

# **Desenvolvimento de pães com incorporação de microalgas**

**Cecília Domingues Pedro**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadores: Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo

**Júri:**

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, Professora auxiliar do(a) Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, orientadora

Doutora Patrícia Catarina das Neves Bordalo Branco Fradinho, Professora auxiliar convidada do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

## Agradecimentos

Queria agradecer às minhas orientadoras, a Doutora Cristiana Nunes e a Doutora Anabela Raymundo, por toda a ajuda e apoio que me forneceram, e pela paciência que tiveram.

Agradeço a todas as colegas de laboratório que me ajudaram durante o breve instante em que estive no Instituto Superior de Agronomia, sempre prontas a ajudar, e a todas as minhas amigas que me apoiaram.

À minha família que esteve sempre ao meu lado.

Agradeço também a atribuição do prémio de incentivo ao mestrado Santander Universidades/Instituto Superior de Agronomia.

## Resumo

As microalgas contêm uma elevada quantidade de nutrientes, nomeadamente proteínas, polissacáridos, ácidos gordos polinsaturados e pigmentos (clorofilas e carotenoides).

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo do impacto da adição das microalgas *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* na aptidão tecnológica de pães de trigo. As microalgas utilizadas foram produzidas no âmbito do projeto Algae2Future<sup>1</sup>, sendo também utilizada *Chlorella vulgaris* comercial. Para estudar o impacto das microalgas prepararam-se pães com um nível de incorporação de microalga desidratada de 4% (m/m). Avaliou-se a textura, reologia e a cor das massas e os parâmetros de qualidade dos pães: textura, volume,  $a_w$ , humidade e cor.

A incorporação da *Chlorella vulgaris* provocou aumento da estruturação, pelo aumento do tempo de desenvolvimento da massa durante a mistura e da estabilidade da mesma, aumento da componente elástica na avaliação do comportamento reológico em regime oscilatório e pelo aumento da firmeza da massa e do miolo na Análise de Perfil de Textura.

No caso da incorporação de *Tetraselmis chuii*, os pães não apresentaram alterações na textura em relação ao controlo, mas apresentaram uma cinética de envelhecimento mais lenta. Verificou-se uma destabilização na estrutura da massa, visível na reologia da massa fermentada.

A adição das microalgas aumentou o pH das massas e aumentou a humidade do miolo, mas a atividade da água não sofreu alterações em relação ao controlo. A cor das massas e dos pães alterou-se significativamente, sendo perceptível uma diferença evidente entre o controlo e as massas e pães com incorporação de microalgas. Os pães depois de cozidos apresentaram tonalidades verdes quer na crosta quer no miolo.

**Palavas-chave:** pão de trigo, *Tetraselmis chuii*, *Chlorella vulgaris*, reologia, textura.

---

<sup>1</sup> Projeto financiado pelo Research Council of Norway's BIONÆR Programme project no: 267872/E50 A2F – *Algae to Future*, setembro 2017 - dezembro 2021.

## Abstract

Microalgae contain a high amount of nutrients, namely proteins, polysaccharides, polyunsaturated fatty acids and pigments (chlorophylls and carotenoids).

The main objective of this work was to study the impact of the addition of microalgae *Tetraselmis chuii* and *Chlorella vulgaris* on the technological aptitude of wheat breads. The microalgae used were produced as part of the Algae2Future<sup>1</sup> project, and commercial *Chlorella vulgaris* was also used. To study the impact of microalgae, breads were prepared with a level of incorporation of dehydrated microalgae of 4% (m/m). The texture, rheology and colour of the doughs and the quality parameters of the breads were evaluated: texture, volume,  $a_w$ , moisture and colour.

The incorporation of *Chlorella vulgaris* caused an increase in the structure, by increasing the dough development time during mixing and its stability, by increasing the elastic component in the assessment of rheological behaviour under oscillatory regime and by increasing the firmness of the dough and crumb in the Texture Profile Analysis.

In the case of the incorporation of *Tetraselmis chuii*, breads showed no changes in texture relative to the control and presented lowest slower aging kinetics. There was a destabilization in the structure of the dough, visible in the rheology of the fermented dough.

The addition of microalgae increased the pH of the dough and increased the moisture in the crumb, but the water activity did not change to the control. The colour of the dough's and breads changed significantly, with a noticeable difference between the control and the dough's and breads incorporated with microalgae. The breads after baking had green hue in both the crust and the crumb.

**Key-words:** wheat bread, *Tetraselmis chuii*, *Chlorella vulgaris*, rheology, texture.

---

<sup>1</sup> **Project financed by Research Council of Norway's BIONÆR Programme** project no: 267872/E50 A2F – *Algae to Future*, September 2017 – December 2021.

## Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice .....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	x
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. PÃO .....	3
2.1.1. HISTÓRIA .....	3
2.1.2. INGREDIENTES .....	3
2.1.3. PROCESSO .....	7
2.1.4. NOVAS TENDÊNCIAS DE CONSUMO.....	8
2.2. MICROALGAS .....	11
2.2.1. <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	13
2.2.2. <i>TETRAELEMIS CHUII</i> .....	14
2.3. UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS EM PANIFICAÇÃO .....	16
2.3.1. PÃO.....	16
2.3.2. BOLACHAS .....	18
2.3.3. MASSAS ALIMENTÍCIAS.....	19
2.3.4. OUTROS PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO .....	19
2.4. METODOLOGIAS.....	21
2.4.1. REOLOGIA.....	21
2.4.1.1. COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR.....	23
2.4.1.2. MICRO-DOUGHLAB .....	25
2.4.2. TEXTURA .....	27
2.4.2.1. EXTENSIBILIDADE DA MASSA .....	27
2.4.2.2. ANÁLISE DE PERFIL DE TEXTURA .....	29
2.4.3. COR .....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1. MATERIAIS.....	33
3.2. MÉTODOS.....	34
3.2.1. PREPARAÇÃO DOS PÃES .....	34
3.2.2. REOLOGIA DAS MASSAS DURANTE A MISTURA.....	35

3.2.3.	COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR DAS MASSAS.....	35
3.2.4.	AVALIAÇÃO DA TEXTURA .....	36
3.2.5.	AVALIAÇÃO DA EXTENSIBILIDADE DA MASSA.....	37
3.2.6.	MEDIÇÃO DA COR .....	38
3.2.7.	DETERMINAÇÃO DO PH .....	38
3.2.8.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ÁGUA .....	38
3.2.9.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE.....	39
3.2.10.	AVALIAÇÃO DAS PERDAS NA COZEDURA .....	39
3.2.11.	AVALIAÇÃO DO VOLUME DOS PÃES.....	39
3.2.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1.	REOLOGIA DAS MASSAS DURANTE A MISTURA.....	40
4.2.	COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR DAS MASSAS FERMENTADAS.....	42
4.3.	AVALIAÇÃO DA TEXTURA DAS MASSAS .....	45
4.4.	AVALIAÇÃO DA EXTENSIBILIDADE DAS MASSAS .....	47
4.5.	DETERMINAÇÃO DO PH.....	50
4.6.	MEDIÇÃO DA COR DAS MASSAS .....	51
4.7.	AVALIAÇÃO DA TEXTURA DO PÃO.....	52
4.8.	MEDIÇÃO DA COR DO PÃO.....	55
4.8.1.	COR DA CÔDEA .....	55
4.8.2.	COR DO MIOLO .....	57
4.9.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ÁGUA, DO TEOR DE HUMIDADE, DAS PERDAS NA COZEDURA E DO VOLUME DOS PÃES.....	58
5.	CONCLUSÃO .....	61
6.	BIBLIOGRAFIA.....	63

## Índice de Figuras

Figura 1- Esquema ilustrativo da sequência de fabricação de pão (Adaptado de: Cauvain, 2012).....	7
Figura 2 - Novas tendências para 2021 (New Nutrition Business, 2020) .....	9
Figura 3 - <i>Chlorella vulgaris</i> (vista microscópica) Fonte: (University of Texas at Austin, 2020).....	13
Figura 4 - <i>Tetraselmis chuii</i> (vista microscópica) Fonte: (University of Texas at Austin, 2020).....	14
Figura 5 - Varrimento de frequência de massas de pão de trigo com incorporação de <i>C. vulgaris</i> (0, 4 e 5%) (Graça, et al., 2018).....	24
Figura 6 - Varrimento de tempo em massa de pão de trigo com incorporação de <i>C. vulgaris</i> (0, 1, 2, 3, 4 e 5%) (Graça, et al., 2018) .....	25
Figura 7 - Curva de mistura obtida pelo micro-doughLAB com identificação dos parâmetros a analisar. Adaptado de: (Perten Instruments, 2017).....	27
Figura 8 - Texturograma típico de um Teste de Perfil de Textura. Adaptado de: (Bourne, 2002).....	30
Figura 9 - Diagrama de cromaticidade (espaço de cor CIELab). Adaptado de: (Minolta, 2007).....	31
Figura 10 - Reómetro com sistema sensor de pratos paralelos serrados com massa de <i>C. vulgaris</i> .....	36
Figura 11 - Teste TPA em massa com incorporação de <i>C. vulgaris</i> .....	37
Figura 12 - Teste de extensibilidade da massa utilizando a sonda SMS/Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig.....	37
Figura 13- Curvas obtidas no micro-doughLAB para todas as formulações (controlo e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	40
Figura 14- Espectros mecânicos a 5°C das massas fermentadas controlo e com incorporação de microalgas ( <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> de duas origens distintas) .....	42
Figura 15 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 6,283 rad/s (1 Hz) das massas fermentadas controlo e com incorporação de microalgas ( <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).43	
Figura 16 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 62,83 rad/s (10 Hz) das massas fermentadas controlo e com incorporação de microalgas ( <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).43	
Figura 17 - Valores de firmeza das massas das diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	45
Figura 18 - Valores de coesividade das massas das diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	46

Figura 19 - Valores de elasticidade das massas das diferentes formulações (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	47
Figura 20 - Força máxima aplicada durante o teste de extensibilidade às massas (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	48
Figura 21 - Distância à qual ocorre a força máxima aplicada durante o teste de extensibilidade às massas (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ) .....	48
Figura 22 – Área total sob a curva traçada durante o teste de extensibilidade às massas (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ), correspondente à energia aplicada.....	49
Figura 23 - Taxa de alongamento das massas das diferentes formulações (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	50
Figura 24 - Valores de firmeza inicial dos pães com as diferentes formulações (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	52
Figura 25- Valores de coesividade dos pães com as diferentes formulações (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ).....	53
Figura 26 - Evolução da firmeza dos pães (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ) ao longo do tempo de armazenamento, letras diferentes correspondem a resultados significativamente diferentes para o mesmo tempo ( $p < 0,05$ ).....	54
Figura 27 - Cinética de envelhecimento dos pães controle e com incorporação das microalgas ( <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ) .....	54
Figura 28 - Fotografias de fatias de pão. A) Controle B) <i>T. chuii</i> C) <i>C. vulgaris</i> A2F D) <i>C. vulgaris</i> Allmicroalgae.....	58

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Ingredientes fundamentais do pão e suas principais funções (Adaptado de: Mondal, et al., 2008).....	6
Tabela 2 - Composição bioquímica média de microalgas, em % (Barkia, et al., 2019) .....	12
Tabela 3 - Métodos reológicos utilizados em panificação.....	22
Tabela 4 - Valores médios de características de extensibilidade retirados da literatura .....	28
Tabela 5 - Correlação entre os sinais dos parâmetros $a^*$ e $b^*$ e o intervalo da tonalidade (Choudhury, 2014) .....	32
Tabela 6 - Composição nutricional das microalgas utilizadas.....	33

Tabela 7 - Descrição dos ingredientes e respectivas gramagens utilizadas na formulação dos pães, as gramagens de sal, levedura, açúcar e SSL são dadas em função da massa de farinha utilizada .....	34
Tabela 8- Parâmetros médios obtidos do micro-doughLAB para as diferentes formulações (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ) .....	41
Tabela 9 - Valores ajustados para as equações da Lei da potência, letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações ( $p>0,05$ ) ...	44
Tabela 10 - Valores de pH das massas fermentadas de cada uma das formulações em estudo. ....	51
Tabela 11 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b*, saturação da cor, a tonalidade da cor e a diferença total de cor das massas fermentadas (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ). ....	51
Tabela 12 - Parâmetros da cinética de envelhecimento retirados das regressões lineares efetuadas .....	55
Tabela 13 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b*, saturação da cor, a tonalidade da cor e a diferença total de cor das côdeas dos pães (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ). ....	56
Tabela 14 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b*, saturação da cor, a tonalidade da cor e a diferença total de cor dos miolos dos pães (controle e com incorporação das microalgas <i>T. chuii</i> e <i>C. vulgaris</i> ). ....	57
Tabela 15 - Valores de atividade da água ( $a_w$ ), humidade, volume, volume específico e perdas na cozedura dos diferentes pães. ....	59

## Lista de Abreviaturas e Siglas

A2F – Algae to Future

$a_w$  – Atividade da água

Cv – *Chlorella vulgaris*

Cv Allmicroalgae – *Chlorella vulgaris* comercial da marca Allma by Allmicroalgae

DHA – Docosahexaenoic Acid/Ácido Docosahexaenoico

EFSA – European Food Safety Authority/Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

EPA – Eicosapentaenoic Acid/Ácido Eicosapentaenoico

GF – Gluten Free / Isento de glúten

GFB – Gluten Free Bread / Pão isento de glúten

ISA – Instituto Superior de Agronomia

PUFA – Polyunsaturated fatty acid/Ácidos gordos polinsaturados

Tc – *Tetraselmis chuii*

TPA – Texture Profile Analysis/Análise de Perfil de Textura

WA – Water absorption/Absorção de água

## 1. Introdução e objetivos

A presente dissertação foi realizada no âmbito do Projeto “A2F – *Algae To Future*”<sup>1</sup>, projeto este que é financiado pelo *Research Council of Norway* e que conta com 26 parceiros internacionais, incluindo Portugal, e, mais concretamente, o Instituto Superior de Agronomia (ISA). Este projeto pretende explorar o potencial das microalgas como ingrediente saudável para a alimentação humana e animal. O grupo de trabalho onde se insere o ISA tem com objetivo explorar o potencial da adição de biomassa de microalgas no aumento da qualidade nutricional do pão, mantendo uma elevada qualidade sensorial do pão.

As microalgas são ingredientes sustentáveis, com uma reduzida pegada de carbono no processo de produção, e com inúmeros compostos biológicos de interesse, desde compostos com propriedades antioxidantes, a compostos anti-tumorais e a compostos anti-inflamatórios, entre outros (Gouveia, et al., 2010; Abd El Baky, et al., 2015; Ghaly, et al., 2015; Vieira, et al., 2020a). Estas apresentam também um elevado valor nutricional, sendo de salientar a constituição em proteína e ácidos gordos polinsaturados omega-3 (Gouveia, et al., 2008). Ao longo das últimas décadas têm vindo a ser desenvolvidos vários produtos com microalgas, desde pão (Achour, et al., 2014; Ak, et al., 2016; Diprat, et al., 2020; Figueira, et al., 2011; Finney, et al., 1984; García-Segovia, et al., 2017; Graça, et al., 2018; Khemiri, et al., 2020; Lafarga, et al., 2019; Mostolizadeh, et al., 2019; Nunes, et al., 2020a; Nunes, et al., 2020b; Sanjari, et al., 2018; Tertychnaya, et al., 2020), a bolachas (Abd El Baky, et al., 2015; Babuskin, et al., 2014; Batista, et al., 2017; Batista, et al., 2019; Bolanho, et al., 2014; Donato, et al., 2019; Ghaly, et al., 2015; Gouveia, et al., 2007; Gouveia, et al., 2008; Hossain, et al., 2017; Lafarga, et al., 2019; Morais, et al., 2006; Onacik-Gür, et al., 2018; Sahni, et al., 2019; Singh, et al., 2013; Uribe-Wandurraga, et al., 2020; Vieira, et al., 2020a), a massas alimentícias (Babuskin, et al., 2014; Fradinho, et al., 2020; Fradique, et al., 2010; Fradique, et al., 2013; Mostolizadeh, et al., 2019; Rodríguez De Marco, et al., 2014; Zouari, et al., 2011) e a outros produtos de panificação (García-Segovia, et al., 2020; Golmakani, et al., 2015; Lucas, et al., 2017; Lucas, et al., 2018; Niccolai, et al., 2019; Tańska, et al., 2017; Uribe-Wandurraga, et al., 2019).

A *Tetraselmis chuii* é uma microalga verde, unicelular, com propriedades interessantes para a saúde humana. Esta tem sido utilizada em aquacultura e biorrefinaria devido à sua riqueza em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia longa. A incorporação desta microalga na massa do pão confere alguma cor, e esta pode

---

<sup>1</sup> **Projeto financiado pelo Research Council of Norway’s BIONÆR Programme** project no: 267872/E50 A2F – *Algae to Future*, setembro 2017- dezembro 2021.

influenciar a estrutura e as propriedades sensoriais, ao mesmo tempo que incrementa o teor de proteínas do produto, fornecendo ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e compostos bioativos, tais como, vitamina E, clorofila e carotenoides, compostos estes que possuem uma elevada capacidade antioxidante (Mohammadi, et al., 2015; Batista, et al., 2017; Batista, et al., 2019; Nunes, et al., 2020a).

