas**

Na Tabela 18 estão sumariados os resultados obtidos nas análises de propriedades bioativas das amostras de pão controlo, pão com 0,5% de extrato de folhas fermentadas e pão com 2,0% de extrato de folhas fermentadas.

Os resultados demonstram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras e ao longo do tempo. A formulação com 2,0% de extrato fermentado apresentou os maiores teores de fenóis totais quer no tempo inicial quer após 96 horas de armazenamento. Estes resultados são semelhantes com o estudo observado por Tian et al. (2021), que relataram o aumento de compostos fenólicos solúveis durante a fermentação do pão de trigo.

Os flavonoides, metabolitos secundários abundantes em plantas (Dias et al., 2021), também demonstraram variação significativa em função da concentração do extrato e do tempo. Inicialmente, a formulação PEFT 2,0% apresentou o maior teor, diferindo estatisticamente das demais amostras ( $p < 0,05$ ). Após 96 horas, observou-se uma redução dos flavonoides em todas as amostras, sendo a maior redução registada no pão controlo.

A capacidade antioxidante revelou uma tendência geral de redução ao longo do tempo, embora as amostras com extrato tenham apresentado valores superiores. Pelo método DPPH, o P2,0% registou os maiores valores, diferindo estatisticamente das restantes formulações ( $p < 0,05$ ). No entanto, após 96 horas, todas as amostras apresentaram uma diminuição acentuada na atividade antioxidante, sendo mais expressiva na amostra controle e menos intensa em P2,0%. No ensaio FRAP, o P2,0% também manteve os valores mais elevados ao longo do tempo, enquanto a amostra controle apresentou uma diminuição mais acentuada. O poder redutor seguiu um comportamento semelhante, sendo significativamente maior nas formulações de pão com extrato fermentado, especialmente na concentração de 2,0%.

**Tabela 18.** Análises dos compostos bioativos e propriedades antioxidantes dos pães

<b>Amostra</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>Fenóis (mg eq. AG/g)</b>	<b>Flavonoides (mg eq Q/g)</b>	<b>DPPH (mg eq. trolox/ g)</b>	<b>FRAP (mg eq. ác.asc/ g)</b>	<b>Poder redutor (mg eq. ác.asc/ g)</b>
<b>PC</b>	<b>T0</b>	207,66±3,43 <sup>e</sup>	41,10±1,39 <sup>c</sup>	156,49±4,03 <sup>e</sup>	5,35±0,12 <sup>bc</sup>	1,23±0,01 <sup>b</sup>
	<b>T96</b>	241,63±6,36 <sup>c</sup>	33,40±0,76 <sup>c</sup>	43,99±3,87 <sup>e</sup>	3,70±0,07 <sup>e</sup>	1,02±0,09 <sup>c</sup>
<b>PEFT 0,5%</b>	<b>T0</b>	226,83±3,39 <sup>d</sup>	41,47±0,90 <sup>c</sup>	175,88±1,94 <sup>b</sup>	5,01±0,10 <sup>c</sup>	1,17±0,06 <sup>b</sup>
	<b>T 96</b>	233,18±6,30 <sup>cd</sup>	36,81±1,25 <sup>d</sup>	48,51±2,96 <sup>e</sup>	4,39±0,15 <sup>d</sup>	1,14±0,02 <sup>bc</sup>
<b>PEFT 2,0%</b>	<b>T0</b>	266,03±0,87 <sup>b</sup>	49,46±0,66 <sup>a</sup>	195,93±2,96 <sup>a</sup>	6,40±0,14 <sup>a</sup>	1,46±0,02 <sup>a</sup>
	<b>T96</b>	300,11±2,55 <sup>a</sup>	46,05±1,04 <sup>e</sup>	66,62±4,03 <sup>d</sup>	5,60±0,37 <sup>b</sup>	1,38±0,04 <sup>a</sup>

PC – Pão controlo; PEFT- Pão com 0,5% de extrato de folhas de tramazeira fermentadas; Pão com 2,0% de folhas de tramazeira fermentadas; T0 – Tempo 0 horas; T96 – Tempo 96 horas; as letras junto aos valores (a-e) indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores, determinadas por ANOVA. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ )

Assim, os dados indicam que a incorporação do extrato de folhas fermentadas melhora o conteúdo de compostos bioativos e a atividade antioxidante do pão. Embora a capacidade antioxidante diminua ao longo do tempo em todas as amostras, as formulações com extrato apresentaram menor degradação destes compostos. Desta forma, o extrato fermentado destacou-se como um aditivo funcional, favorecendo não apenas o enriquecimento do pão com antioxidantes, mas também contribuindo para a sua estabilidade ao longo do armazenamento.

Resultados semelhantes foram observados por Czaja et al. (2020) em estudos com extrato de casca de cebola, que também demonstrou aumentar os teores de flavonoides e a atividade antioxidante em pães. Os teores de fenóis e flavonoides nas nossas formulações foram superiores aos observados por Aprodu et al. (2019) em pães enriquecidos com gengibre. A amostra PEFT 2,0% apresentou valores mais elevados em comparação com o pão com 1,5% de gengibre. Além disso, a atividade antioxidante medida pelo método DPPH no pão com PEFT 2,0% superou os valores encontrados no estudo com gengibre, sugerindo que a tramazeira pode conferir maior capacidade antioxidante ao pão.

#### **4.4.8. Análise sensorial**

A análise sensorial do pão foi realizada para avaliar sua aceitabilidade pelos consumidores. De acordo com Oliveira (2018), as propriedades sensoriais do pão são fundamentais para a percepção da sua qualidade final e são avaliadas pelos sentidos humanos, incluindo odor e sabor. O questionário está apresentado no Anexo I.

Foram analisadas amostras de pão controle e pães enriquecidos com extratos de folhas fermentadas em concentrações de 0,5% e 2,0%. Estudos semelhantes efetuados por Neto (2021) e Murari et al. (2019), indicam que percentagens mais baixas de extrato mantêm o teor de compostos bioativos e a aceitabilidade do produto final, sugerindo que em produtos alimentares devem ser utilizadas concentrações baixas extratos vegetais.

A análise sensorial foi efetuada por 40 provadores não treinados. O estudo dos dados demográficos indica que houve diversidade étnica, sendo que 47,5% dos participantes se identificaram como brasileiros, 37,5% como portugueses e 2,5% como pertencentes a outras nacionalidades. Relativamente às faixas etárias, a maioria dos participantes refere ter entre 18 e 34 anos, embora também houvesse representatividade de faixas etárias mais avançadas, incluindo participantes com 65 anos ou mais. No que

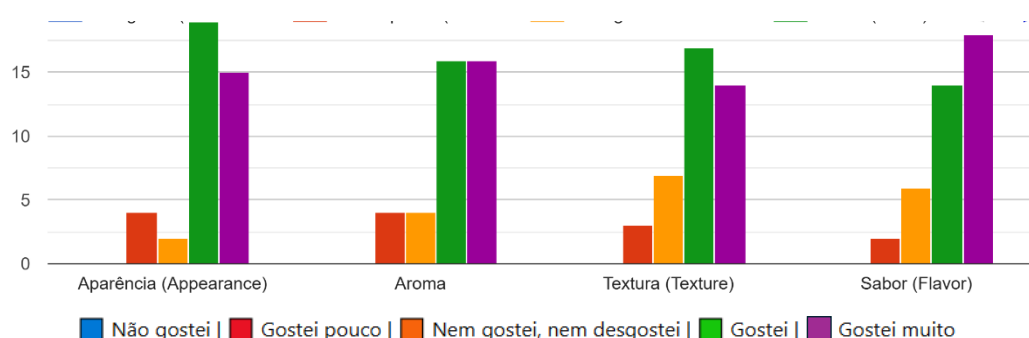
diz respeito ao género, 50% dos participantes eram do sexo feminino. Quanto ao nível de escolaridade, 72,5% possuíam formação ao nível da licenciatura ou do mestrado.

No que concerne aos hábitos alimentares relacionados com o consumo de pão, avaliou-se a frequência de consumo e os tipos de pão preferidos, sendo que apenas um participante referiu não consumidor de pão. Quanto à frequência, 90% dos participantes relataram consumir pão durante a semana (diariamente até 6 vezes por semana). Em relação ao tipo de pão habitualmente consumido, 50% indicaram preferência por pão branco, seguido de 35% que preferiam pão tradicional e 12,5% que consumiam pão integral.

Aos participantes foi pedido para classificarem a intensidade de cada parâmetro (aparência, aroma, textura e sabor) sensorial utilizando uma escala hedónica de cinco pontos. As amostras foram identificadas da seguinte forma: amostra controlo (código 789), amostra com 0,5% de extrato de folhas de tramazeira (código 456) e amostra com 2,0% de extrato (código 123).

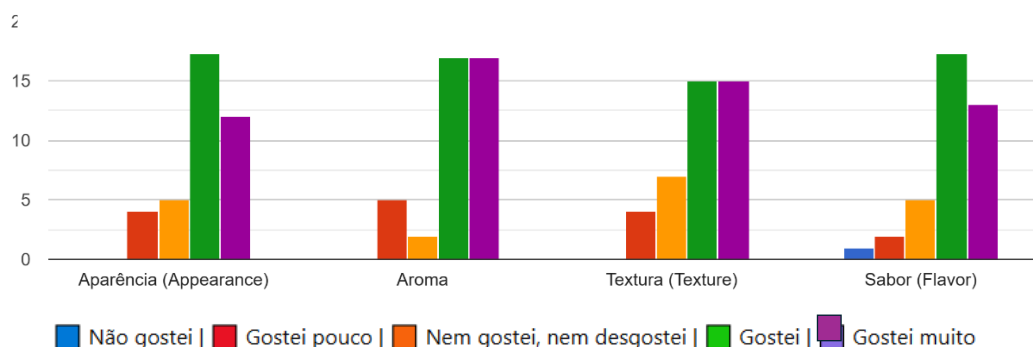
Os gráficos resultantes da avaliação sensorial, obtidos a partir do questionário aplicado aos participantes, estão apresentados nas Figuras 25, 26 e 27. A análise destes resultados permitiu comparar as perceções dos consumidores em relação às características de cada formulação, proporcionando uma melhor compreensão das suas preferências.

Questão: Classifique de acordo com a intensidade percebida para os seguintes parâmetros relacionados com a amostra 789



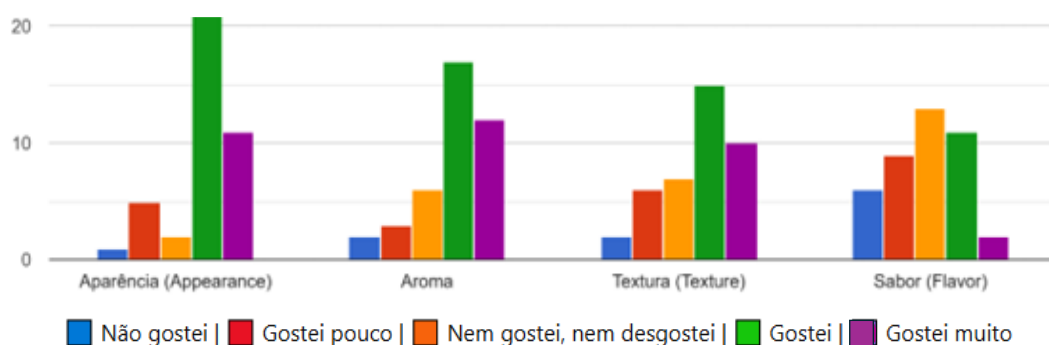
**Figura 23.** Avaliação sensorial da amostra controlo (nº 789) - parâmetros de aparência, aroma, textura e sabor

Questão: Classifique de acordo com a intensidade percebida para os seguintes parâmetros relacionados com a amostra 456



**Figura 24.** Avaliação sensorial da amostra com 0,5% de extrato fermentado incorporado (nº 456) - parâmetros de aparência, aroma, textura e sabor

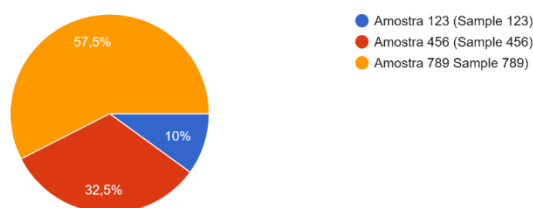
Questão: Classifique de acordo com a intensidade percebida para os seguintes parâmetros relacionados com a amostra 123



**Figura 25.** Avaliação sensorial da amostra com 2,0% de extrato fermentado incorporado (nº 123) - parâmetros de aparência, aroma, textura e sabor

Da análise das Figuras contacta-se que a amostra 789 foi a mais apreciada, apresentando os melhores resultados em todos os parâmetros sensoriais. A amostra 456 obteve uma boa aceitação geral, com resultados consistentes, embora ligeiramente inferiores aos da amostra controlo, especialmente na textura. Por outro lado, a amostra 123, apesar de bem avaliada, mostrou maior dispersão nas respostas, particularmente nos parâmetros de textura e sabor, indicando menor homogeneidade na aceitação. A Figura 28 apresenta os dados relativos à preferência dos provadores pelas amostras.