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga verde, unicelular, que também apresenta vários compostos benéficos para a saúde. Esta tem sido utilizada na alimentação de animais terrestres bem como aquáticos. A *Chlorella vulgaris* é frequentemente comercializada como "alimento saudável" e tem vindo a ser promovida com alimento funcional para prevenir, curar ou ajudar no tratamento de doenças comuns ou agudas como a doença de Alzheimer e cancro, entre outras (Koyande, et al., 2019; Nunes, et al., 2020b; Vieira, et al., 2020b).

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo do impacto da adição de diferentes microalgas nas propriedades reológicas das massas e nos parâmetros de qualidade de pães de trigo com incorporação das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chuii*, usando uma formulação previamente desenvolvida (Graça, et al., 2018). Foi feita a avaliação instrumental da textura, da cor e da reologia das massas (testes empíricos no micro-doughLAB e testes dinâmicos no reómetro), e a avaliação da textura, da cor e de parâmetros de qualidade dos pães.

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* produzidas por parceiros noruegueses do projeto Algae2Future. No entanto, de forma a comparar os resultados com as microalgas atualmente disponíveis no mercado utilizou-se também *Chlorella vulgaris* produzida pela Allmicroalgae.

A pandemia induzida pelo Coronavírus SARS-CoV-2 conduziu a uma alteração do plano de trabalho inicialmente estabelecido, levando ao cancelamento de algumas tarefas e a um maior foco na revisão bibliográfica sobre o tema. Os temas abordados na revisão bibliográfica são o pão, as microalgas, e especialmente a aplicação destas em produtos de panificação, e também as metodologias de avaliação das propriedades físicas das massas e pães desenvolvidos.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Pão

#### 2.1.1. História

O pão é um dos produtos de origem cerealífera mais importantes. Em todo o mundo tem sido considerado um alimento básico e de grande valor para a nutrição e a economia humana. Acredita-se que ele tenha sido originado em tempos pré-históricos, inicialmente produzido como pão sem fermento ou parcialmente fermentado, e, somente, depois como fermentado (Papadimitriou, et al., 2019).

A documentação da produção e do consumo de pão de massa fermentada remonta a vários milênios antes de Cristo (Papadimitriou, et al., 2019).

A população egípcia foi a primeira a misturar farinha com água, deixando esta fermentar e aumentar de volume e, finalmente, assando-a junto com massa fresca, produzindo pães leves e macios (Papadimitriou, et al., 2019). Foram encontrados resíduos de pão em túmulos egípcios antigos cerca de 1500 aC (Rubel, 2011).

Os gregos antigos adotaram o costume de uso de massa fermentada do Egito por volta de 800 aC. Antes de 500 aC, a panificação era feita por mulheres, passando mais tarde a ser realizada por profissionais. Numerosas referências em textos gregos antigos contêm informações sobre os cereais utilizados, os tipos de pão que eram produzidos, bem como os métodos de cozimento dos mesmos (Papadimitriou, et al., 2019).

Posteriormente, os romanos, que consumiam principalmente cereais torrados ou cozidos, aprenderam o processo de cozedura e a técnica de construção de fornos para pão, aperfeiçoando a fabricação do pão. Além disso, introduziram regulamentações sobre a fabricação e distribuição de pães por padeiros, originalmente, estes eram intitulados de pistores, que criaram a primeira associação, denominada “collegium pistorum” (Papadimitriou, et al., 2019).

Na Europa Central (atual Áustria, Alemanha e Suíça), as pessoas têm vindo a produzir de forma consistente, há mais de 5000 anos, pão acidificado e fermentado, tendo sido descoberto este tipo de pão datado de 3600 aC perto de Bern na Alemanha (Papadimitriou, et al., 2019).

#### 2.1.2. Ingredientes

São apenas necessários dois ingredientes para fazer pão: farinha de cereais e água. Acidentalmente descobriu-se que o fermento conduzia a pães mais saborosos e leves. Posteriormente descobriu-se, também, que a adição de sal conduzia a pães mais saborosos. Atualmente são utilizados ainda outros ingredientes para suprir as expectativas dos consumidores modernos, isto é, maior poder de conservação, melhor

sabor, melhor textura e outras melhorias físicas e sensoriais. Para além disso, a localização geográfica e os hábitos culturais influenciam os ingredientes utilizados (Moore, 2016).

Os ingredientes mais importantes para fazer pão são a água e a farinha uma vez que são os que afetam mais a textura e o miolo. Expressa-se sempre a farinha em 100% e os restantes ingredientes em percentagem desse peso. Se a massa contiver aproximadamente 50% de água o pão fica leve e de textura fina. No entanto, na sua maioria os pães artesanais contêm entre 60% a 75% de água (Mondal & Datta, 2008).

O pão é um alimento que se inclui na categoria de produto fermentado, uma vez que é obtido pela fermentação dos açúcares da farinha de trigo libertados do amido pela ação de enzimas naturais da farinha. Esta fermentação é realizada pelo fermento de padeiro, que é o nome comercial para o organismo *Saccharomyces cerevisiae*. Durante o processo de fermentação o açúcar é convertido em água e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Pela ação da temperatura, o CO<sub>2</sub> e o vapor de água expandem-se agindo como um agente isolante, prevenindo uma alta taxa de aumento da temperatura do miolo de pão e a possibilidade de evaporação excessiva de humidade. Pode utilizar-se uma adição de açúcar para promover o início da fermentação, enquanto o sal é adicionado para fortalecer a rede de glúten. Pode adicionar-se gordura para aumentar a facilidade de corte (Mondal & Datta, 2008).

Em alternativa às leveduras comerciais é possível utilizar-se massas-mãe. As massas-mãe são usualmente preparadas a partir de uma mistura de farinha, geralmente de trigo ou centeio, água e sal, que é fermentada espontaneamente por bactérias lácticas e leveduras. Os principais produtos finais desta fermentação espontânea são ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono, sendo estes os compostos que fornecem o sabor, aroma ácidos e o volume característicos aos pães obtidos. Com base na tecnologia aplicada, estão definidos quatro tipos de massa-mãe: Tipo I - Seleção Espontânea de Microrganismos, Tipo II - Uso de culturas iniciais, Tipo III - Massa-mãe Tipo II Desidratada e Tipo IV – Massa-mãe Mista (Papadimitriou, et al., 2019). Alguns exemplos dos microrganismos presentes nestas massas-mãe são *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* (Papadimitriou, et al., 2019).

As mudanças bioquímicas decorrentes da ação de enzimas influenciam muito as características da massa fermentada e, conseqüentemente, a qualidade do pão. Estas enzimas são as produzidas pelos microrganismos e as presentes na farinha nativa. A fermentação recorrendo a massa-mãe provoca alterações na textura, sabor, vida útil e valor nutricional dos produtos de panificação. No que respeita à textura do pão, o glúten contribui determinantemente para a viscosidade e elasticidade da massa. No entanto, e

dependendo da produção de ácido láctico e acético pelas estirpes de bactérias lácticas, a fermentação com massa-mãe também leva a um aumento na extensibilidade e elasticidade do pão, uma vez que a presença de um ambiente mais ácido causa maior aumento de volume e solubilidade das proteínas do glúten. Adicionalmente, a atividade proteolítica das bactérias lácticas e das leveduras permite uma maior retenção do dióxido de carbono influenciando positivamente o volume do produto final (Papadimitriou, et al., 2019).

O sabor do pão é influenciado pelos ingredientes, pelos metabolitos das reações enzimáticas das bactérias lácticas e das leveduras e das reações induzidas termicamente durante a cozedura. O pão com massa-mãe tem teor de compostos voláteis mais elevado. Muitos compostos voláteis são responsáveis pelo odor alcoólico, frutado, maltado e ácido, garantindo um aroma intenso no pão de massa-mãe (Papadimitriou, et al., 2019).

A digestibilidade do pão de massa-mãe é mais elevada em comparação com a do pão convencional, uma vez que a maior parte do amido é metabolizada, afetando o índice glicémico do produto final. Algumas bactérias lácticas das massas-mãe mostraram atividades de hidrólise da prolamina, proteína envolvida na intolerância a cereais (Papadimitriou, et al., 2019).

Quando a massa é devidamente assada transformando-se em pão, surge um produto com qualidade e características sensoriais superiores. O pão fresco apresenta geralmente uma crosta acastanhada e crocante com aspeto apelativo, um aroma agradável, características de corte finas, uma textura do miolo macia e elástica e um paladar húmido. Hoje em dia, a mecanização, a produção em larga escala e o aumento da procura do consumidor por conveniência e tempo de prateleira mais elevado criaram a necessidade da utilização de aditivos alimentares funcionais, como emulsionantes e agentes que retardam o envelhecimento do pão, para atingir a qualidade desejada. A adição de emulsionantes é particularmente importante para a panificação industrial, uma vez que estes conferem maior força à massa para suportar a manipulação à máquina, melhoram a taxa de hidratação, melhoram a estrutura do miolo, melhoram as características de corte, melhoram a capacidade de retenção de gás e estendem o tempo de prateleira (Mondal & Datta, 2008).

Na Tabela 1 estão apresentados os ingredientes fundamentais do pão e as suas principais funções.

Tabela 1 - Ingredientes fundamentais do pão e suas principais funções (Adaptado de: Mondal, et al., 2008)

<b>Ingrediente</b>	<b>Função</b>
<b>Farinha de trigo</b>	Forma estrutura e fornece corpo; Contribui com proteínas formadoras de glúten; Contribui com amido para a formação do miolo.
<b>Água</b>	Hidrata as proteínas da farinha e o amido danificado; Atua como solvente para outros ingredientes; Controla a temperatura da massa; Contribui para o tempo de prateleira.
<b>Sal</b>	Aumenta o sabor do produto; Fortalece a rede de glúten; Controla a taxa de fermentação.
<b>Levedura</b>	Fornece fermento; Metaboliza açúcares fermentáveis em CO <sub>2</sub> e álcool; Os produtos da fermentação contribuem para o sabor do pão.

O que confere uma estrutura única às massas com farinha de trigo é a sua matriz viscoelástica de glúten. As proteínas que compõem o glúten são a principal forma de armazenamento de proteínas nos grãos de trigo (Masure, et al., 2016). A Gliadina é descrita como a fração proteica solúvel em etanol a 70%, estando presente na forma de proteína monomérica, enquanto a Glutenina é a fração proteica não solúvel em água, soluções salinas diluídas e etanol a 70% e é referida como a fração proteica polimérica do glúten (El Khoury, et al., 2018). Apesar de ainda não serem conhecidas a estrutura exata e as interações entre estas proteínas, estando ainda em debate, é aceite que as gliadinas aumentam a viscosidade, enquanto as gluteninas conferem as propriedades elásticas (El Khoury, et al., 2018).

No processamento dos cereais, o glúten refere-se como a combinação das gliadinas (prolaminas) com as gluteninas do trigo (El Khoury, et al., 2018). Glúten é também um termo que nutricionalmente se refere a algumas prolaminas contidas em alguns cereais, tais como, trigo, centeio, cevada, ou variedades cruzadas dos mesmos e possivelmente a aveia (El Khoury, et al., 2018). A fração proteica composta pelo glúten proporciona propriedades estruturais únicas (El Khoury, et al., 2018). O glúten em farinhas de trigo origina uma rede tridimensional aquando da sua correta hidratação e amassadura (El Khoury, et al., 2018), isto é, na presença de água e sob trabalho mecânico (Padalino, et al., 2016). Na panificação, estas estruturas são utilizadas para criar massas com

matrizes viscoelásticas (El Khoury, et al., 2018). Estas proteínas são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas das massas com farinha de trigo (Masure, et al., 2016).

### 2.1.3. Processo

A fabricação do pão a nível industrial pode ser levado a cabo com equipamentos distintos e com fases mais ou menos diferenciadas, mas em termos gerais segue a sequência de etapas resumidas na Figura 1.



Figura 1- Esquema ilustrativo da sequência de fabricação de pão (Adaptado de: Cauvain, 2012)

De salientar que o pão deve a sua particularidade não só aos ingredientes e equipamentos utilizados no seu fabrico, mas também aos diferentes processos de confeção da massa. Muitos desses processos são de origem geográfica ou cultural e atualmente ainda são utilizados nas regiões de origem. Por outro lado, com a globalização do comércio, os consumidores passaram a exigir produtos que originalmente não eram familiares à sua cultura. Assim, não é difícil encontrar produtos tais como pão francês na América, tortilhas de farinha na Austrália ou pão pita em Hong Kong. Em suma, para se alcançar as características únicas dos diferentes pães, muitas vezes é necessário o uso de um processo específico de fabricação da massa (Moore, 2016).

#### 2.1.4. Novas tendências de consumo

As novas tendências de consumo dividem-se em duas categorias principais: as motivadas por preocupações nutricionais e as motivadas por questões de saúde.

As principais tendências motivadas por preocupações nutricionais passam pelo enriquecimento das farinhas. Anteriormente, eram utilizados produtos lácteos, tais como, leites em pó e soro de leite, mas, neste momento, estão a ser mais exploradas fontes vegetais. Dentro destas fontes vegetais as que estão a ter maior atenção são (Rosell, 2019):

- a adição de inulina, como fonte de fibra;
- a incorporação de farinhas de trigo em diferentes estados de maturação;
- a utilização de trigo germinado, aumentando o teor de proteína e diminuindo a digestibilidade do amido;
- a suplementação com farinha de trigo rica em aleurona, para produção de pães mais ricos em proteína, lípidos e minerais;
- o enriquecimento com farinhas alternativas (toranja e bagas de sabugueiro, entre outras), pelo aumento dos polifenóis;
- a inclusão de legumes liofilizados, para aumento das propriedades antioxidantes;
- a incorporação de microalgas.

No caso das tendências motivadas por questões de saúde poderá referir-se (Rosell, 2019):

- a redução do teor de sal;
- a redução do teor de oligossacáridos, dissacáridos, monossacáridos e polióis fermentáveis, ligados com algumas doenças tais como o Síndrome do Intestino Irritável;
- o desenvolvimento de novos processos que melhoram os benefícios do pão para a saúde, como por exemplo, a utilização de raios ultravioleta para a conversão do ergosterol produzido na fermentação em vitamina D2;
- o aumento da capacidade antioxidante, por aumento dos polifenóis, que são responsáveis pelo decréscimo do risco de doenças cardiovasculares;
- o aumento da resposta glicémica e o aumento da saciedade, por adição de extratos de plantas ricas em polifenóis.

Outra das tendências é a menor utilização de aditivos "químicos" para fornecer as qualidades necessárias ao produto final, conhecido como *clean label* (Cauvain, 2012).

Segundo a New Nutrition Business (2020), as megatendências para 2021 são: utilização de ingredientes funcionais, a fragmentação, o bem-estar com o peso, a snackificação e a sustentabilidade. Para além das megatendências, esta empresa também definiu as seguintes tendências-chave para 2021: menos e melhores hidratos de carbono; potência da proteína animal; proteínas alternativas; bem-estar digestivo; as plantas tornadas convenientes; imunidade; diminuição da doçura; alimentos emergentes para o humor e a mente; e o poder da proveniência (Figura 2).



Figura 2 - Novas tendências para 2021 (New Nutrition Business, 2020)

Para a empresa Innova Market Insights, a principal tendência para o ano 2021 é a transparência em toda a cadeia de abastecimento, motivada pela procura de marcas que possam construir confiança, fornecer produtos autênticos e criar a confiança do consumidor no clima atual e pós pandemia (Food Processing, 2020).

O Innova Consumer Survey 2020 revela que seis em cada dez consumidores estão interessados em aprender mais sobre a origem dos alimentos. Nesse sentido, o aumento da transparência no rótulo é fundamental para corresponder à procura por produtos éticos, sustentáveis e *clean label*. Os *clean labels* incluem o bem-estar humano e/ou animal, a transparência da cadeia de fornecimento, a nutrição baseada em plantas e produção sustentável (Food Processing, 2020).

Outra tendência são os alimentos à base de plantas. A definição de *plant based* está em constante evolução. A sua crescente popularidade fará com que, em 2021, exista

uma procura acelerada por novos formatos, proteínas vegetais e alternativas mais sofisticadas. O Innova Consumer Survey 2020 indicou que as quatro principais razões para a procura de alimentos à base de plantas são a saúde, a variedade da dieta, a sustentabilidade e o sabor dos produtos (Food Processing, 2020).

A nutrição personalizada também é uma das tendências para 2021, uma vez que cada vez mais consumidores procuram alimentos que se adequem aos seus estilos de vida (Food Processing, 2020).

Sendo de salientar, ainda, a tendência para produtos relacionados com o sistema imunológico no ano 2021. Esta tendência está relacionada com a ansiedade vivida durante a pandemia de coronavírus. Deste modo, a tendência é para que em 2021 se utilizem mais ingredientes que causem um aumento da imunidade (Food Processing, 2020).

A utilização de microalgas em alimentos enquadra-se na categoria de alimentos à base de plantas, fornece suporte ao sistema imunitário e na tendência das proteínas alternativas. Para além disso, enquadra-se na megatendência da sustentabilidade.

## 2.2. Microalgas

A procura por novos ingredientes alimentares saudáveis é uma estratégia para superar as carências alimentares esperadas nas próximas décadas. As microalgas estão na base da cadeia alimentar e podem ser consideradas como uma fonte interessante de nutrientes e compostos bioativos. A produção de alimentos enriquecidos com microalgas está a ganhar cada vez mais a atenção dos consumidores, à medida que estes tomam consciência das relações entre a dieta e a saúde (Graça, et al., 2018). As microalgas têm sido utilizadas na alimentação humana desde há milhares de anos (Lucas, et al., 2018).

As microalgas e as cianobactérias são microrganismos unicelulares e fotossintéticos, normalmente encontrados em ecossistemas aquáticos e de água doce. Apesar de as microalgas e as cianobactérias estarem localizadas em grupos filogenéticos diferentes, pois as cianobactérias são procarióticas e as microalgas são eucarióticas, estas são geralmente associadas no grupo das algas juntamente com as macroalgas. Estes organismos possuem mecanismos fotossintéticos semelhantes ao encontrado nas plantas terrestres, porém têm uma maior eficiência na conversão da energia solar em biomassa, relacionado com o mais fácil acesso à água, ao dióxido de carbono e a outros nutrientes. Além disso, estes microrganismos são conhecidos por produzirem mais de metade do oxigénio da Terra, o que lhes confere um papel de destaque em termos de sustentabilidade e mitigação de CO<sub>2</sub> (Vieira, et al., 2020b).

As microalgas têm a função importante de produtores primários na maior parte das cadeias alimentares marinhas. Estas são caracterizadas pela sua elevada diversidade e pela sua potencial aplicação com fonte de compostos naturais para aplicações biotecnológicas e terapêuticas. Na realidade estas convertem substâncias inorgânicas em matéria orgânica rica em lípidos, proteínas, glúcidos e outras moléculas bioativas. Devido ao seu elevado valor nutricional têm sido extensamente utilizadas como alimento em sistemas de aquacultura (García-Segovia, et al., 2017).

O **elevado teor de proteína** em várias espécies de microalgas é uma das principais razões pelas quais são consideradas como fontes não convencionais de proteínas (Batista, et al., 2013), mas também de óleos (Babuskin, et al., 2014). As microalgas também representam uma fonte importante de vitaminas, minerais, antioxidantes e corantes naturais. Deste modo, a incorporação destas nos alimentos pode ser utilizada para proporcionar cor, aumentar o valor nutricional e melhorar a textura ou resistência às oxidações. A incorporação de microalgas em alimentos tradicionais é uma forma de produzir novos produtos saudáveis (Batista, et al., 2013), sendo de destacar a importância da sua incorporação em alimentos de grande consumo, como é o pão. Estes microrganismos também são capazes de acumular elementos com alto valor nutricional,

tais como ácidos gordos essenciais, aminoácidos essenciais, ficocianinas e carotenoides (Lucas, et al., 2018).

As microalgas são potenciais fontes de compostos naturais que podem ser **utilizados como ingredientes funcionais**. O número de espécies de microalgas disponíveis é elevado sendo o conhecimento da composição química um primeiro passo obrigatório numa metodologia de rastreio, permitindo determinar quais os compostos de valor presentes nas microalgas, tais como, pigmentos, antioxidantes, ácidos gordos polinsaturados (PUFA), entre outros (Batista, et al., 2013).

A composição nutricional das microalgas é muito variável, mesmo dentro da mesma espécie (Bernaerts, et al., 2018). Esta variabilidade deve-se em parte à resposta fisiológica aos fatores bióticos e abióticos, tais como a intensidade luminosa, o fotoperíodo, a temperatura, a disponibilidade de nutrientes e a fase de crescimento (Barkia, et al., 2019). A variação dos fatores de produção das microalgas origina produtos finais com composição nutricional muito variada, podem ser encontrados dados sobre a composição das microalgas com intervalos de 9 a 77% de proteínas, 6 a 54% de hidratos de carbono e 4 a 74% de lipídios em produção autotrófica (Hu, 2013; Bernaerts, et al., 2018). O modo de produção (autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico) também tem implicações severas na composição nutricional, existindo, por exemplo, estudos do seu impacto no conteúdo lipídico (Fang, et al., 2004), conteúdo fenólico e atividade antioxidante (Shetty & Sibi, 2014).

Na Tabela 2 estão representadas composições bioquímicas médias de algumas microalgas e cianobactérias, sendo possível observar a grande diversidade de composição das mesmas (Barkia, et al., 2019).

Tabela 2 - Composição bioquímica média de microalgas, em % (Barkia, et al., 2019)

	Lípidos	Proteínas	Glúcidos
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-22	51-58	12-17
<i>Tetraselmis chuii</i>	12	31-46	25
<i>Nannochloropsis</i> sp.	22	30	10
<i>Isochrysis galbana</i>	11	27	34
<i>Spirulina maxima</i>	6-7	60-71	13-16

O processamento primário das microalgas pode ser por sedimentação, coagulação-floculação, centrifugação, flutuação, filtração por membranas ou pela combinação de várias destas técnicas (Nitsos, et al., 2020). Após o tratamento primário podem ser realizados outros tratamentos que provocam disrupção celular e maior

rendimento de extração de compostos presentes no meio intracelular. A ruptura celular pode ser obtida através de métodos físicos (ultrassons, homogeneização de alta pressão, moagem por esferas e campo elétrico pulsado), métodos químicos (ácido, alcalino e por oxidação), métodos térmicos (hidrotérmicos, explosão de vapor) e biológicos (tratamento enzimático) (Nitsos, et al., 2020). O método de secagem (por spray-dryer ou liofilização) utilizado na produção de microalgas tem um forte impacto na biodisponibilidade dos compostos presentes nas microalgas (Nunes, et al., 2020b).

### 2.2.1. *Chlorella vulgaris*

A microalga *Chlorella vulgaris* é um microrganismo unicelular esférico com um diâmetro de 2 a 10 µm que possui vários elementos estruturais semelhantes às plantas (Figura 3). Esta microalga cresce em água doce e está presente no planeta Terra desde o período pré-câmbrico há 2,5 mil milhões de anos (Safi, et al., 2014).



Figura 3 - *Chlorella vulgaris* (vista microscópica) Fonte: (University of Texas at Austin, 2020)

Esta microalga pertence ao Reino *Plantae*, ao Filo *Chlorophyta*, à Classe *Trebouxiophyceae*, à Ordem *Chlorellales*, à Família *Chlorellaceae* e ao Género *Chlorella* (World Register of Marine Species, 2020). Apresenta uma elevada taxa de crescimento e responde a alterações das condições de crescimento, modificando o rendimento de um ou mais componente(s) específico(s). A *Chlorella vulgaris* é ideal para produção uma vez que é extremamente resistente a condições adversas e invasores. Por um lado, em condições de crescimento desfavoráveis, como limitação de azoto e fósforo, alta concentração de CO<sub>2</sub>, exposição excessiva à luz, excesso de ferro no meio ou aumento da temperatura, esta aumenta o seu conteúdo em lípidos e amido e diminui a produção da biomassa. Por

outro lado, em condições de crescimento normais e controladas (suplementação de azoto) esta aumenta o seu conteúdo em proteína (Safi, et al., 2014).

A *Chlorella vulgaris* pode ser utilizada para consumo humano na União Europeia. Esta não teve necessidade de aprovação como “Novel Food” (Regulamento (UE) 2015/2283, 2015), uma vez que já era consumida antes de 15 de maio de 1997.

### 2.2.2. *Tetraselmis chuii*

A microalga *Tetraselmis chuii* é um microrganismo flagelado unicelular elíptico ou quase esférico com 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possui 4 flagelos iguais em 2 pares opostos, a sua reprodução é assexuada (Figura 4) (Pulz & Gross, 2004; Borowitzka, 2018).

Esta microalga pertence ao Reino *Plantae*, ao Filo *Chlorophyta*, à Classe *Prasinophyceae*, à Ordem *Chlorodendrales*, à Família *Chlorodendraceae* e ao Género *Tetraselmis* (Pulz & Gross, 2004) (World Register of Marine Species, 2020).



Figura 4 - *Tetraselmis chuii* (vista microscópica) Fonte: (University of Texas at Austin, 2020)

A espécie de *Tetraselmis chuii* foi identificada como uma espécie promissora para a produção de antioxidantes uma vez que tem uma alta capacidade de inibição da peroxidação lipídica, uma elevada taxa de crescimento e é fácil de cultivar (Coulombier, et al., 2020). Esta tem sido usada em culturas ao ar livre como alimento para, por exemplo, larvas de moluscos bivalves (Pulz & Gross, 2004).

A *Tetraselmis chuii* tem um perfil nutricional semelhante ao de outras microalgas e, portanto, oferece muitos dos mesmos benefícios potenciais para uso em alimentos (Pulz & Gross, 2004). No que diz respeito às aplicações biotecnológicas, o género *Tetraselmis* é conhecido por possuir um alto teor de compostos bioativos com propriedades

antioxidantes, tais como, carotenoides, ácidos gordos polinsaturados, polissacarídeos solúveis em água, compostos fenólicos e vitaminas (Coulombier, et al., 2020). Esta apresenta todos os aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) tornando esta espécie uma fonte de proteína completa (Pulz & Gross, 2004).

A microalga *Tetraselmis chuii* foi aprovada para uso alimentar pelo Regulamento de Execução (UE) 2017/2470, sendo esta autorizada para incorporação em molhos (níveis máximos 250 mg/dia ou 20%), sais especiais (níveis máximos 1%), condimentos (níveis máximos 250 mg/dia) e suplementos alimentares, tal como definidos na Diretiva 2002/46/CE (níveis máximos 250 mg/dia), devendo estar rotulada como “liofilizado da microalga *Tetraselmis chuii*” ou “liofilizado da microalga *T. chuii*”.

## 2.3. Utilização de microalgas em panificação

O número de estudos sobre a utilização de microalgas em produtos alimentares tem vindo a aumentar. Estes estudos visam, nomeadamente, determinar o impacto na estrutura, composição nutricional e na aceitabilidade pelos consumidores. Nos seguintes tópicos encontra-se uma revisão dos estudos já realizados sobre a incorporação de microalgas e seus derivados em produtos de panificação.

### 2.3.1. Pão

Existem alguns estudos sobre incorporação de microalgas em pão, quer seja de trigo quer seja em pão sem glúten.

Em pão de trigo existem estudos sobre a incorporação de *Chlorella vulgaris* (Graça, et al., 2018; Nunes, et al., 2020b), *Spirulina platensis* (Ak, et al., 2016; Sanjari, et al., 2018), *Arthrospira fusiformis* (Achour, et al., 2014), *Tetraselmis* e *Nannochloropsis* (Lafarga, et al., 2019), *Dunaliella* (Finney, et al., 1984) e incorporação de *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis*, e *Nannochloropsis gaditana* (García-Segovia, et al., 2017). Existe também um estudo sobre os efeitos da incorporação de *Dunaliella salina* em pão de mistura (trigo e centeio) (Tertychnaya, et al., 2020).

A adição de Spirulina até 3% nos pães de trigo influencia o volume específico provocando uma diminuição deste (Achour, et al., 2014), a incorporação ideal sensorialmente é de 1% (Achour, et al., 2014). A adição de 10% tem um efeito positivo no aumento de proteína e de hidratos de carbono, não havendo diferenças significativas para a humidade e os lípidos, e apresenta também efeitos positivos na inibição do crescimento de fungos no pão armazenado fora do frigorífico (Ak, et al., 2016). A adição de 1% de Spirulina diminuiu a firmeza do pão (Sanjari, et al., 2018).

Num estudo recente sobre o impacto da disrupção celular nas características mecânicas de massas e pães de trigo com incorporação de microalga, não se observaram diferenças significativas na firmeza dos pães com adição de 1% de *Chlorella vulgaris* comercial (biomassa desidratada) e 1% de biomassa fresca de *Chlorella vulgaris* submetida a disrupção celular, mas apresentando estes valores de firmeza muito superiores ao pão com incorporação de 1% de *Chlorella vulgaris* fresca. Os autores atribuíram este resultado à maior libertação de macromoléculas, nomeadamente proteína, do interior das células sujeitas a disrupção, conduzindo ao aumento da firmeza dos pães produzidos (Nunes, et al., 2020b). Noutro estudo, pôde-se observar que a adição a 1 a 3% de *Chlorella vulgaris* desidratada (comercial) provoca um impacto positivo na reologia e nas características viscoelásticas das massas, pelo fortalecimento da rede de glúten, mas para uma maior percentagem de incorporação (4 e 5%) existe um impacto negativo

na reologia da massa, na textura e no sabor do pão, para além de uma aceleração do envelhecimento do pão (Graça, et al., 2018).

A adição de 1 a 3% de *Tetraselmis* e *Nannochloropsis* em pão de trigo afeta a cor de forma visível para o ser humano, tendo uma diferença total de cor para o controlo superior a 3, influencia negativamente o volume específico por diluição do amido e do glúten, e diminuição dos grânulos de amido completamente hidratados devido à competição pela água, reduz a humidade do pão, e não influencia a textura do pão, aumenta o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante (Lafarga, et al., 2019).

A incorporação de 1,5% de *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis*, e *Nannochloropsis gaditana* em pão de trigo não modifica a textura do pão, exceto a adesividade e a elasticidade que diminuem quando é incorporada *Isochrysis galbana* e a coesividade que diminui com a adição de *Nannochloropsis gaditana* (García-Segovia, et al., 2017).

Em pão isento de glúten existem poucos estudos sobre a incorporação de *Spirulina platensis* (Figueira, et al., 2011; Mostolizadeh, et al., 2019), *Chlamydomonas* sp. e *Nannochloropsis gaditana* (Khemiri, et al., 2020), *Chlorella sorokiniana* (Diprat, et al., 2020) e incorporação de *Tetraselmis chuii* (Nunes, et al., 2020a).

No caso da incorporação de *Arthrospira platensis* em pão isento de glúten, a adição desta até 4% não influencia o volume específico e a firmeza dos pães, havendo uma redução do volume específico e um aumento da firmeza para 5% de *Spirulina*. A adição desta microalga provoca uma melhoria da qualidade nutricional, nomeadamente, do conteúdo proteico. Quanto à cor, a adição de microalga provoca uma diminuição da luminosidade e a tendência para o aumento da tonalidade verde (Figueira, et al., 2011).

A incorporação de 1 e 3% de *Chlamydomonas* sp. e *Nannochloropsis gaditana* em pão sem glúten, à base de trigo sarraceno, farinha de arroz e amido de milho, conduz a um aumento dos lípidos e cinzas e produz um efeito estruturante na textura do pão (aumento da firmeza e da adesividade do miolo) embora não afete as propriedades de mistura da massa (Khemiri, et al., 2020).

A adição de 2,5 e 5% de *Chlorella sorokiniana* em pão sem glúten não provoca alteração no volume específico nem na textura, contudo, conduz a um aumento de proteína, luteína e ácidos gordos  $\omega$ -3 (Diprat, et al., 2020).

A substituição de farinha por *Tetraselmis chuii* do projeto A2F em pão sem glúten, também à base de trigo sarraceno, farinha de arroz e amido de milho, quando em níveis baixos, 1 e 2%, provoca funções viscoelásticas mais baixas nas massas e um aumento da firmeza e uma redução do volume dos pães. Com 4% de incorporação de biomassa microalgal, provoca um aumento do volume do pão e uma diminuição da firmeza do miolo.

O pão apresenta, ainda, um maior teor de compostos fenólicos totais e uma maior capacidade antioxidante, quando comparado com o pão controle (Nunes, et al., 2020a).

### 2.3.2. Bolachas

Quanto à incorporação em bolachas, existem diversos tipos de bolachas indo desde as “crackers” até bolachas de manteiga. As microalgas estudadas foram *Spirulina platensis* ou *Arthrospira platensis* (Morais, et al., 2006; Singh, et al., 2013; Bolanho, et al., 2014; Abd El Baky, et al., 2015; Ghaly, et al., 2015; Batista, et al., 2017; Onacik-Gür, et al., 2018; Batista, et al., 2019; Donato, et al., 2019; Uribe-Wandurraga, et al., 2020; Vieira, et al., 2020a), *Chlorella* sp. e *Chlorella vulgaris* (Gouveia, et al., 2007; Batista, et al., 2017; Batista, et al., 2019; Sahni, et al., 2019; Uribe-Wandurraga, et al., 2020), *Isochrysis galbana* (Gouveia, et al., 2008), *Nannochloropsis* sp. e *Nannochloropsis oculata* (Babuskin, et al., 2014; Lafarga, et al., 2019), *Haematococcus pluvialis* (Hossain, et al., 2017), *Tetraselmis* sp. e *Tetraselmis suecica* (Batista, et al., 2017; Batista, et al., 2019; Lafarga, et al., 2019) e *Phaeodactylum tricornutum* (Batista, et al., 2017; Batista, et al., 2019).