Questão: Qual amostra de pão gostou mais?



**Figura 26.** Resultado da avaliação sensorial das amostras de pão

A amostra 789 (controlo) a preferida, seguida pela amostra 456 (0,5% de extrato), enquanto a amostra 123 (2,0% de extrato) obteve a menor aceitação.

Bourekoua et al. (2018) relataram que a incorporação de 2,5% de *Moringa oleifera* reduziu a aceitação do produto final, tendência semelhante à observada no nosso estudo relativamente ao pão onde foi incorporada maior concentração de extrato, também esta amostra foi a menos apreciada, particularmente no que diz respeito aos parâmetros de Lim et al. (2020) verificaram também que concentrações mais elevadas de folhas de kenaf em pão reduziram a aceitação devido ao amargor e à firmeza excessiva.

A boa aceitação da amostra com 0,5% de extrato fermentado sugere que as adições moderadas de aditivos vegetais podem equilibrar os benefícios sensoriais e funcionais sem comprometer as características desejáveis. No entanto, concentrações mais elevadas, podem comprometer a aceitação do produto.

## 5. Conclusão

Com base no estudo realizado, pode-se concluir que:

- As folhas secas apresentaram teor de humidade final de 55,25% e rendimento de secagem de 44,75%;
- As análises microbiológicas indicaram qualidade aceitável, sem deteção de patogénicos como *Escherichia coli* ou *Clostridium spp.*;
- Os ácidos gordos saturados, com destaque para o ácido palmítico, foram os predominantes;
- O perfil nutricional das folhas foi considerado moderadamente saudável, apresentando uma relação PUFA/SFA de 0,49 e índices aterogénico e trombogénico reduzidos;
- A melhor condição para extração de compostos fenólicos, determinadas com base no delineamento experimental, consistiu na utilização de uma mistura de 60% (v/v) de etanol e 40% (v/v) de água desionizada;
- Com este procedimento extrativo, a concentração de compostos fenólicos totais foi de 244,16 mg EAG/g de extrato, enquanto a de flavonoides totais foi de 67,25 mg EQ/g. Adicionalmente, foi observado uma elevada atividade antioxidante, quantificada por diferentes métodos, nomeadamente DPPH, FRAP e poder redutor.
- A separação cromatográfica em camada fina (TLC) confirmou a eficácia desta condição, com maior intensidade e número de bandas;
- A composição de ensaio 3 ( $10^5$  de inóculo *S. cerevisiae*, 5 g de amostra, 1,4 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 0,20 g de glicose) foi a que mais favoreceu o processo fermentativo resultando na maior taxa específica de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ( $4,51 \text{ h}^{-1}$ );
- A ausência de coliformes totais e *E. coli*, bem como a não deteção de microrganismos patogénicos nos produtos fermentados reforça a segurança do processo;
- O extrato fermentado final apresentou um perfil lipídico favorável à saúde (relação PUFA/SFA = 0,67) elevada capacidade antioxidante, e teores mais elevados de fenóis e flavonoides totais comparativamente com as folhas secas; a fermentação contribuiu para a melhoria da capacidade funcional do produto, conferindo propriedades antimicrobianas e antioxidantes mais estáveis;

- A adição do extrato fermentado ao pão contribuiu para a melhoria da sua conservação e sua funcionalidade;
- O pão enriquecido com extrato apresentou melhor retenção de umidade, menor degradação de compostos bioativos, maior estabilidade lipídica e melhor preservação da textura e cor da crosta;
- A concentração de 2,0% de extrato revelou-se a mais eficaz em termos de atividade antioxidante e estabilidade química, contudo, comprometeu a aceitação sensorial, especialmente textura e do sabor;
- A formulação com 0,5% de extrato demonstrou um bom equilíbrio entre funcionalidade e aceitabilidade, sendo positivamente avaliada pelos testes sensoriais.

Conclui-se que o extrato fermentado de folhas de tramazeira apresenta potencial para ser utilizado como conservante e ingrediente funcional natural.

A concentração de 0,5% revelou-se a mais adequada para aplicação em pães, uma vez que promoveu a conservação do produto, além de conferiu benefícios nutricionais e melhorou as propriedades biológicas, sem comprometer a aceitação sensorial por parte dos consumidores.

Assim, o extrato de folhas de tramazeira fermentadas, na concentração de 0,5% pode constituir uma alternativa viável ao sorbato de potássio utilizado comumente na conservação do pão.

## Perspetivas futuras

- Avaliar a incorporação de extrato de folhas de tramazeira não fermentadas em pão e comparar com o extrato fermentado, analisando as diferenças nas propriedades bioativas e sensoriais;
- Estudar a estabilidade do pão ao longo de um período maior de armazenamento, verificando a manutenção de suas propriedades, como cor, textura e conteúdo de compostos bioativos;
- Estudar a durabilidade e a eficiência do extrato fermentado como conservante em pães armazenados sob diferentes condições de temperatura e umidade;
- Explorar o uso de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ou bactérias LAB para avaliar o impacto na melhoria das propriedades biológicas e sensoriais do pão.