A adição de *Spirulina* conduz a um aumento do conteúdo proteico no caso de bolachas com incorporações de 2, 3, 5, 10 e 15% (Morais, et al., 2006; Bolanho, et al., 2014; Donato, et al., 2019), um aumento da cinza para incorporação de 5% (Bolanho, et al., 2014), uma diminuição da humidade (incorporações de 2, 3 e 5%) (Bolanho, et al., 2014; Onacik-Gür, et al., 2018), um aumento da firmeza (incorporações de 2 e 5%) (Bolanho, et al., 2014; Vieira, et al., 2020a) exceto num estudo onde se notou uma tendência para a diminuição da firmeza com o aumento da incorporação de *Spirulina* (incorporações de 1, 2 e 3%) (Onacik-Gür, et al., 2018), um aumento da atividade antioxidante para incorporações de 2, 3, 5 e 7% de *Spirulina* (Singh, et al., 2013; Bolanho, et al., 2014). No que toca à aceitabilidade dos produtos finais, a percentagem máxima de incorporação da microalga varia consoante os estudos, assumindo valores de 1% (Morais, et al., 2006) e 5% (Donato, et al., 2019), ou inaceitável a partir de 9% de incorporação (Ghaly, et al., 2015).

A maioria dos estudos afirma que ocorre um aumento da firmeza com a incorporação de microalgas (incorporações de: 0,5, 1, 2 e 3% de *C. vulgaris*; 1 e 3% de *I. galbana*; 1, 2 e 3% de *N. oculata*) (Gouveia, et al., 2007; Gouveia, et al., 2008; Babuskin, et al., 2014), no entanto existem casos em que tal não ocorre (incorporação de 5, 10 e 15% de *H. pluvialis*) (Hossain, et al., 2017). Vários estudos demonstraram a estabilidade da cor induzida pela adição de microalgas ao longo do tempo de armazenamento, concluindo que esta é estável (incorporações de 1 e 3% de *I. galbana*; 1, 2 e 3% de *N.*

*oculata*) (Gouveia, et al., 2008; Babuskin, et al., 2014; Batista, et al., 2017). É de salientar o aumento dos compostos fenólicos presentes nas bolachas com a incorporação de microalgas, existindo uma maior atividade antioxidante (incorporações de 2 e 6% de Spirulina, de *C. vulgaris*, de *T. suecica* e de *P. tricornutum*; 2,5% de *Tetraselmis* e *Nannochloropsis*) (Batista, et al., 2017; Batista, et al., 2019; Lafarga, et al., 2019).

### 2.3.3. Massas alimentícias

Em massas alimentares também existem alguns estudos de incorporação de microalgas. As algas estudadas foram Spirulina ou *Arthrospira platensis* (Zouari, et al., 2011; Rodríguez De Marco, et al., 2014; Mostolizadeh, et al., 2019; Fradinho, et al., 2020), *Nannochloropsis oculata* (Babuskin, et al., 2014), *Spirulina maxima* e *Chlorella vulgaris* (Fradique, et al., 2010), *Isochrysis galbana* e *Diacronema vlkianum* (Fradique, et al., 2013).

Estudos realizados até à data revelam que existe um aumento da capacidade antioxidante das massas com incorporações de 1, 2, 3, 5, 10 e 20% de Spirulina (Zouari, et al., 2011; Rodríguez De Marco, et al., 2014; Fradinho, et al., 2020). A adição das microalgas *Nannochloropsis oculata* (1 e 3%), *Isochrysis galbana* e *Diacronema vlkianum* (0,5, 1 e 2%) conduz a um aumento do ácido eicosapentaenoico (EPA) e do ácido docoexaenoico (DHA) presente nas massas (Babuskin, et al., 2014; Fradique, et al., 2013). A firmeza das massas antes da cozedura é maior nas massas com incorporação de microalgas do que no controlo (*Nannochloropsis oculata* (1 e 3%), Spirulina e *C. vulgaris* (0,5, 1 e 2%)) (Babuskin, et al., 2014; Fradique, et al., 2010). A estabilidade da cor conferida pela incorporação das microalgas mantém-se estável ao longo do tempo de armazenamento e depois da cozedura, embora existam diferenças notórias entre antes e depois da cozedura no caso de *Arthrospira platensis* (1 a 3%) em massa isenta de glúten (Fradinho, et al., 2020).

### 2.3.4. Outros produtos de panificação

Existem também outros estudos de incorporação de microalgas que não podem ser incluídos nas categorias anteriores mas que ainda pertencem aos produtos de panificação, tais como *snacks*, “crostini”, bolos e “breadsticks”. Assim, existem estudos de incorporação de Spirulina em *snacks* (Lucas, et al., 2017; Tańska, et al., 2017; Lucas, et al., 2018), “crostini” (Niccolai, et al., 2019), bolos (Golmakani, et al., 2015) e estudos sobre a incorporação de *Tetraselmis chuii* (García-Segovia, et al., 2020), *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* em “breadsticks” (Uribe-Wandurraga, et al., 2019).

Nos estudos em *snacks* verificou-se um aumento do teor de proteínas, lípidos e cinzas (2, 2,6, 3,2, 4, 6 e 8% Spirulina) (Lucas, et al., 2017; Tańska, et al., 2017; Lucas, et al., 2018) e uma diminuição da expansão (Lucas, et al., 2017; Tańska, et al., 2017). Em termos de textura, apenas, foi reportado o aumento da firmeza e a existência de uma estrutura compacta num estudo (Lucas, et al., 2017).

No estudo de incorporação de Spirulina em “crostini”, observou-se um aumento de proteína, um aumento do teor de fenóis e da atividade antioxidante, no caso de incorporações de 6 e 10%. A incorporação da microalga levou a uma menor digestibilidade das proteínas em comparação com o controlo (Niccolai, et al., 2019).

Nos bolos foi reportado que ocorria um aumento de proteína e de cinza, bem como uma diminuição dos parâmetros da cor e da firmeza dos bolos para incorporações de 0,5, 1,5 e 2,5% de Spirulina (Golmakani, et al., 2015).

No caso dos “breadsticks”, estes apresentaram uma diminuição da firmeza pela incorporação de 1,5% de Spirulina e de *C. vulgaris*, um aumento do teor em minerais e uma boa estabilidade da cor durante 15 dias de armazenamento (Uribe-Wandurraga, et al., 2019).

## 2.4. Metodologias

### 2.4.1. Reologia

A reologia é a ciência que estuda o escoamento e a deformação dos materiais. Geralmente, para a medição de um determinado comportamento reológico, é aplicada uma deformação bem definida ou uma tensão ao longo de um determinado tempo, sendo a resposta, tensão resultante, medida, ou vice-versa, para fornecer indicações sobre os parâmetros do material em estudo. Os parâmetros em estudo podem ser a rigidez, o módulo, a viscosidade, a firmeza, a resistência ou a tenacidade do material. Os objetivos gerais das medições reológicas são: obter uma descrição quantitativa das propriedades mecânicas dos materiais, obter informações relacionadas com a estrutura molecular e a composição do material, caracterizar e simular o desempenho do material durante o processamento e para controlo de qualidade (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003; Sousa, 2001).

As principais áreas de aplicação dentro da indústria alimentar são: o planeamento da planta da unidade (dimensionamento e seleção de bombas e tubos, cálculos de transferência de calor e massa, projetos de enchimento e outros cálculos de engenharia do processo envolvendo extrusoras, misturadores, revestidores e homogeneizadores); controlo de qualidade (da matéria-prima como do produto, em diferentes pontos do processo); avaliação de atributos sensoriais do produto (medição quantitativa de atributos de qualidade determinados pelo consumidor, estabelecendo correlações entre medições de reologia e dados sensoriais); e avaliação da estrutura do alimento e da conformação dos seus constituintes a nível molecular (McKenna & Lyng, 2001).

A reologia pode relacionar-se com a funcionalidade do produto, sendo alguns dos testes reológicos usado para tentar prever a qualidade do produto final, uma vez que medições em pequena escala em laboratório foram extrapoladas com sucesso para condições industriais. Assim, resultou a ideia de que testes em condições controladas em pequenas amostras alimentares bem definidas no laboratório podem ser relacionadas com situações maiores e mais complexas encontradas nas condições práticas de processamento (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003).

As técnicas reológicas, comumente são categorizadas de acordo com o tipo de tensão imposta, por exemplo, compressão, extensão, deformação e torção, entre outros, e também a magnitude relativa da deformação imposta. As principais técnicas utilizadas para medir as propriedades dos cereais têm sido, tradicionalmente, divididas em ensaios empíricos e ensaios fundamentais (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003).

Na indústria cerealífera, há um longo historial de uso de medidas empíricas descritivas de propriedades reológicas, com uma impressionante variedade de dispositivos engenhosos, como o Penetrómetro, o Texturómetro, o Consistómetro, o Amilógrafo, o Farinógrafo, o Mixógrafo, o MicrodoughLab, o Extensógrafo e o Alveógrafo, entre outros. Os testes empíricos são muito utilizados na indústria pois são fáceis de executar e aplicam-se a situações práticas na fábrica, fornecendo dados que são úteis na avaliação do desempenho durante o processamento e para o controlo de qualidade. Os instrumentos são frequentemente robustos, capazes de suportar ambientes de fábrica exigentes e não exigindo pessoal altamente qualificado para a sua utilização (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003). No entanto, são arbitrários, mal definidos, não têm um padrão absoluto e são eficazes apenas para um número limitado de alimentos (McKenna & Lyng, 2001).

Por oposição, os métodos fundamentais são conduzidos em um material impondo uma tensão bem definida e medindo a deformação resultante (ou taxa de deformação) ou, alternativamente, impondo uma deformação bem definida (ou taxa de deformação) e medindo a tensão desenvolvida.

Na Tabela 3 estão sistematizadas algumas das propriedades reológicas, em conjunto com o método utilizado e em que produtos.

Tabela 3 - Métodos reológicos utilizados em panificação

<b>Método</b>	<b>Produto</b>	<b>Propriedade medida</b>
<b>Empíricos:</b>		
<b>Farinógrafo, mixógrafo, microdoughLAB</b>	Massa	Tempo de mistura / torque
<b>Extensógrafo / Kieffer Rig</b>	Massa	Extensibilidade
<b>Alveógrafo</b>	Massa	Elasticidade biaxial
<b>Texturómetro, TPA</b>	Alimentos sólidos ou semi-sólidos	Firmeza e outros parâmetros de textura
<b>Fundamentais:</b>		
<b>Oscilatórios ou dinâmicos</b>	Fluidos, pastas, massas	Módulos de deformação dinâmico
<b>Rotacionais</b>	Fluidos, pastas, massas	Viscosidade dinâmica

Os testes oscilatórios dinâmicos medem propriedades reológicas (como os módulos elástico e viscoso) através da aplicação de modo sinusoidal oscilante de tensão ou deformação ao longo do tempo e medindo a resposta resultante. Estes têm a vantagem de ter uma base teórica bem desenvolvida e procederem à medição simultânea

dos módulos elástico e viscoso, enquanto a natureza não destrutiva do teste permite que várias medições sejam realizadas com a variação da temperatura, deformação ou frequência (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003).

#### 2.4.1.1. Comportamento viscoelástico linear

Os fluidos podem ser classificados em Newtonianos ou não Newtonianos. A maioria dos alimentos exhibe propriedades de sistemas viscoelásticos, sendo por isso, não Newtonianos. A massa de pão pode ser considerada o sistema mais único do ponto de vista da ciência dos materiais. Este é um sistema viscoelástico que exhibe um comportamento de deformação e tixotrópico, como consequência da estrutura complexa da massa em que os grânulos de amido (75-80%) são circundados por uma rede tridimensional de proteínas (20-25%) (Hadnađev, et al., 2011).

O reómetro permite realizar testes em regiões destrutivas ou não destrutivas do material. É possível realizar testes dinâmicos ou estáticos, dependendo da região de interesse (Tietze, et al., 2016).

Dois tipos diferentes de método estão disponíveis para determinar o comportamento viscoelástico linear: estático e dinâmico. Os testes estáticos envolvem a imposição de uma mudança gradual na tensão (ou deformação) e a observação da deformação (ou tensão) no tempo. Os testes dinâmicos envolvem a aplicação de uma deformação que varia de forma sinusoidal (Barnes, et al., 1989). Os testes estáticos podem ser conduzidos a uma tensão constante (testes de fluência) ou a uma deformação constante (teste de relaxação de tensão) (Tietze, et al., 2016). Os testes dinâmicos ou oscilatórios podem ser testes de varrimento de frequência, testes de varrimento de temperatura, testes de varrimento de tempo ou testes de varrimento de tensão/deformação (Rao, 2007).

Nos testes de varrimento de frequência, as componentes elástica ( $G'$ ) e viscosa ( $G''$ ) são determinadas em função da frequência ( $\omega$ ), a uma tensão e temperatura fixa. Estes testes fornecem dados numa ampla faixa de frequências. No entanto, se são necessários parâmetros fundamentais, cada teste deve ser estritamente realizado dentro da zona viscoelástica linear (Rao, 2007). Estes testes permitem avaliar o grau de estruturação das massas de pão (Graça, et al., 2018), como está representado na Figura 5.

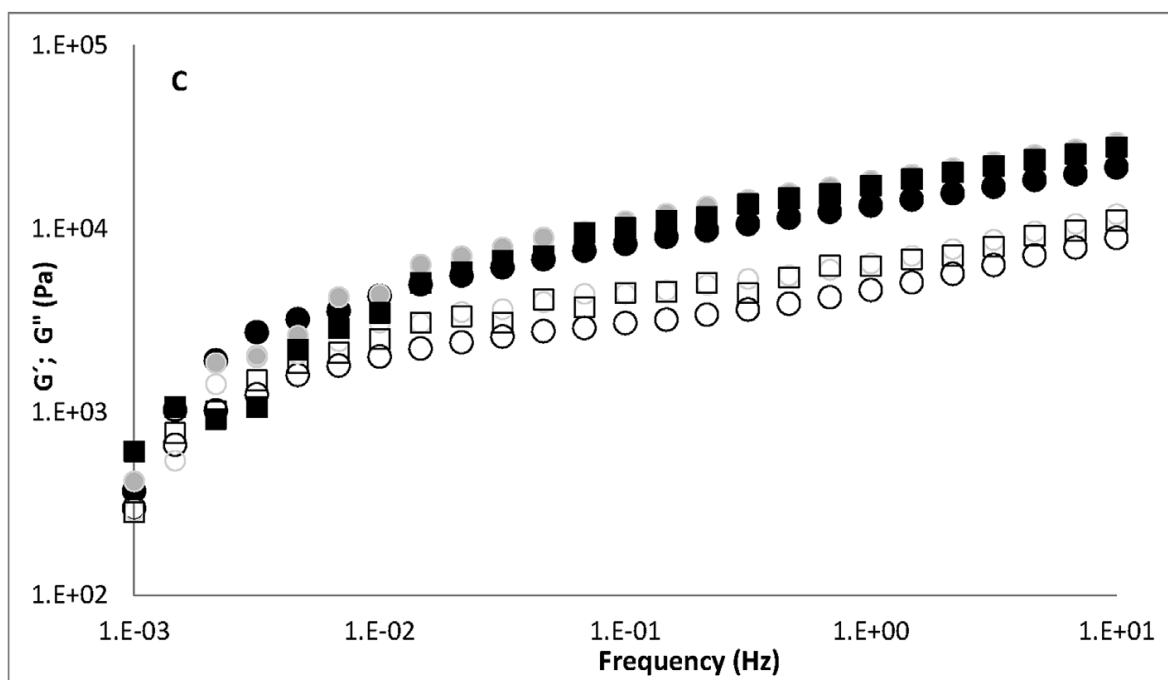


Figura 5 - Varrimento de frequência de massas de pão de trigo com incorporação de *C. vulgaris* (0, 4 e 5%) (Graça, et al., 2018)

Nos testes de varrimento de temperatura,  $G'$  e  $G''$  são determinados em função da temperatura uma frequência fixa. Este teste é adequado para o estudo da formação de géis durante o arrefecimento de uma dispersão aquecida, a gelatinização de uma dispersão de amido durante o aquecimento e a formação de géis de proteínas (Rao, 2007).

Nos testes de varrimento de tempo,  $G'$  e  $G''$  são determinados em função do tempo, a frequência e temperatura fixa. Esse tipo de teste é adequado para estudar o desenvolvimento da estrutura de géis (Rao, 2007) ou para estudo do comportamento de massa de pão durante a fermentação (Graça, et al., 2018), como está representado na Figura 6.

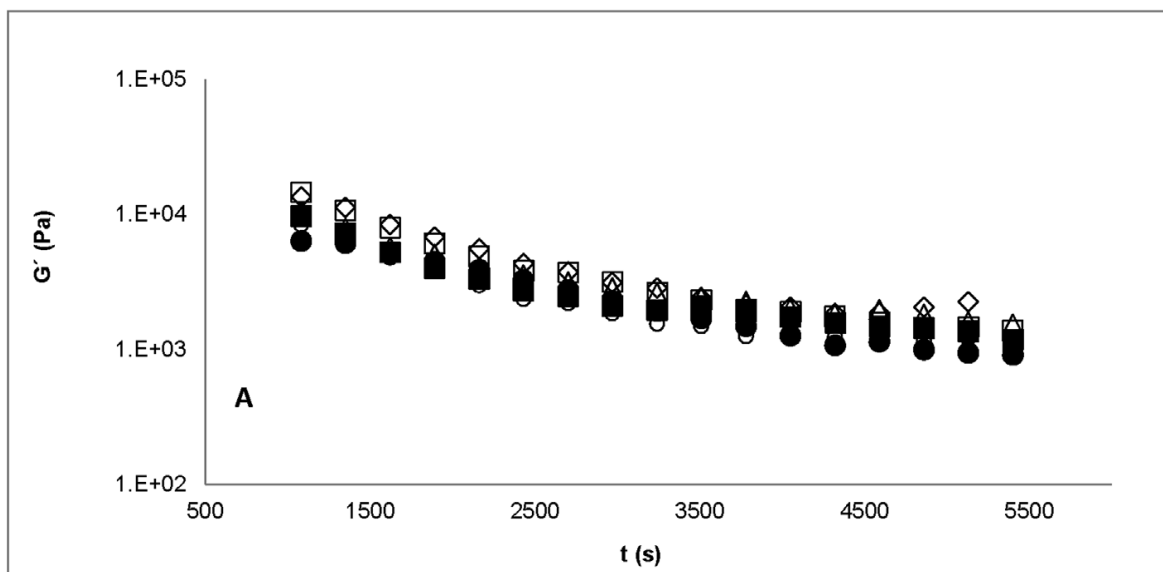


Figura 6 - Varrimento de tempo em massa de pão de trigo com incorporação de *C. vulgaris* (0, 1, 2, 3, 4 e 5%) (Graça, et al., 2018)

Para além dos testes dinâmicos descritos anteriormente, que devem ser conduzidos na zona de viscoelasticidade linear, outro teste pode ser conduzido para determinar a zona viscoelástica linear. Com um reómetro de tensão controlada, é possível realizar um teste no qual a tensão é aumentada continuamente, a uma frequência constante. À medida que a tensão aumenta, inicialmente o  $G'$  e o  $G''$  permanecem relativamente constantes até um valor crítico de tensão, onde o  $G'$  diminui drasticamente e o  $G''$  também diminui mas não tão acentuadamente. O valor da tensão aplicada no momento em que as curvas de  $G'$  e  $G''$  se cruzam é a tensão crítica à qual a estrutura da amostra se quebra e que para valores maiores de tensão alimento escoar (Rao, 2007).

A massa de pão é um material viscoelástico, embora extrinsecamente, se pareça com uma massa sólida, esta, quando é exposta a uma súbita deformação constante, atua como um fluido viscoelástico. O comportamento reológico dos produtos viscoelásticos é representado pelo módulo complexo  $G^*$  (em Pa):  $G^* = G' + i G''$ , onde  $G'$  é o módulo de armazenamento e representa a parte elástica que está em fase com a deformação durante a oscilação e  $G''$  é o módulo de dissipação que representa a parte viscosa que está desfasada (Tietze, et al., 2016).

#### 2.4.1.2. Micro-doughLAB

O micro-doughLab é um equipamento que realiza a mistura da amostra de farinha em estudo com uma quantidade específica de água para formar uma massa. A massa é então desenvolvida na cuba de mistura pela ação de duas lâminas de mistura em forma de sigma. Estas duas lâminas giram em velocidades diferentes, com uma relação de

velocidade de 10:7. Este equipamento apenas usa 4 g de amostra, enquanto os outros equipamentos para outros métodos empíricos utilizam maior quantidade de amostra, como, por exemplo, o farinógrafo que utiliza 50 ou 300 g de amostra (Perten Instruments, 2017).

Um dos parâmetros a determinar utilizando este equipamento é a quantidade de água que é necessário a farinha absorver para se atingir a consistência ideal da massa. A água é adicionada numa quantidade específica resultando numa consistência padrão de massa que se reflete num determinado torque (Perten Instruments, 2017).

À medida que a massa se desenvolve, a sua resistência à amassadura altera-se, e o equipamento regista esta resistência em termos de torque, num gráfico torque versus tempo (Figura 7) (Perten Instruments, 2017).

Os parâmetros obtidos são (Perten Instruments, 2017):

- resistência no pico - torque máximo atingido, medido a partir da curva do meio (mN.m);
- tempo de desenvolvimento da massa - o tempo que a massa leva para atingir o pico de resistência (segundos);
- estabilidade - a diferença entre os tempos de chegada e partida (segundos);
- índice de tolerância à amassadura - a diferença de torque entre a curva superior no tempo de desenvolvimento e a curva superior num tempo específico após o tempo de desenvolvimento (normalmente 5 minutos) (mN.m);
- *softening* (amolecimento) - a diferença de torque entre o pico de resistência e a curva do meio num tempo específico após o tempo de desenvolvimento (mN.m).

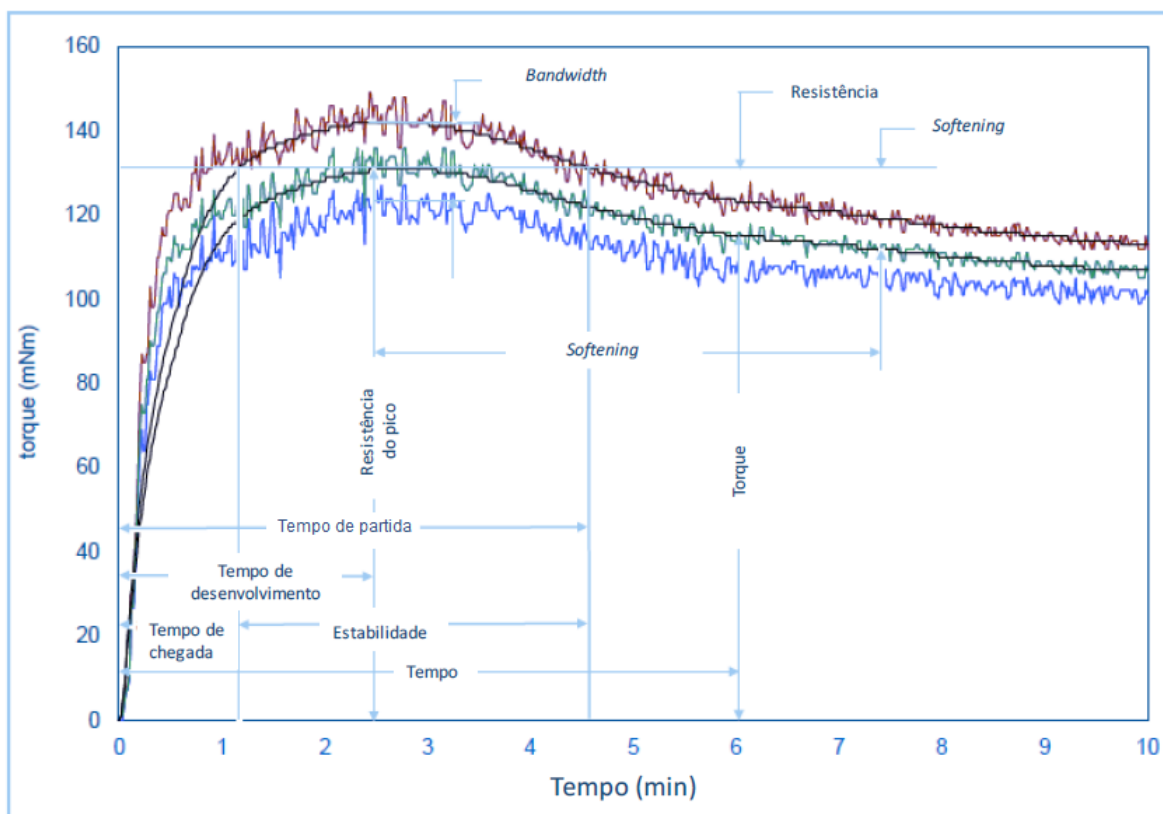


Figura 7 - Curva de mistura obtida pelo micro-doughLAB com identificação dos parâmetros a analisar. Adaptado de: (Perten Instruments, 2017).

## 2.4.2. Textura

### 2.4.2.1. Extensibilidade da massa

Para se obter informações sobre a resistência à extensão e à extensibilidade de uma massa pode utilizar-se instrumentos de extensão de carga, como, por exemplo, o extensógrafo Brabender. Estes testes são muito utilizados por moleiros e padeiros (Dunnewind, et al., 2003).

No extensógrafo, um pedaço cilíndrico de massa é deformado em extensão uniaxial por um gancho que se desloca para baixo a uma taxa constante. A força necessária para deformar a massa é expressa em Unidades Brabender (BU) em função da extensão (mm), sendo este um teste empírico. O equipamento regista os dados num extensograma (a curva força-tempo), podendo ser retirados vários parâmetros, tais como, a resistência máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), extensibilidade à resistência máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ), extensibilidade total ( $E_{tot}$ ) e a área total sob a curva ( $A_{tot}$ ) como uma medida de energia aplicada. Para além disso, é necessária uma grande quantidade de farinha para a realização deste teste, 300 g (Dunnewind, et al., 2003).

Um aparelho semelhante ao extensógrafo Brabender foi desenvolvido por Kieffer o “Kieffer dough and gluten extensibility rig”, também chamado de microextensógrafo. Neste acessório, pode ser realizado um teste com apenas cerca de 0,4 g de massa e o aparelho pode ser instalado em qualquer texturômetro, e que permite medir a força em Newtons e ajustar a velocidade e a temperatura do teste, permite também armazenar os dados em arquivos de computador para posteriores cálculos adicionais. Para além disso, se o teste for realizado a uma velocidade de cerca de 410 mm/min, a taxa de deformação é aproximadamente igual à do extensógrafo Brabender. No entanto, as fórmulas para o cálculo dos parâmetros reológicos fundamentais pode ser derivados da geometria (Dunnewind, et al., 2003).

Os parâmetros mais importantes obtidos através do “Kieffer dough and gluten extensibility rig” são a força máxima aplicada (pico de força) - resistência máxima à extensão ( $R_{máx}$ , N), distância correspondente a este pico - extensibilidade  $ER_{máx}$  (mm), e número de razão R/E ( $N.mm^{-1}$ ). A extensibilidade da massa é muito importante devido ao seu efeito no volume do pão (Nunes, et al., 2020b). A Área total (N.mm) é a área sob a curva que é proporcional à energia necessária para esticar a amostra até à sua rutura (Burešová, et al., 2014).

O valor da razão R/E é definido como a variação da deformação em função da tensão. A relação entre a resistência na altura máxima e o comprimento da curva é importante na avaliação do equilíbrio entre a elasticidade e a extensibilidade da massa (Burešová, et al., 2014).

Na Tabela 4 estão valores médios das características de massas, retirados da literatura.

Tabela 4 - Valores médios de características de extensibilidade retirados da literatura

Farinha	R (N)	Área total (N.mm)	E (mm)	R/E $10^{-3}$ ( $N.mm^{-1}$ )	Referência
Trigo (t=40 min)	0,55 ± 0,09	11,4 ± 0,9	30 ± 5	18 ± 3	(Burešová, et al., 2014)
Trigo (t=0 min)	0,21		25,37	8,24	(Nunes, et al., 2020b)
Trigo (t=60 min)	0,12		15,08	7,96	(Nunes, et al., 2020b)
Trigo + 1% Cv comercial (t=0 min)	0,23		26,95	8,53	(Nunes, et al., 2020b)
Trigo + 1% Cv comercial (t=60 min)	0,13		15,86	8,20	(Nunes, et al., 2020b)

#### 2.4.2.2. Análise de Perfil de Textura

A textura é a resposta dos sentidos tácteis a estímulos físicos que resultam do contacto entre alguma parte do corpo e o alimento. O sentido táctil (tacto) é o principal método para detetar textura, mas são também usados para avaliar a textura a cinestesia (sentido de movimento e posição) e, por vezes, a visão (taxa de fluxo) e o som (associado a texturas crocantes e quebradiças) (Bourne, 2002).

A textura dos alimentos possui as seguintes características (Bourne, 2002):

- É um grupo de propriedades físicas que derivam da estrutura do alimento;
- Engloba-se dentro da mecânica ou da reologia das propriedades físicas. Propriedades óticas, elétricas e magnéticas e propriedades de temperatura e térmicas são propriedades físicas que não fazem parte da definição de textura;
- Consiste num conjunto de propriedades, e não numa única propriedade;
- A textura é percebida principalmente pela sensação do toque, geralmente na boca, mas as outras partes do corpo também podem estar envolvidas;
- Não está relacionado com os sentidos de gosto ou odor;
- A medição objetiva é apenas realizada recorrendo a funções de massa, de distância e de tempo.

Uma necessidade cada vez maior de um método objetivo abrangente para caracterizar a textura dos alimentos levou a uma investigação dos parâmetros mecânicos significativos para a definição da textura. Uma análise aprofundada do assunto resultou na eliminação de uma vasta série de termos descritivos e na aceitação de cinco parâmetros mecânicos independentes básicos (dureza, coesividade, adesividade, viscosidade e elasticidade) e três parâmetros dependentes (fraturabilidade, mastigabilidade e gomusidade) (Friedman, et al., 1963).

O princípio da Análise de Perfil de Textura (TPA) é simular a ação de mastigação dos dentes, comprimindo e descomprimindo duas vezes o alimento a estudar entre duas placas (uma na base e outra fixa ao sistema de acionamento) (Bourne, 2002).

Na Figura 8 está representado um texturograma típico de um teste TPA, que pode ser realizado em compressão ou em penetrometria. O ponto A corresponde ao início da primeira compressão e o B ao início da segunda compressão. A altura do pico de força no primeiro ciclo de compressão (primeira dentada) é definida como a dureza/firmeza. A coesividade é definida como a razão entre as áreas das forças positivas da segunda e da primeira compressão ( $A_2/A_1$ ). A área negativa  $A_3$  é definida como a adesividade, representa o trabalho necessário para retirar a sonda de compressão da amostra. A

percentagem de recuperação do material é definida como a elasticidade. Dois parâmetros secundários podem ser calculados através dos retirados diretamente do texturograma, a gomusidade que é definida como o produto da dureza pela coesividade e a mastigabilidade que é definida como o produto da gomusidade pela elasticidade (Bourne, 2002).

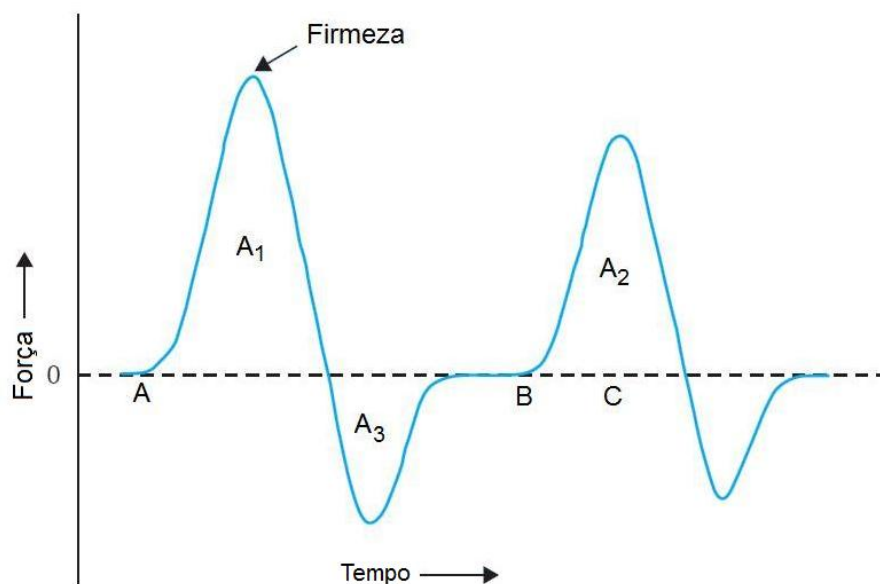


Figura 8 - Texturograma típico de um Teste de Perfil de Textura. Adaptado de: (Bourne, 2002)

### 2.4.3. Cor

A Colorimetria é a ciência e a tecnologia que quantifica e descreve a percepção humana da cor. Esta é a técnica que permite reduzir uma cor a três valores de modo a poder colocá-las num espaço de cor tridimensional, imitando a performance dos observadores humanos. Como a visão humana é tricromática, foram definidas três cores primárias que combinadas entre si fazem uma grande gama de cores (Choudhury, 2014).

Um espaço de cor é uma forma de especificação da cor de forma numérica, normalmente através de três conjuntos de números que representam posições num espaço tridimensional (Choudhury, 2014).

Os espaços de cor podem ser divididos em três categorias: dependentes do dispositivo, independentes do dispositivo e espaços de cor internos. O espaço de cor dependente do dispositivo é aquele em que a cor resultante depende do equipamento e da configuração utilizada para a sua produção, como por exemplo, o sistema RGB. O espaço de cor independente do dispositivo é aquele em que as coordenadas para a especificação da cor produzem exatamente a mesma cor onde quer que sejam aplicadas, pois são baseadas em representações matemáticas, como por exemplo, o espaço de cor

CIE. Os espaços de cor internos são aqueles que estão entre os dois outros (Choudhury, 2014).

O espaço de cor utilizado mais frequentemente em análises alimentares é o espaço CIELab. A determinação instrumental da cor é realizada através de um colorímetro (Minolta, 2007).