## Referências bibliográficas

- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, F., Chaves, R., & Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 5800–5806.
- AOAC. (1920). Official Method 920.85: Fat (crude) or ether extract in flour. In *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- AOAC. (1923). Official Method 923.03: Ash of flour – Direct method. In *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- AOAC. (1943). Official Method 943.02: pH of flour – Potentiometric method. In *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- AOAC. (1950). Official Method 950.36: Protein in bread. In *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- AOAC. (2000). Official Method 989.13: Motile *Salmonella* in all foods – Immunodiffusion (1-2 TEST) method. In *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- AOAC. (2005). Official Method 03-2005: Detection and confirmed quantitation of coliforms. In *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- AOAC. (2005). Official Method 925.10: Moisture in flour – Air oven method. In *Official methods of analysis of AOAC International (18th ed.)*. AOAC International.
- Aprodu, I., & Şerban, L. (2019). Influence of ginger powder on dough rheological properties and bread quality. *AgroLife Scientific Journal*, 8 (2).
- APN (2016). Pão à lupa. Associação Portuguesa dos Nutricionistas.
- APN (2018). Melhor grão, melhor pão: uma análise nutricional sobre o pão (E-book n.º 47). Associação Portuguesa de Nutrição.
- Axel, C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in food science and nutrition*, 57 (16), 3528-3542.
- Baleia, J., Pirata, C., Mendes, S., Figuraeira, I., Martins, F., & Rito, A. I. (2021). Alterações no consumo alimentar e outros comportamentos relacionados com a

- alimentação em crianças durante o confinamento em contexto da pandemia da COVID-19, em Portugal: programa MUN-SI Cascais 2019/2020. Boletim Epidemiológico Observações, 10 (Supl 13), 4-9.
- Berker, KI, Güçlü, K, Tor, I, Apak, R, (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing powerbased antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, bathophenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* 72, 1157-1165, 2007.
- Bobinaitė, R., Grootaert, C., Van Camp, J., Šarkinas, A., Liaudanskas, M., Žvikas, V., Viškelis, P & Venskutonis, P. R. (2020). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of the extracts isolated from the pomace of rowanberry (*Sorbus aucuparia L.*). *Food Research International*, 136, 109310.
- Bortoluzzi, L. C. P. (2020). Hábitos de Compra e de Consumo de pão na Região de Bragança em Portugal (Tese de mestrado em qualidade e segurança alimentar. Instituto Politécnico de Bragança - Portugal.)
- Bourekoua, H., Różyło, R., Gawlik-Dziki, U., Benatallah, L., Zidoune, M. N., & Dziki, D. (2018). Evaluation of physical, sensorial, and antioxidant properties of gluten-free bread enriched with Moringa Oleifera leaf powder. *European Food Research and Technology*, 244, 189-195.
- Brighina, S., Pulvirenti, L., Siracusa, L., Arena, E., Faulisi, M. V., & Restuccia, C. (2024). Small-Sized Tomato Pomace: Source of Bioactive Compounds and Ingredient for Sustainable Production of Functional Bread. *Foods*, 13(21), 3492.
- Cacak-Pietrzak, G., Różyło, R., Dziki, D., Gawlik-Dziki, U., Sułek, A., & Biernacka, B. (2019). *Cistus incanus L.* as an innovative functional additive to wheat bread. *Foods*, 8(8), 349.
- Camboa, I. A. P. (2019). Estudo de Propriedades Físico Químicas ao Longo da Vida do Pão de Forma (Tese de mestrado em engenharia alimentar. Universidade Catolica Portuguesa - Portugal).
- Cao, M., Yang, F., McClements, D. J., Guo, Y., Liu, R., Chang, M., W Wei, W., Jin, J., & Wang, X. (2024). Impact of dietary n-6/n-3 fatty acid ratio of atherosclerosis risk: a review. *Progress in Lipid Research*, 101289.
- Cappelli, A., & Cini, E. (2021). Challenges and opportunities in wheat flour, pasta, bread, and bakery product production chains: A systematic review of innovations and improvement strategies to increase sustainability, productivity, and product

- quality. *Sustainability*, 13 (5), 2608.
- Cappelli, A., Lupori, L., & Cini, E. (2021). Baking technology: A systematic review of machines and plants and their effect on final products, including improvement strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 275-284.
- Carbonetto, B., Ramsayer, J., Nidelet, T., Legrand, J., & Sicard, D. (2018). Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast*, 35 (11), 591-603.
- Carrijo, M. R. M., Santos, H. S., & de Freitas Silva, S. P. (2024). Análise microbiológica de plantas medicinais comercializadas em lojas de produtos naturais e feiras livres em uma cidade do Triângulo Mineiro. *Brazilian Journal of Health Review*, 7 (3), e70842-e70842.
- Carvalho, A. M. P. (1993). *Barbela, um trigo escravo: A cultura tradicional de trigo na Terra-Fria Transmontana: Que futuro? (Tese de mestrado em extensão e desenvolvimento rural. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro)*.
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology reports*, 26, e00450.
- Czaja, A., Czubaszek, A., Wyspiańska, D., Sokół-Łętowska, A., & Kucharska, A. Z. (2020). Quality of wheat bread enriched with onion extract and polyphenols content and antioxidant activity changes during bread storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 55 (4), 1725-1734.
- Della Valle, G., Chiron, H., Cicerelli, L., Kansou, K., Katina, K., Ndiaye, A., Whitworth, M., & Poutanen, K. (2014). Basic knowledge models for the design of bread texture. *Trends in Food Science & Technology*, 36 (1), 5-14.
- Demirtaş, B., Kaya, A., & Dağistan, E. (2018). Consumers 'Bread Consumption Habits and Waste Status: Hatay/Turkey Example. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6 (11), 1653-1661.
- Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26 (17), 5377.
- dos Santos, W. R. B. (2020). *Controlo do processo de fabrico do pão de forma e impacto na microbiologia. (Tese de mestrado em tecnologia e ciência alimentar. Universidade do Porto, Portugal)*.
- Dulf, F. V., Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2016). Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products.

- Food Chemistry. 209, 27–36.
- Duncan, J. D., Setati, M. E., & Divol, B. (2023). Redox cofactor metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and its impact on the production of alcoholic fermentation end-products. *Food Research International*, 163, 112276.
- Eliseeva, L. G., Kokorina, D. S., Zhirkova, E. V., Nevskaya, E. V., Goncharenko, O. A., & Othman, A. J. (2021). Using functional quinoa ingredients for enhancing the nutritional value of bakery products. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 640, 2: 022072.
- Erskine, E., Ozkan, G., Lu, B., & Capanoglu, E. (2023). Effects of fermentation process on the antioxidant capacity of fruit byproducts. *ACS omega*, 8 (5), 4543-4553.
- Esghaei, M., Ghaffari, H., Esboei, B. R., Tapeh, Z. E., Salim, F. B., & Motevalian, M. (2018). Evaluation of anticancer activity of *Camellia sinensis* in the Caco-2 colorectal cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19 (6), 1697.
- Fay, M.F., Barlow, G., Brown, A.P. and Rich, T.C.G. (2022), 1040. *Sorbus aucuparia*: Rosaceae. *Curtis's Botanical Magazine*, 39, 631-643.
- Freitas, L. S. (2021). Utilização de folhas de v. Vinífera fermentadas como conservante em iogurte com polpa de morango (Tese de mestrado em qualidade e segurança alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal).
- Garcia, M. V., Bernardi, A. O., & Copetti, M. V. (2019). The fungal problem in bread production: Insights of causes, consequences, and control methods. *Current Opinion in Food Science*, 29, 1-6.
- Hatano, T, Kagawa, H, Yasuhara, T, Okuda, T. (1998). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36, 2090-2097, 1988.
- Heitmann, M., Zannini, E., & Arendt, E. (2018). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58 (7), 1152-1164.
- Hernández-Parada, N., González-Ríos, O., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Figueroa-Hernández, C. Y., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Rayas-Duarte, P., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2022). Exploiting the Native Microorganisms from Different Food Matrices to Formulate Starter Cultures for Sourdough Bread Production. *Microorganisms*, 11 (1), 109.
- IAAlimentar. (2023). Vendas da panificação e pastelaria industriais ultrapassaram os mil