O espaço de cor CIELab tem três componentes,  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , onde o  $L^*$  indica a luminosidade e  $a^*$  e  $b^*$  são coordenadas cromáticas. Estas podem ser representadas num diagrama de cromaticidade, Figura 9. Como se pode observar na figura, os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  indicam direções,  $+a^*$  indica o vermelho,  $-a^*$  indica o verde,  $+b^*$  indica o amarelo e  $-b^*$  indica o azul. À medida que os valores se afastam do centro aumenta a saturação da cor ( $C^*_{ab}$ ). Quanto à luminosidade, esta varia de preto ( $L^*=0$ ) a branco ( $L^*=100$ ) (Minolta, 2007).

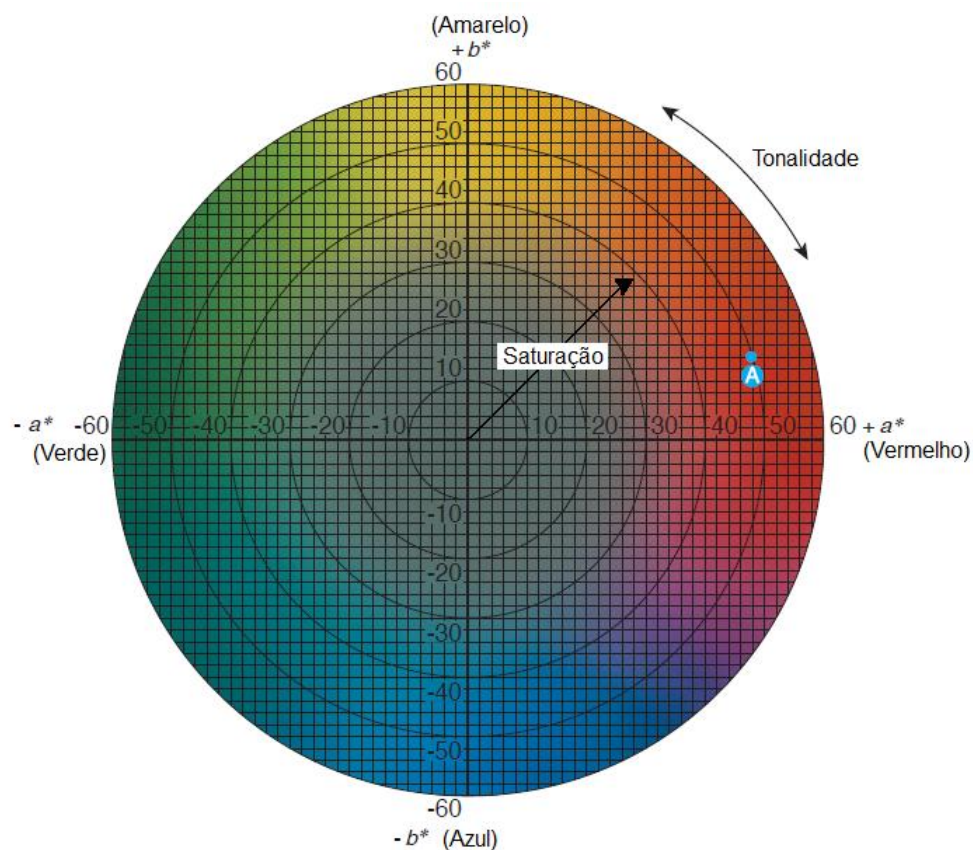


Figura 9 - Diagrama de cromaticidade (espaço de cor CIELab). Adaptado de: (Minolta, 2007)

A expressão da cor no sistema CIELCH oferece uma vantagem sobre o sistema CIELAB, uma vez que neste sistema é muito fácil relacionar-se os valores obtidos com outros sistemas com base em amostras físicas, como a escala de cores de Munsell. Enquanto o sistema CIELAB usa coordenadas cartesianas para calcular uma cor num espaço de cor, o sistema CIELCH usa coordenadas polares. É possível passar do sistema

CIELAB para o sistema CIELCH. Este sistema usa a luminosidade ( $L^*$ ), a saturação ( $C_{ab}^*$ ) e a tonalidade ( $h_{ab}$ ) como medidas (Choudhury, 2014).

A saturação da cor é dada por  $C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}}$  (Choudhury, 2014).

A tonalidade é uma medida angular, numa escala de 0 a 360°, e é dada pela expressão  $h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$ . A correlação entre o sinal de  $a^*$  e  $b^*$  e o valor da tonalidade encontram-se discriminados na Tabela 5 (Choudhury, 2014).

Tabela 5 - Correlação entre os sinais dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  e o intervalo da tonalidade  
(Choudhury, 2014)

Valor de $a^*$	Valor de $b^*$	Intervalo de tonalidade
Positivo	Positivo	0°-90°
Negativo	Positivo	90°-180°
Negativo	Negativo	180°-270°
Positivo	Negativo	270°-360°

A diferença de cor para o espaço de cor CIELAB é dada por  $\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$ . Um observador padrão deteta a diferença de cor quando (Mokrzycki & Tatol, 2011):

- $0 < \Delta E^* < 1$  - o observador não percebe a diferença;
- $1 < \Delta E^* < 2$  - apenas um observador experiente pode notar a diferença;
- $2 < \Delta E^* < 3,5$  - o observador inexperiente também nota a diferença;
- $3,5 < \Delta E^* < 5$  - diferença clara na cor é observada;
- $\Delta E^* > 5$  - o observador nota duas cores diferentes.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Materiais

As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chuii* utilizadas foram produzidas na Noruega por um dos parceiros do projeto Algae2Future. Estas algas foram submetidas a um pré-tratamento em moinho de esferas para assegurar uma disrupção celular de 97%, seguida de liofilização. A composição nutricional parcial destas microalgas foi determinada por um dos grupos de investigação do projeto na NOFIMA, na Noruega. Adicionalmente, para estudos comparativos, foi também utilizada *Chlorella vulgaris* Premium em pó da marca Allma by Allmicroalgae, sendo esta produzida em Portugal.

A composição nutricional das microalgas utilizadas encontra-se na Tabela 6. A composição nutricional das microalgas produzidas no âmbito do projeto A2F (*T. chuii* e *C. vulgaris*) foi realizada pela empresa NOFIMA na Noruega. A composição nutricional da *Chlorella vulgaris* comercial é a constante do rótulo da mesma.

Tabela 6 - Composição nutricional das microalgas utilizadas.

Composição nutricional	<i>Tetraselmis chuii</i> A2F	<i>Chlorella vulgaris</i> A2F	<i>Chlorella vulgaris</i> Allmicroallgae
Lípidos	13,1 g/100 g	15,7 g/100 g	10 g/100 g
Ácidos gordos saturados			2 g/100 g
Ácidos gordos monoinsaturados			1,50 g/100 g
Ácidos gordos polinsaturados			6 g/100 g
Amido	1,3 g/100 g		0,8 g/100 g
Proteínas	48,5 g/100 g	50,4 g/100 g	55 g/100 g
Sal			0,35 g/100 g

Os ingredientes foram adquiridos no mercado nacional: farinha de trigo comercial T65 (Granel Moagens), levedura desidratada (Fermipan), sal de mesa (Continente), açúcar (Sidul) e SSL-E481-Estearilo-2-lactilato de sódio (Puratos).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparação dos pães

A formulação escolhida para preparação das massas e dos pães está representada na Tabela 7. Tendo em conta os estudos realizados no âmbito do projeto A2F selecionou-se a percentagem de incorporação das microalgas de 4,0% (Nunes, et al., 2020a). Esta percentagem de incorporação decorre de trabalhos anteriores, onde se verificou que era esta a percentagem à qual se observava uma competitividade entre o pão com microalga e o pão controlo, para além de, comparativamente com incorporações mais baixas, ter uma melhor qualidade nutricional.

Tabela 7 - Descrição dos ingredientes e respetivas gramagens utilizadas na formulação dos pães, as gramagens de sal, levedura, açúcar e SSL são dadas em função da massa de farinha utilizada

Ingredientes	Formulação			
	Controlo	4% <i>Tetraselmis chuii</i> A2F	4% <i>Chlorella vulgaris</i> A2F	4% <i>Chlorella vulgaris</i> Allmicroalgae
Farinha de trigo T65	100,0	96,0	96,0	96,0
Sal	1,7	1,7	1,7	1,7
Levedura desidratada	4,0	4,0	4,0	4,0
Açúcar	1,0	1,0	1,0	1,0
SSL	0,5	0,5	0,5	0,5
Microalga	0,0	4,0	4,0	4,0
Água (Base 14% Humidade)	66,0	66,0	66,0	69,0

A quantidade de água a adicionar nas diferentes formulações foi determinada recorrendo ao valor de absorção de água obtido e ensaio no Micro-doughLAB.

Para a preparação das massas começou-se por pesar os ingredientes da formulação, a pesagem de farinha utilizada para a elaboração dos pães foi sempre de 300 g. De forma a uniformizar as condições de amassadura, os ingredientes foram misturados num processador de cozinha (Bimby, Vorwerk, Alemanha). Após a pesagem, procedeu-se ao aquecimento da água até uma temperatura de 37°C, velocidade 3, durante 30 segundos. Ativou-se a levedura, em duas fases, numa primeira adicionando a

levedura à água e misturando na velocidade 3, durante 30 segundos, e numa segunda fase adicionando o açúcar e misturando na velocidade 3, durante 30 segundos. Em seguida foram adicionados os restantes ingredientes misturando-se 1 min a velocidade 6 e 2 min a velocidade espiga. Após obtenção da massa, esta foi colocada numa forma retangular de dimensões 25,5×12,0×6,5 cm e colocada numa estufa de fermentação (Unox, Itália) com temperatura controlada de 37°C, durante 60 minutos. Após a fermentação, a massa foi cozida num forno elétrico (AriannaXLT133, Itália) com circulação forçada de ar, a 160°C durante 35 minutos. Durante o tempo de cozedura da massa, foi colocado um recipiente com água, para prevenir uma formação precoce da crosta do pão. Após a cozedura dos pães, estes arrefeceram durante 2 horas à temperatura ambiente sobre uma grelha, para posterior corte e análise.

### **3.2.2. Reologia das massas durante a mistura**

Para efetuar a análise da reologia das massas e a sua evolução durante a mistura utilizou-se o equipamento Micro-doughLAB 2800 (Perten, Austrália). As curvas de mistura foram realizadas a uma velocidade de 120 rpm, 30°C, durante 10 minutos. Ajustou-se a absorção de água (WA) de modo a obter valores de torque máximo de 130 mN.m  $\pm$ 4 %. Os parâmetros avaliados encontram-se representados na secção 2.4.1.2.

As absorções de água obtidas foram utilizadas para ajustar a água a adicionar na preparação das massas.

### **3.2.3. Comportamento viscoelástico linear das massas**

Para a análise da reologia das massas panares foi utilizado um reómetro de tensão controlada (MARS III, Haake, Alemanha) acoplado com um sistema Peltier. Foram utilizados uns sensores de pratos paralelos serrados (PP20 – 20 mm diâmetro) com uma distância entre pratos de 1,5 mm.

Porções esféricas das massas foram colocadas em estufa a 37°C durante 60 minutos. Em seguida, cada uma destas porções foi colocada entre os pratos do reómetro, sendo posteriormente coberta com parafina líquida para evitar a desidratação durante os testes, Figura 10.

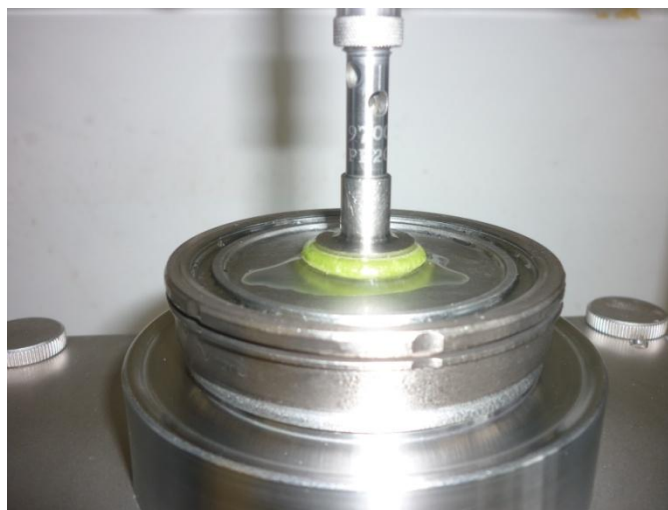


Figura 10 - Reómetro com sistema sensor de pratos paralelos serrados com massa de *C. vulgaris*

O primeiro teste efetuado foi um varrimento de tensão de modo a determinar qual a zona viscoelástica linear, selecionando a tensão a aplicar no teste de varrimento de frequência. Na realização dos testes de varrimento de frequência foram utilizadas novas porções de massa fermentada, sendo variada a frequência entre 0,001 e 100 Hz. Estes testes foram realizados a uma temperatura de  $5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  de modo a parar a fermentação. As determinações destes testes foram realizadas em triplicado para cada massa, as massas entre os testes repousaram no frigorífico.

#### 3.2.4. Avaliação da textura

A avaliação da textura foi realizada num texturómetro TA.XT.plus (Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 5 kg, numa sala de ambiente controlado ( $T=20^\circ\text{C}$ ). A avaliação dos parâmetros referentes à textura foi realizada recorrendo a um teste TPA – Análise de Perfil de Textura, com o objetivo principal de mimetizar duas dentadas consecutivas que o alimento sofre na boca.

Este teste foi realizado para as massas fermentadas (Figura 11) e para os pães. Para as medições, foi utilizada uma sonda acrílica com 10 mm de diâmetro (p/10) para as fatias de pão, enquanto para as massas foi utilizada uma sonda acrílica com 19 mm de diâmetro (p/19), foram feitas pelo menos 3 repetições em cada caso, sempre em locais distintos. As distâncias de penetração utilizadas foram de 8 mm para o pão e de 20 mm para as massas, a velocidade da sonda foi de  $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  e um tempo de espera entre ciclos de 5 segundos. Para as massas a medição foi realizada num recipiente cilíndrico, com 68 mm de diâmetro e 52 mm de altura, em que foram colocadas na estufa de fermentação, enquanto para os pães foram cortadas 3 fatias do meio com 2 cm de espessura.

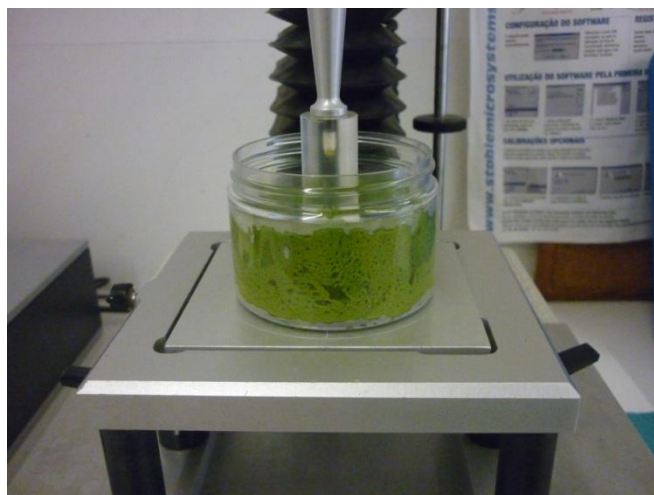


Figura 11 - Teste TPA em massa com incorporação de *C. vulgaris*

### 3.2.5. Avaliação da extensibilidade da massa

A avaliação da extensibilidade da massa foi realizada recorrendo à sonda SMS/Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig para o texturómetro TA.XT.plus utilizado. As massas foram moldadas em rolos e colocadas no molde de Teflon, formando paralelepípedos com formato trapezoidal (3 mm, 5 mm, 4 mm) com um comprimento de 5 cm. As amostras foram testadas após 10 min de repouso ( $t_0$ ) e após 60 min a 30°C ( $t_{60}$ ). A velocidade utilizada durante o teste foi de  $1,0 \text{ mm.s}^{-1}$  e a distância de 30 mm, o teste foi realizado pelo menos 5 vezes para cada amostra e para cada tempo (Figura 12). Os parâmetros avaliados encontram-se explicados na secção 2.4.2.1.

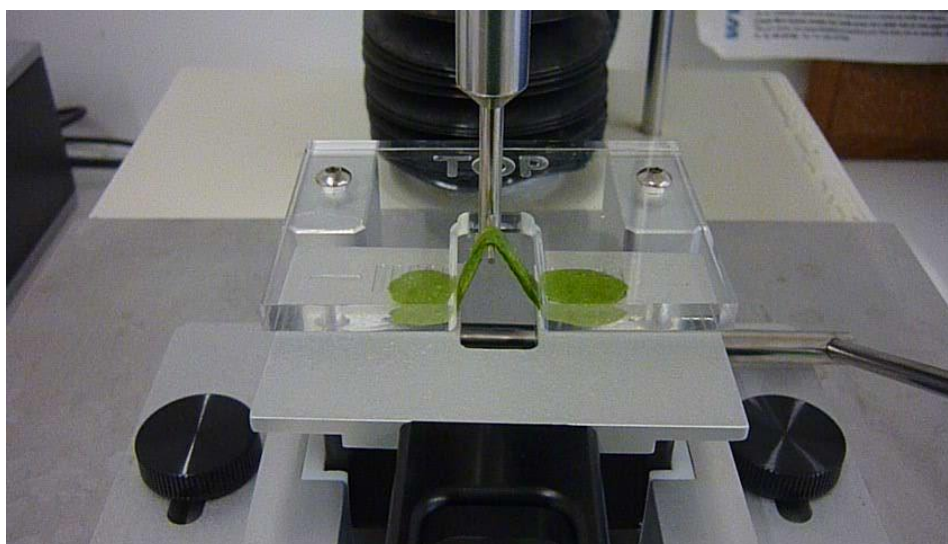


Figura 12 - Teste de extensibilidade da massa utilizando a sonda SMS/Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig

### 3.2.6. Medição da cor

A avaliação instrumental da cor da massa, cor do miolo e da cõdea do pão foi realizada através do Colorímetro Minolta CR-400, Japão, com o iluminante D65. A cor foi expressa em valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas do sistema CIELAB). No sistema CIELAB, as cores são decompostas em três parâmetros, a Luminosidade ( $L^*$ ) e as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ . Os valores de  $L^*$  variam entre 0 (escuro) e 100 (claro), os valores de  $a^*$  variam entre +60 (vermelho) e -60 (verde) e os valores de  $b^*$  variam entre +60 (amarelo) e -60 (azul).