- milhões de euros. Disponível em: <https://www.ialimentar.pt/Artigos/569644-Vendas-da-panificacao-e-pastelaria-industriais-ultrapassaram-os-mil-milhoes-de-euros.html>. Acesso em: 25 jul. 2024.
- ICNF. Árvores Indígenas em Portugal Continental. Guia de utilização. Instituto de conservação da natureza e das florestas. (2020).
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2024). PortFIR - Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar.
- ISO 15213:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions., 2003.
- International Organization for Standardization. (2008). 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.
- International Organization for Standardization. (2004). 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 C.
- International Organization for Standardization. (2014). ISO 9308-1:2014. Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- Ivanović, M., Grujić, D., Cerar, J., Islamčević Razboršek, M., Topalić-Trivunović, L., Savić, A., Kocar, D., & Kolar, M. (2022). Extraction of bioactive metabolites from *Achillea millefolium* L. with choline chloride based natural deep eutectic solvents: a study of the antioxidant and antimicrobial activity. *Antioxidants*, 11(4), 724.
- Kavak, D. D., & Akdeniz, B. (2019). *Sorbus umbellata* (Desf.) Fritsch var. *umbellata* leaves: Optimization of extraction conditions and investigation antimicrobial, cytotoxic, and  $\beta$ -glucuronidase inhibitory potential. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74, 364-369.
- Kaveh, M., Zomorodi, S., Mariusz, S., & Dziwulska-Hunek, A. (2024). Determination of Drying Characteristics and Physicochemical Properties of Mint (*Mentha spicata* L.) Leaves Dried in Refractance Window. *Foods*, 13 (18), 2867.
- Kourkouta, L., Koukourikos, K., Iliadis, C., Ouzounakis, P., Monios, A., & Tsaloglidou, A. (2017). Bread and health. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (11),

821-826.

- Krivoruchko, E. V., Andrushchenko, O. A., & Kononenko, A. V. (2013). Carboxylic acids from *Sorbus aucuparia* and *S. aria*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 742-743.
- Ktenioudaki, A., Alvarez-Jubete, L., Smyth, T. J., Kilcawley, K., Rai, D. K., & Gallagher, E. (2015). Application of bioprocessing techniques (sourdough fermentation and technological aids) for brewer's spent grain breads. *Food Research International*, 73, 107-116.
- Kültür, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111 (2), 341-364.
- Kumar, M., Tomar, M., Amarowicz, R., Saurabh, V., Nair, M. S., Maheshwari, C., Sasi, M., Prajapati, U., Hasan, M., Singh, S., Changan, S., Prajapat, R. K., Berwal, M. K., & Satankar, V. (2021). Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves: Nutritional Composition, Phytochemical Profile, and Health-Promoting Bioactivities. *Foods*, 10 (4), 752.
- Liepiņa, I., Nikolajeva, V., & Jākobsone, I. (2013). Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *Environmental and experimental biology*, 11 (4), 195-199.
- Lim, P. Y., Sim, Y. Y., & Nyam, K. L. (2020). Influence of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves powder on the physico-chemical, antioxidant and sensorial properties of wheat bread. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2425-2432.
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8 (8), 1142.
- Mariod, A. A., & Fatima, A. M. (2022). Properties and advantages of food fermentation. *African Fermented Food Products-New Trends*, 31-36.
- Martínez-Monzó, J., García-Segovia, P., & Albors-Garrigos, J. (2013). Trends and innovations in bread, bakery, and pastry. *Journal of Culinary Science & Technology*, 11(1), 56-65.
- McAllister, H. (2005). The genus *Sorbus*: mountain ash and other rowans. Royal Botanic Gardens Kew.
- Menotti, A., Puddu, P. E., Kromhout, D., Karvonen, M., & Blackburn, H. (2024). Dietary atherogenicity and thrombogenicity indexes predicting cardiovascular mortality: 50-year follow-up of the Seven Countries Study. *Nutrition, Metabolism and*

Cardiovascular Diseases.

- Milani, R. D. M. (2017). Diversidade de bactérias epífitas e endofíticas da cultura do milho. Portal de Dados Abertos da CAPES.
- Mitelut, A. C., Popa, E. E., Popescu, P. A., & Popa, M. E. (2021). Trends of innovation in bread and bakery production. *Trends in wheat and bread making*, 199-226.
- Motlhatlego, K. E., Njoya, E. M., Abdalla, M. A., Eloff, J. N., & McGaw, L. J. (2018). The potential use of leaf extracts of two *Newtonia* (Fabaceae) species to treat diarrhoea. *South African Journal of Botany*, 116, 25-33.
- Murari, N. G., Rostagno, M. A., & de Souza, M. C. (2018). Produção de pães enriquecidos com compostos bioativos da erva mate (*Ilex paraguariensis*). *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP*, (26).
- Neto, M. (2021). Desenvolvimento e caracterização de pães tipo forma adicionados de farinha de folhas de *Moringa oleífera Lam.*
- Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharm.*
- Norma Portuguesa (NP) 4400-1, Microbiologia alimentar: regras gerais para contagem de *Estafilococos* coagulase positiva: Parte 1: Técnica com confirmação de colónias (2002).
- Norma Portuguesa (NP) 4405:2002, Regras gerais para contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C (2002).
- Oliveira, M. I. S. D. (2018). Perfil sensorial do pão tradicional (Tese de mestrado em engenharia alimentar, Universidade Católica Portuguesa, Portugal).
- Olszewska, M. A. (2011). Variation in the phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Sorbus aucuparia* leaf extracts during vegetation. *Acta Pol. Pharm*, 68 (6), 937-944.
- Olszewska, M. A., & Michel, P. (2009). Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. *Natural Product Research*, 23 (16), 1507-1521.
- Olszewska, M. A., Nowak, S., Michel, P., Banaszczak, P., & Kicel, A. (2010). Assessment of the content of phenolics and antioxidant action of inflorescences and leaves of selected species from the genus *Sorbus* sensu stricto. *Molecules*, 15(12), 8769-8783.
- OMS - World Health Organization (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic

- diseases: Report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO Technical Report Series No. 916. Geneva, Switzerland.
- Panel, E. B., & Herman, L. (2023). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microorganisms intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal*, 21 (1), 7747.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6 (1), 1.
- Paula, V. B., Estevinho, L. M., Cardoso, S. M., & Dias, L. G. (2023). Comparative methods to evaluate the antioxidant capacity of propolis: an attempt to explain the differences. *Molecules*, 28 (12), 4847.
- Paula, V. M. B. (2012). Caracterização química e biológica do própolis da “Serra de Bornes” por TLC (Tese de mestrado em qualidade e segurança alimentar. Instituto Politécnico de Bragança - Portugal).
- Pi, X., Yang, Y., Sun, Y., Cui, Q., Wan, Y., Fu, G., Chen, H. & Cheng, J. (2022). Recent advances in alleviating food allergenicity through fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (26), 7255-7268.
- Pirca-Palomino, M., Malange, Y. I., Ramos-Escudero, F., Muñoz, A. M., & Cancino-Chávez, K. (2024). Antioxidant properties, texture and sensory quality of sliced bread enriched with leaf powder from mango (*Mangifera indica*). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 74 (4), 313-322.
- Pires, M. R., Peixoto, P. G., & Oliveira, R. V. (2015). Fermentação alcoólica: proposta do ensino das vias bioquímicas através da destilação fracionada. *Eclética Química*, 40, 166-172.
- Portaria n.º 52/2015, de 26 de fevereiro. Ministérios da Economia, da Agricultura e do Mar e da Saúde. Portugal (2015). *Diário da República*, série 1, 40, 1202–1204.
- Portela-Pereira, P.V.Araújo, A.Silva, P.Pereira, J.Lourenço, F.Clamote, J.T.Tavares, M.Porto, et al. (2023). *Sorbus aucuparia L.* mapa de distribuição. *Flora-On: Flora de Portugal Interactiva*, Sociedade Portuguesa de Botânica. Disponível em URL: <http://www.flora-on.pt/#wSorbus+aucuparia> - Acesso em 16/05/2023.
- Rahman, M., Islam, R., Hasan, S., Zzaman, W., Rana, M. R., Ahmed, S., Roy, M., Sayem, A., Matin, A., Raposo, A., Zandonadi, R.P., Botelho, R.B.A. & Sunny, A. R. (2022). A comprehensive review on bio-preservation of bread: An approach to adopt wholesome strategies. *Foods*, 11 (3), 319.
- Raspe, O., Findlay, C., & Jacquemart, A. L. (2000). *Sorbus aucuparia L.* *Journal of*

- Ecology, 88 (5), 910-930.
- Räty, M., Caudullo, G., & de Rigo, D. (2016). *Sorbus aucuparia* in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. European Atlas of Forest Tree Species; San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., Eds, 176-177.
- Reda, F., Borjac, J., Fakhouri, R., & Usta, J. (2017). Cytotoxic effect of *Moringa oleifera* on colon cancer cell lines. Acta Horti, 1158, 45-54.
- Regulamento (UE) 2023/915 da Comissão, de 25 de abril de 2023, relativo aos teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1881/2006. Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho (2011). Relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios.
- Sak, K., Jürisoo, K., & Raal, A. (2014). Estonian folk traditional experiences on natural anticancer remedies: From past to the future. Pharmaceutical Biology, 52 (7), 855-866.
- Santana Filho, D. M. (2018). O microbioma da fermentação do tabaco (*Nicotiana tabacum*) e o potencial biotecnológico das leveduras. (Tese de doutoramento em ciências agrárias. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil).
- Sarma, C., Rasane, P., Kaur, S., Singh, J., Singh, J., Gat, Y., Garba, U., Kaur, D., & Dhawan, K. (2018). Antioxidant and antimicrobial potential of selected varieties of *Piper betle* L. (Betel leaf). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 90, 3871-3878.
- Sarv, V., Venskutonis, P. R., & Bhat, R. (2020). The *Sorbus* spp.—underutilised plants for foods and nutraceuticals: Review on polyphenolic phytochemicals and antioxidant potential. Antioxidants, 9 (9), 813.
- Šavikin, K. P., Zdunić, G. M., Krstić-Milošević, D. B., Širčelj, H. J., Stešević, D. D., & Pljevljakušić, D. S. (2017). *Sorbus aucuparia* and *Sorbus aria* as a source of antioxidant phenolics, tocopherols, and pigments. Chemistry & Biodiversity, 14 (12), e1700329.
- Seixas, N. A. L. (2022). Efeito da incorporação de bagas de sabugueiro fermentadas no pão (Tese de mestrado em qualidade e segurança alimentar. Instituto Politécnico de Bragança, Portugal).
- Shanmugavel, V., Santhi, K. K., Kurup, A. H., Kalakandan, S., Anandharaj, A., & Rawson, A. (2020). *Potassium bromate*: Effects on bread components, health,