Para cada formulação realizaram-se pelo menos quatro repetições das medições. Antes de cada ensaio, o colorímetro foi calibrado com o padrão branco Minolta.

Para saber o impacto da incorporação das microalgas em estudo na cor das massas e pães calculou-se a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) entre a amostra controlo e as amostras com incorporação de microalga, a saturação da cor ( $C_{ab}^*$ ) e a tonalidade da cor ( $h_{ab}$ ).

A diferença de cor é dada por:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{Equação 1})$$

A saturação da cor é dada por:

$$C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 2})$$

A tonalidade da cor é dada por (McLellan, Lind, & Kime, 1995):

$$h_{ab} = \arctan (b^*/a^*) \times 180/\pi, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad (\text{Equação 3})$$

ou

$$h_{ab} = \arctan (b^*/a^*) \times 180/\pi + 180, \text{ se } a^* < 0 \quad (\text{Equação 4})$$

ou

$$h_{ab} = \arctan (b^*/a^*) \times 180/\pi + 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (\text{Equação 5})$$

### 3.2.7. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada para as massas fermentadas no equipamento pH Basic 20 (CRISON, Espanha). A determinação foi feita por perfuração da massa com o eléctrodo de sólidos e medição direta, tendo sido feita em triplicado. O eléctrodo foi calibrado com soluções de pH 4 e pH 7.

### 3.2.8. Determinação da atividade da água

A determinação da atividade da água do miolo do pão foi realizada através do equipamento HygroPalm AW (Rotronic, Reino Unido) a temperatura constante ( $20,0 \pm 1^\circ\text{C}$ ). O miolo do pão foi preparado esfarelando-se o miolo em pequenas dimensões após

arrefecimento completo do pão. Este teste foi realizado em triplicado para cada formulação de pão.

### 3.2.9. Determinação do teor de humidade

A determinação do teor de humidade do pão foi realizada exclusivamente para o miolo do mesmo. Esta determinação foi realizada utilizando uma balança de infravermelhos ADAM PMB 202 por aquecimento a uma temperatura de 130°C. Realizaram-se medições em triplicado de todos os pães.

### 3.2.10. Avaliação das perdas na cozedura

A avaliação das perdas durante a cozedura permite conhecer a percentagem de água que é perdida na cozedura. Este parâmetro é dado por:

$$\% \text{ de perdas durante a cozedura} = \frac{\text{Massa antes da cozedura} - \text{Massa depois da cozedura}}{\text{Massa antes da cozedura}} \times 100$$

(Equação 6)

### 3.2.11. Avaliação do volume dos pães

A medição do volume do pão é realizada recorrendo ao deslocamento de sementes de colza, de acordo com a norma AACC 10-05.01 (Medição de volume por deslocamento de sementes de colza).

A medição do volume do pão foi realizada recorrendo a uma caixa com dimensões de 52x20x10 cm onde se colocou o pão e se encheu até à superfície com sementes de colza. Em seguida, mediu-se o volume das sementes que estavam contidas na caixa. Estas medições foram efetuadas em duplicado para cada formulação.

O volume do pão corresponde então à subtração do volume de sementes contidas na caixa em conjunto com o pão ao volume de sementes contidas na caixa vazia.

A partir do volume do pão e da massa após cozedura apurou-se o volume específico do pão.

### 3.2.12. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada recorrendo ao programa estatístico *OriginPro8*. Os resultados experimentais foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) usando o teste de Tukey para um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), de forma a verificar se existem diferenças significativas ou não, entre os pares de médias dos diferentes parâmetros analisados.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Reologia das Massas durante a mistura

Nos ensaios realizados no micro-doughLAB obtiveram-se valores de torque máximo idênticos, isto é, com diferenças inferiores a 4%, ajustados ao valor de referência de 130 mN.m, sendo determinada a absorção de água para cada mistura farinha de trigo/microalga.

As curvas obtidas no micro-doughLAB encontram-se representadas na Figura 13. Na Tabela 8 encontram-se apresentados os parâmetros calculados a partir dos valores destas curvas.

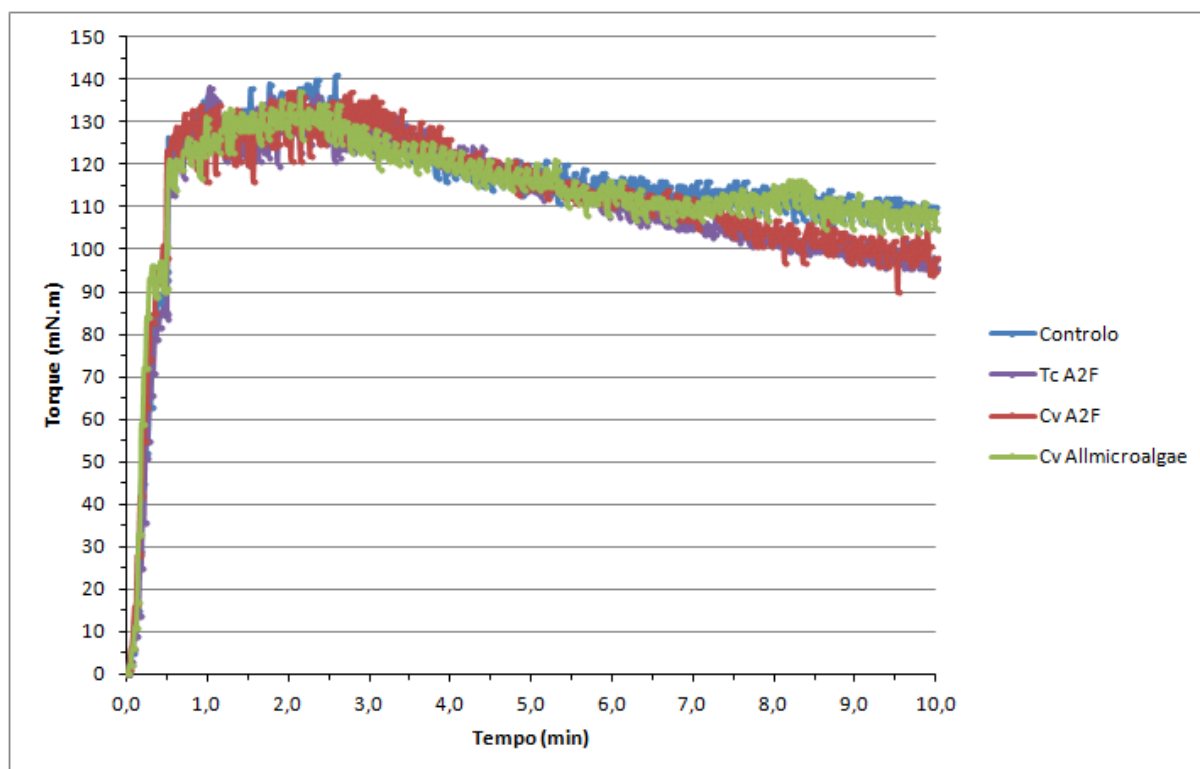


Figura 13- Curvas obtidas no micro-doughLAB para todas as formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*)

Através da análise estatística dos resultados é possível concluir que existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o pão com a formulação controlo (sem adição de biomassa microalgal) e os pães com incorporação das microalgas produzidas no âmbito do projeto A2F, tanto *T. chuii* como *C. vulgaris*, no caso do tempo de desenvolvimento da massa. Em termos de estabilidade as formulações com as microalgas do projeto não são significativamente diferentes, as formulações com *Chlorella vulgaris* não são significativamente entre si e a formulação com *C. vulgaris* comercial não é

significativamente diferente da formulação controlo. Quanto ao *softening* não existem diferenças significativas entre massas ( $p>0,05$ ).

Tabela 8- Parâmetros médios obtidos do micro-doughLAB para as diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p>0,05$ )

	WA (%)	Tempo de desenvolvimento (s)		Estabilidade (s)		Softening (mN.m)	
Controlo	52	131 ± 3	b	141 ± 8	c	22 ± 1	a
Tc A2F	52	156 ± 18	a	197 ± 16	a	24 ± 4	a
Cv A2F	52	162 ± 6	a	184 ± 14	a,b	26 ± 3	a
Cv Allmicroalgae	55	140 ± 7	a,b	154 ± 12	b,c	23 ± 4	a

Estes resultados sugerem que existe um aumento da estruturação da massa e da sua estabilidade quando se incorporam as microalgas. O aumento da estruturação pode ser atribuído a um aumento do teor proteico em relação ao controlo. A única microalga que apresenta valores concordantes com estudos anteriores (Graça, et al., 2018) é a *C. vulgaris* comercial, onde se verificou que níveis de incorporação de 4% de *C. vulgaris* provocavam um aumento da absorção de água e uma diminuição da estabilidade. O efeito da adição de *T. chuii* observado não é semelhante ao observado em pão isento de glúten, em que a adição de *T. chuii* a 4% não teve alteração significativa do tempo de desenvolvimento da massa, nem da estabilidade e do *softening* (Nunes, et al., 2020a).

A elevada diferença de resultados entre as massas obtidas com incorporação de biomassa de *Chlorella vulgaris* pode dever-se a estas terem composições diferentes, mas também terem sofrido processos de produção e secagem diferentes, que provocam alterações substanciais nas características das biomassas. Um estudo em pão de trigo com incorporação de biomassa fresca e biomassa comercial (desidratada) a 1% mostra que diferentes processos de processamento conduzem a resultados reológicos diferentes (Nunes, et al., 2020b).

## 4.2. Comportamento viscoelástico linear das Massas Fermentadas

Na Figura 14 estão representados os resultados obtidos nos testes de varrimento de frequência efetuados para as massas fermentadas da formulação controlo (sem microalga) e das formulações com incorporação de microalgas – diferentes níveis de incorporação e diferentes origens.

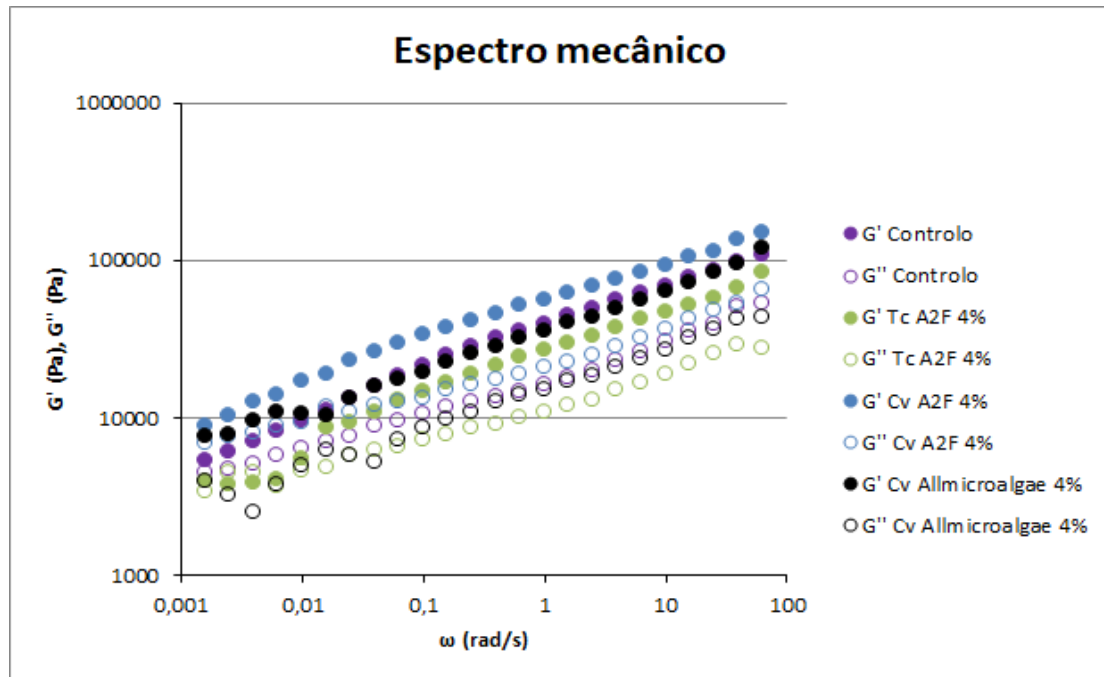


Figura 14- Espectros mecânicos a 5°C das massas fermentadas controlo e com incorporação de microalgas (*T. chuii* e *C. vulgaris* de duas origens distintas)

Através dos resultados obtidos é possível verificar que todas as massas possuem uma componente elástica ( $G'$ ) superior à componente viscosa ( $G''$ ), o que significa que as massas têm um comportamento predominantemente elástico. No entanto, esse comportamento viscoelástico é muito dependente da frequência, o que normalmente se associa a sistemas pouco estruturados (Fradinho, et al., 2020), este comportamento também é notado num estudo sobre a incorporação de *C. vulgaris* a 1% em pão de trigo (Nunes, et al., 2020b). A massa com incorporação de *C. vulgaris* produzida no A2F apresentou valores de  $G'$  mais elevados sugerindo que a microalga provocou um reforço da estrutura da massa, e a massa com incorporação de *T. chuii* apresentou valores de  $G'$  inferiores ao controlo sugerindo uma destabilização da estrutura pela adição da microalga.

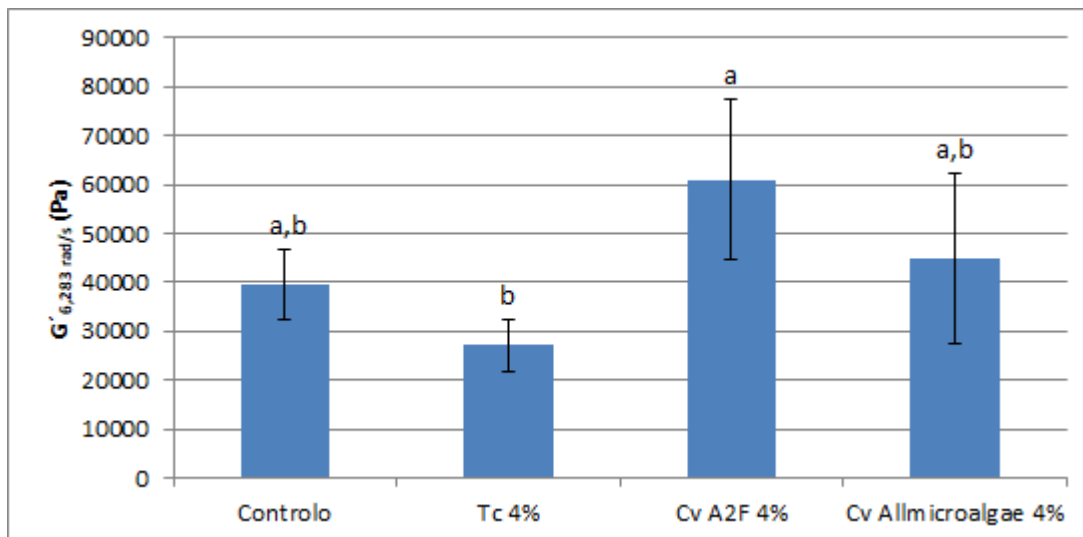


Figura 15 - Valores de  $G'$  retirados dos espectros mecânicos a 6,283 rad/s (1 Hz) das massas fermentadas controlo e com incorporação de microalgas (*T. chuii* e *C. vulgaris*).