- environment and method of analysis: A review. *Food chemistry*, 311, 125964.
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography* (3 ed). CRC Press.
- Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Wagner, H., Verpoorte, R., & Heinrich, M. (2014). Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of ethnopharmacology*, 154 (3), 481-536.
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Hervás, G., Griinari, J. M., Grandison, A. S., & Beaver, D. E. (2006). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89 (2), 714–732.
- Singleton, VL, Orthofer, R, & Lamuela-Raventos, RM, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178, 1999.
- Soares, V. M., Silva, T. C. D., & Santos, P. P. D. (2023). Papel do ômega-3 e do ômega-6 sobre fatores de risco cardiovasculares: Importância da fonte da dieta e da estrutura do lipídio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 120, e20230753.
- Soares, C. (2014). Pão e Vinho sobre a mesa: um “clássico” da alimentação portuguesa; Bread & wine: a classical motif of the Portuguese Food. C. Soares, IC Macedo (eds.), *Ensaio sobre o Património Alimentar Luso-brasileiro; Studies on Luso-brazilian Food Heritage*, 17-50.
- Sołtys, Agnieszka, Agnieszka Galanty, and Irma Podolak. Ethnopharmacologically important but underestimated genus *Sorbus*: A comprehensive review. *Phytochemistry reviews* 19 (2020): 491-526.
- Stoll, D. A., Wafula, E. N., Mathara, J. M., Trierweiler, B., Kulling, S. E., & Huch, M. (2021). Fermentation of African nightshade leaves with lactic acid bacterial starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 342, 109056.
- Takwa, S., Caleja, C., Barreira, J. C., Soković, M., Achour, L., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2018). *Arbutus unedo L.* and *Ocimum basilicum L.* as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread. *LWT*, 88, 47-55.
- Tavares, T. D., Antunes, J. C., Padrão, J., Ribeiro, A. I., Zille, A., Amorim, M. T. P., Ferreira, F., & Felgueiras, H. P. (2020). Activity of specialized biomolecules against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 9 (6), 314.
- Tebben, L., Shen, Y., & Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality.

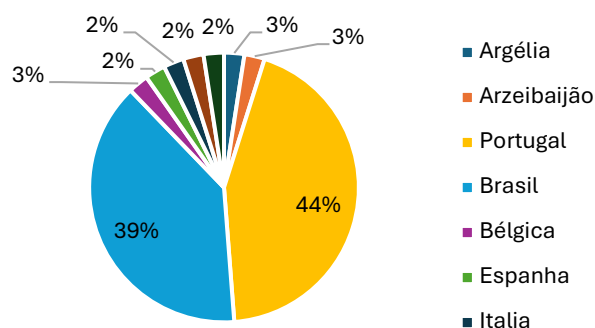
- Trends in Food Science & Technology, 81, 10-24.
- Tian, W., Chen, G., Tilley, M., & Li, Y. (2021). Changes in phenolic profiles and antioxidant activities during the whole wheat bread-making process. *Food Chemistry*, 345, 128851.
- Tilami, S. K., & Kouřimská, L. (2022). Assessment of the nutritional quality of plant lipids using atherogenicity and thrombogenicity indices. *Nutrients*, 14 (18), 3795.
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The Lancet*, 338 (8773), 985–992.
- Usman, Z. L., Aremu, M. O., Ogah, S. P. I., Ibrahim, H., & Aremu, S. O. (2024). Physicochemical characteristics and fatty acid composition of five selected leafy vegetables grown in southwest Nigeria. *Human, Health and Halal Metrics*, 5 (2), 33-45.
- Vermelho, A. B., Moreira, J. V., Junior, A. N., da Silva, C. R., Cardoso, V. D. S., & Akamine, I. T. (2024). Microbial preservation and contamination control in the baking industry. *Fermentation*, 10 (5), 231.
- Vinagre, C., Vinagre, S., & Carrilho, E. (2019). The use of medicinal plants by the population from the Protected Landscape of “Serra de Montejunto”, Portugal. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 15 (1), 1-30.
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2 (4), 30.
- Wirkijowska, A., Zarzycki, P., Sobota, A., Nawrocka, A., Blicharz-Kania, A., & Andrejko, D. (2020). The possibility of using by-products.
- Woisky, R.G., & Salatino A, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37, 99-105,1998.
- Yousefzadeh, H., Raeisi, S., Esmailzadeh, O., Jalali, G., Nasiri, M., Walas, Ł., & Kozłowski, G. (2021). Genetic diversity and structure of rear edge populations of *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) in the Hyrcanian Forest. *Plants*, 10 (7), 1471.
- Ziemlewska, A., Nizioł-Łukaszewska, Z., Bujak, T., Zagórska-Dziok, M., Wójciak, M., & Sowa, I. (2021). Effect of fermentation time on the content of bioactive compounds with cosmetic and dermatological properties in *Kombucha Yerba Mate* extracts. *Scientific Reports*, 11 (1), 18792.

# Anexo I

## Resultado do inquérito da análise sensorial do pão

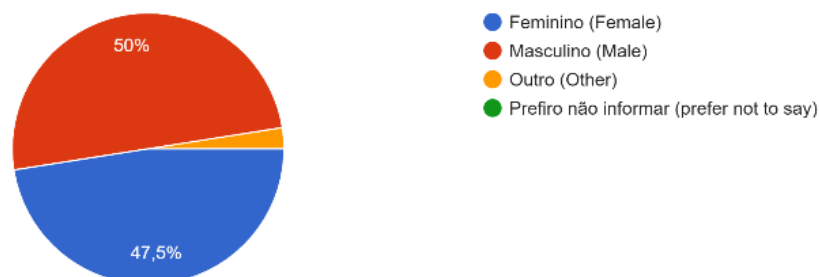
No âmbito da tese de mestrado do curso de Qualidade e Segurança Alimentar, foi desenvolvido pão de trigo barbeta com adição de extrato de folhas de tramazeira. Esta análise sensorial teve como objetivo analisar a aceitabilidade do consumidor perante este novo produto.

1) Nacionalidade 40 respostas



2)

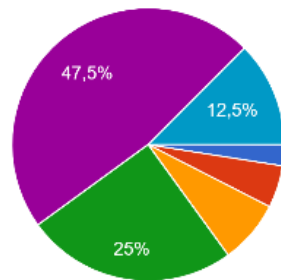
Género (Gender)  
40 respostas



3)

Nível de escolaridade (Level of education)

40 respostas

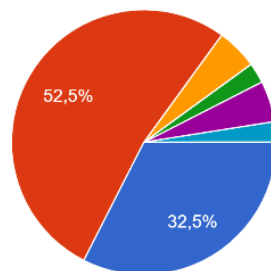


- < 12º ano (Basic education)
- 12º ano (High school)
- Ensino técnico (Technical education)
- Licenciatura (Undergraduate degree)
- Mestrado (Master)
- Doutoramento (PHD)

4)

Idade (Age)

40 respostas

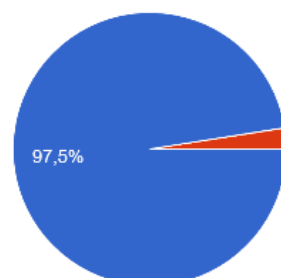


- 18-24
- 24 - 34
- 35 - 45
- 46 - 54
- 55 - 64
- 65 anos ou mais

5)

É consumidor de pão? (Are you a bread consumer?)

40 respostas

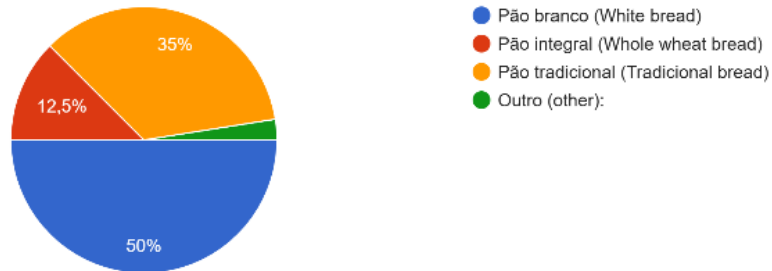


- Sim (yes)
- Não (No)

6)

Qual tipo de pão consome habitualmente? (What type of bread do you usually eat?)

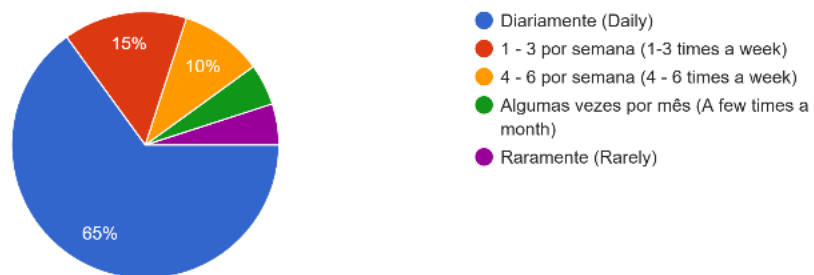
40 respostas



7)

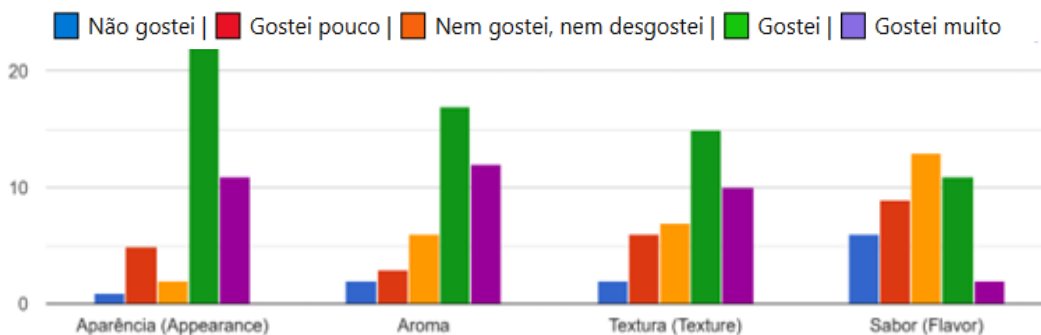
Qual a frequência de consumo de pão? (How often do you eat bread?)

40 respostas



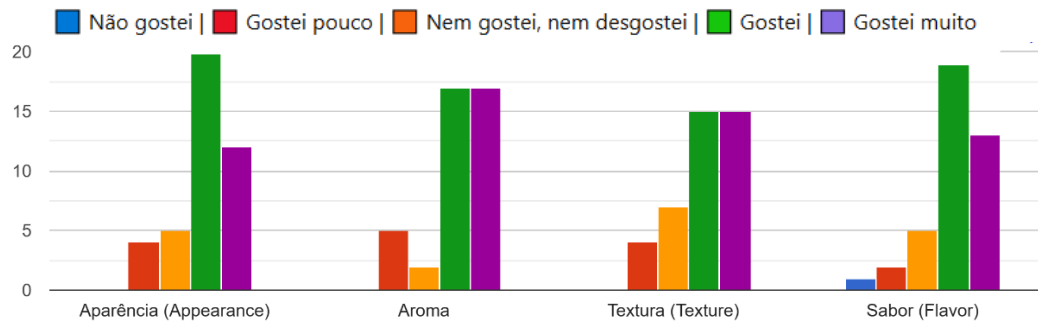
8)

Classifique de acordo com a intensidade percebida para os seguintes parâmetros relacionados com a amostra 123 (Classify according to perceive...for the following sample-related parameters 123):



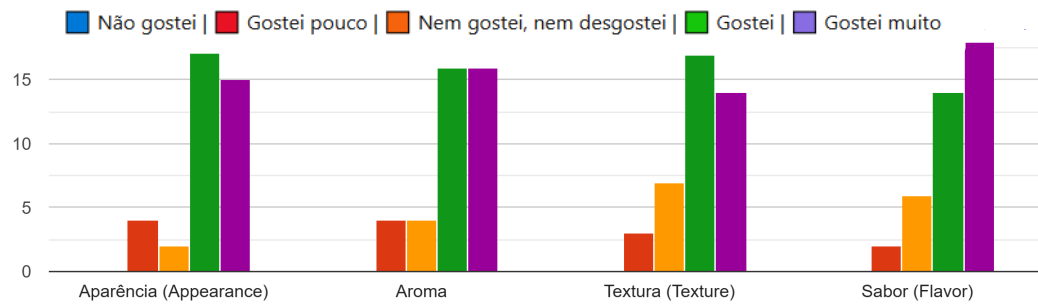
9)

Classifique de acordo com a intensidade percebida para os seguintes parâmetros relacionados com a amostra 456 (Classify according to perceive...for the following sample-related parameters 456):



10)

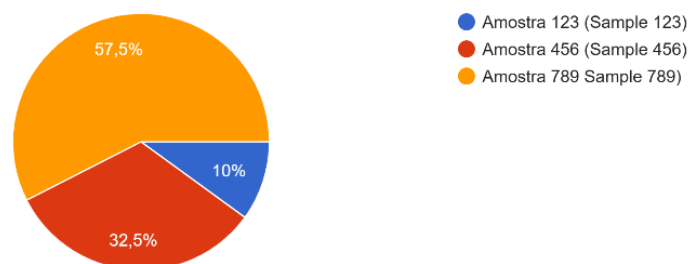
Classifique de acordo com a intensidade percebida para os seguintes parâmetros relacionados com a amostra 789 (Classify according to perceive...for the following sample-related parameters 789):



11)

Qual amostra de pão gostou mais ? (Which bread sample did you like best?)

40 respostas



12)

Com base na sua experiência, estaria disposto a comprar este pão? (Based on your experience, would you be willing to buy this bread?)

40 respostas