\*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

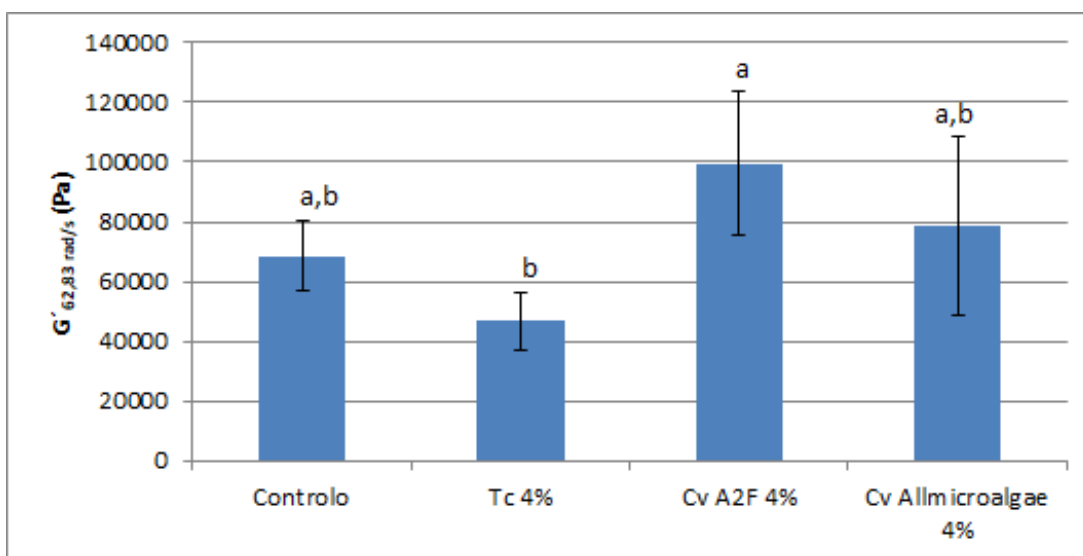


Figura 16 - Valores de  $G'$  retirados dos espectros mecânicos a 62,83 rad/s (10 Hz) das massas fermentadas controlo e com incorporação de microalgas (*T. chuii* e *C. vulgaris*).

\*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

Considerando pelo menos três repetições de cada amostra, e comparando os valores do módulo elástico ( $G'$ ) retirados dos espectros mecânicos a duas frequências distintas (6,28 e 62,83 rad/s), conforme a Figura 15 e a Figura 16, verifica-se que a 6,28 rad/s existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a formulação com *T. chuii* e a formulação com a *C. vulgaris* do projeto A2F ( $p < 0,05$ ), mas cada uma destas massas não

é significativamente diferente do controlo e da formulação com *C. vulgaris* comercial ( $p>0,05$ ). É de salientar que as diferenças referidas anteriormente se mantêm a 62,83 rad/s. Esta análise apoia a ideia de que a adição da *C. vulgaris* provocou um aumento da estruturação da massa, no entanto, um estudo sobre incorporação de *C. vulgaris* comercial em pão de trigo, biomassa desidratada de uma marca distinta da utilizada no presente trabalho, aponta que quando a concentração é superior a 3% o efeito de fortalecimento induzido pelas microalgas é menor do que a concentrações menores, existindo um efeito de desestruturação relacionado com uma provável separação de fases da biomassa adicionada e um rompimento da matriz de glúten (Graça, et al., 2018). Neste trabalho, a adição de *T. chuii* provocou uma destabilização da estrutura.

A dependência do módulo elástico e do módulo viscoso da frequência pode ser descrita pela Lei de Potência (Fradinho, et al., 2020):

$$G' = \alpha' \times f^{b'} \quad (\text{Equação 7})$$

$$G'' = \alpha'' \times f^{b''} \quad (\text{Equação 8})$$

Em que os valores  $\alpha$  e  $b$  são determinados através da realização da regressão linear do logaritmo de  $G'$  e de  $G''$  versus o logaritmo da frequência, onde as ordenadas na origem são  $\alpha'$  e  $\alpha''$ , respetivamente, e os declives são  $b'$  e  $b''$ , respetivamente (Bernaerts T. M., 2017). Os valores obtidos para estes parâmetros estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores ajustados para as equações da Lei da potência, letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações ( $p>0,05$ )  
\*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p>0,05$ )

	$\alpha'$		$b'$		$\alpha''$		$b''$	
Controlo	21005	a,b	0,2957	a	11594	a,b	0,2337	a,b
Tc 4%	14160	b	0,3029	a	7866	b	0,2203	b,c
Cv A2F 4%	36238	a	0,2616	a	16381	a	0,2082	c
Cv Allmicroalgae 4%	24019	a,b	0,3016	a	12538	a,b	0,2462	a

( $R^2$  entre 0,915 - 0,996)

O parâmetro  $\alpha'$  mais baixo da massa com incorporação de *T. chuii* indica que esta massa é a que possui uma menor estruturação, estes resultados estão coerentes com a literatura (Nunes, et al., 2020a).

O parâmetro  $b'$  não é significativamente diferente nas massas com e sem incorporação de microalgas ( $p>0,05$ ). Quanto ao parâmetro  $b''$  podemos observar que

existem diferenças significativas entre a massa controlo e as massas com incorporação das microalgas do projeto A2F ( $p < 0,05$ ), enquanto a massa controlo não é significativamente diferente da massa com incorporação de *Tetraselmis chuii* nem da massa com incorporação de *Chlorella vulgaris* comercial ( $p > 0,05$ ). Para todas as amostras estudadas, os valores de  $b'$  e  $b''$  assumem valores inferiores a 0,5 (valor que indica a transição para comportamento do tipo sólido. Como nestas amostras não se pode considerar que  $b'$  e  $b''$  sejam iguais a zero, não existe uma independência clara ( $G' \propto \omega^0$  e  $G'' \propto \omega^0$ ) entre o  $G'$  e a frequência, nem entre o  $G''$  e a frequência, isto é, o  $G'$  e o  $G''$  não são independentes da frequência (Bernaerts T. M., 2017).

### 4.3. Avaliação da textura das massas

A Análise de Perfil de Textura das massas permitiu calcular valores para os parâmetros firmeza, coesividade e elasticidade.

Na Figura 17 estão representados os resultados da firmeza das diferentes formulações.

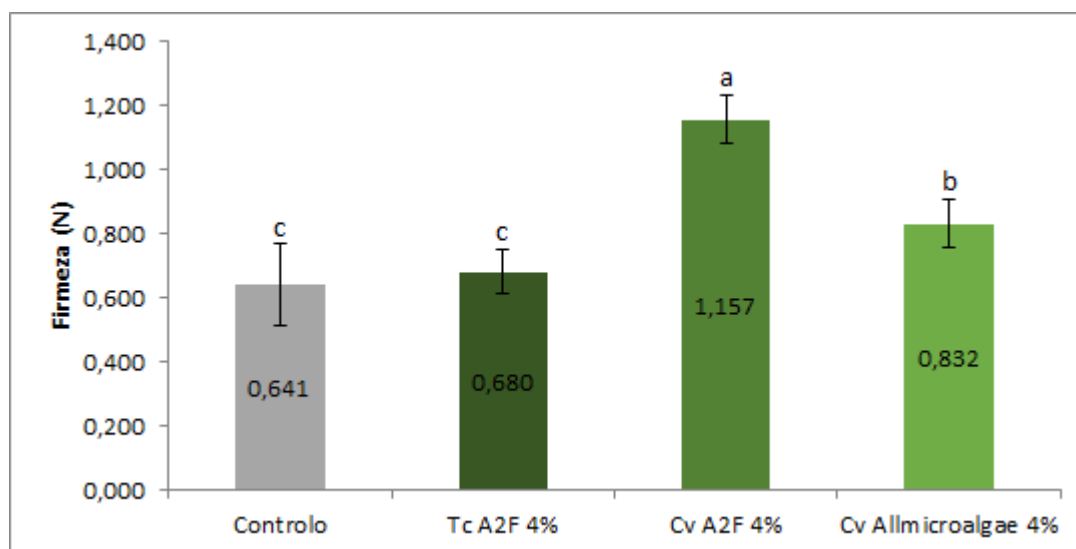


Figura 17 - Valores de firmeza das massas das diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

As massas com menor firmeza são a massa controlo e a massa com incorporação de 4% de *Tetraselmis chuii*, sendo estas duas massas não significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Este resultado não é concordante com estudos anteriores em pão sem glúten com a mesma concentração de microalga *T. chuii*, onde foi observado um aumento da firmeza (Nunes, et al., 2020a), mas tal será explicado pela diferente matriz estrutural dos pães isentos de glúten, onde o amido assume uma importância fundamental no nível de

estruturção da massa. A massa que apresenta uma maior firmeza é a massa com incorporação de 4% de *Chlorella vulgaris* produzida o âmbito do projeto A2F, sendo esta significativamente diferente de todas as outras massas ( $p < 0,05$ ). A massa com incorporação de *Chlorella vulgaris* comercial apresenta uma firmeza intermédia, sendo significativamente diferente das restantes massas ( $p < 0,05$ ). Neste sentido podemos concluir que a incorporação de *Chlorella vulgaris* reforça a estruturção da massa sendo que a que produz o efeito mais significativo é a *Chlorella vulgaris* produzida no âmbito do projeto A2F, o que deverá ser atribuído ao maior grau de disrupção celular e saída de macromoléculas do interior das células (proteínas e polissacáridos que vão contribuir para a estrutura das massas de panificação), para além da composição bioquímica que apresenta alguma diferença (Tabela 6).

Na Figura 18 podemos observar os valores da coesividade das massas das diferentes formulações, sendo que as massas com menor coesividade são a da formulação controlo e da formulação com incorporação de *Chlorella vulgaris* comercial, não sendo estas significativamente diferentes uma da outra, são no entanto significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) das outras formulações. A incorporação das microalgas produzidas no âmbito do projeto A2F, *T. chuii* e *C. vulgaris*, provocou um aumento da coesividade das massas. A diminuição da coesividade em pão sem glúten com incorporação de 4% *T. chuii* foi reportada em estudo anterior (Nunes, et al., 2020a).

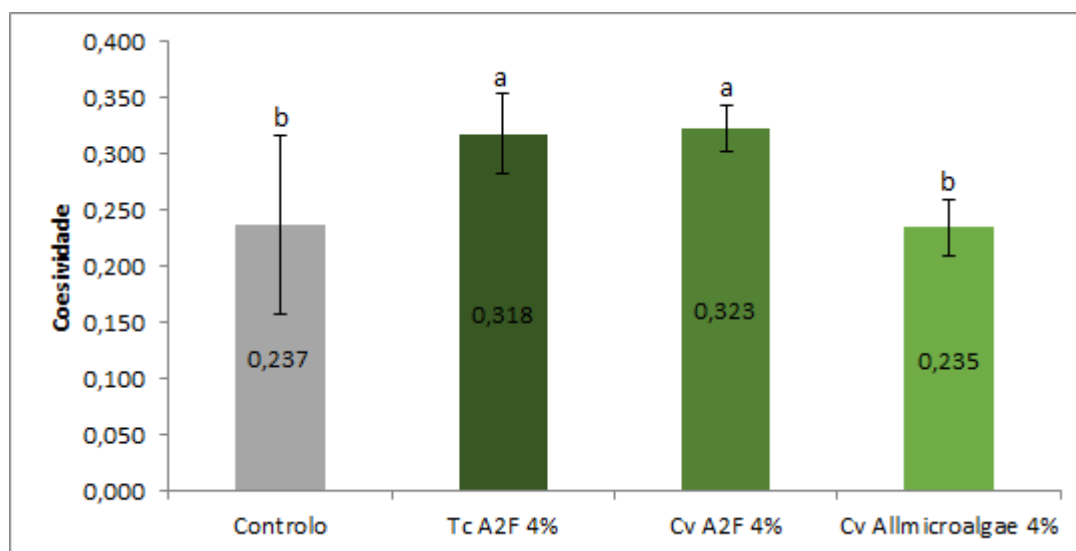


Figura 18 - Valores de coesividade das massas das diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

Quanto à elasticidade, as únicas massas que têm uma elasticidade significativamente diferente uma da outra são as com incorporação de *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* comercial ( $p < 0,05$ ), como é possível observar na Figura 19.

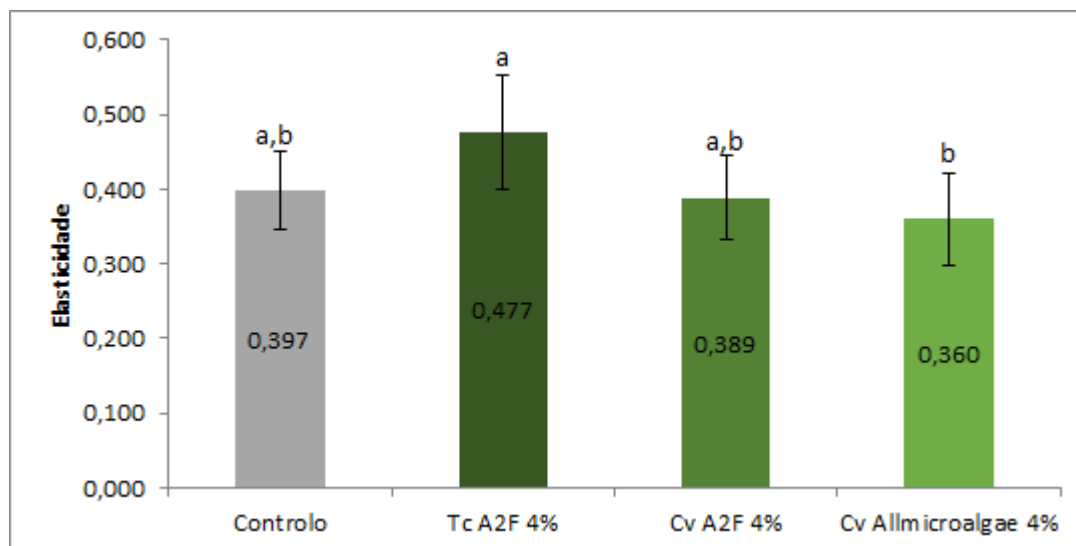


Figura 19 - Valores de elasticidade das massas das diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p>0,05$ )

#### 4.4. Avaliação da extensibilidade das massas

A avaliação da extensibilidade foi feita recorrendo ao *SMS/Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig* do texturómetro, sendo os parâmetros apurados: força máxima necessária para fraturar a massa ( $R_{máx}$ ), extensibilidade, isto é, distância à qual ocorre a força máxima ( $ER_{máx}$ ), energia aplicada na massa até ocorrer a rutura (Área total) e taxa de alongamento (R/E).

Na Figura 20 podemos observar os valores obtidos para a força máxima, em que, no tempo inicial, a massa controlo não é significativamente diferente da massa contendo *Chlorella vulgaris* do projeto A2F ( $p>0,05$ ) e sendo ambas significativamente diferentes das massas contendo *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* comercial ( $p<0,05$ ). As massas contendo *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* comercial não são significativamente diferentes entre si ( $p>0,05$ ). Após fermentação, verifica-se que a massa contendo *Chlorella vulgaris* do projeto A2F é significativamente diferente das restantes massas ( $p<0,05$ ) e que a massa controlo passa a não ser estatisticamente diferente da massa contendo *Chlorella vulgaris* comercial ( $p>0,05$ ) mas continuando significativamente diferente da massa contendo *Tetraselmis chuii* ( $p<0,05$ ). Estes valores são próximos dos citados na literatura (Nunes, et al., 2020b) embora a adição de *C. vulgaris* comercial na literatura tenha provocado um aumento da resistência e neste ensaio provocou uma diminuição da mesma.

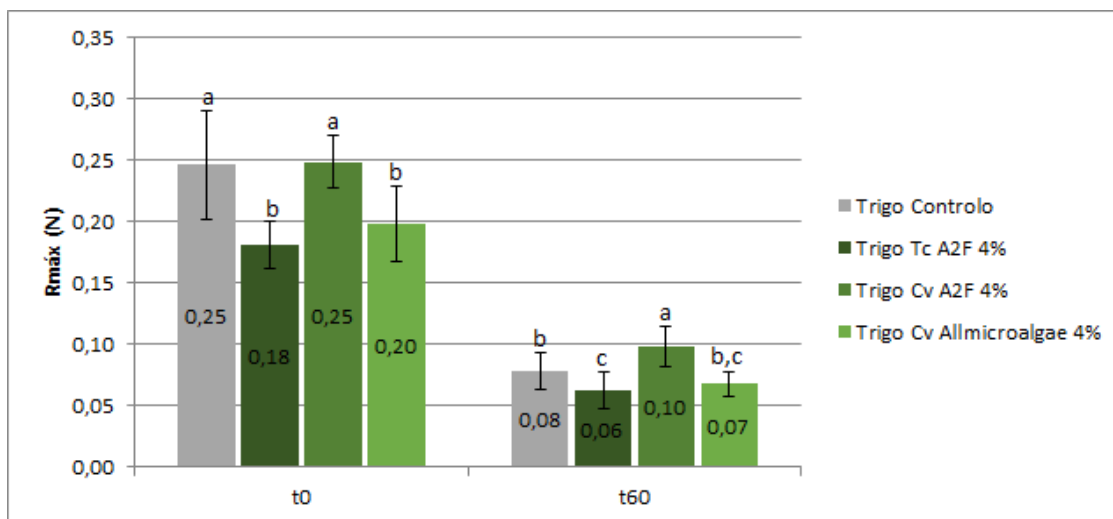


Figura 20 - Força máxima aplicada durante o teste de extensibilidade às massas (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p>0,05$ )

Quanto à extensibilidade (Figura 21) podemos observar que no tempo inicial a massa controlo é significativamente diferente das massas contendo *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* do projeto A2F ( $p<0,05$ ) mas não é estatisticamente diferente da *Chlorella vulgaris* comercial ( $p>0,05$ ). No entanto, após fermentação a massa controlo é significativamente diferente de todas as outras ( $p<0,05$ ), não apresentando diferenças significativas as massas contendo *Chlorella vulgaris* ( $p>0,05$ ), e sendo a massa com *Tetraselmis chuii* significativamente diferente das outras massas apresentado o valor menor de extensibilidade ( $p<0,05$ ).

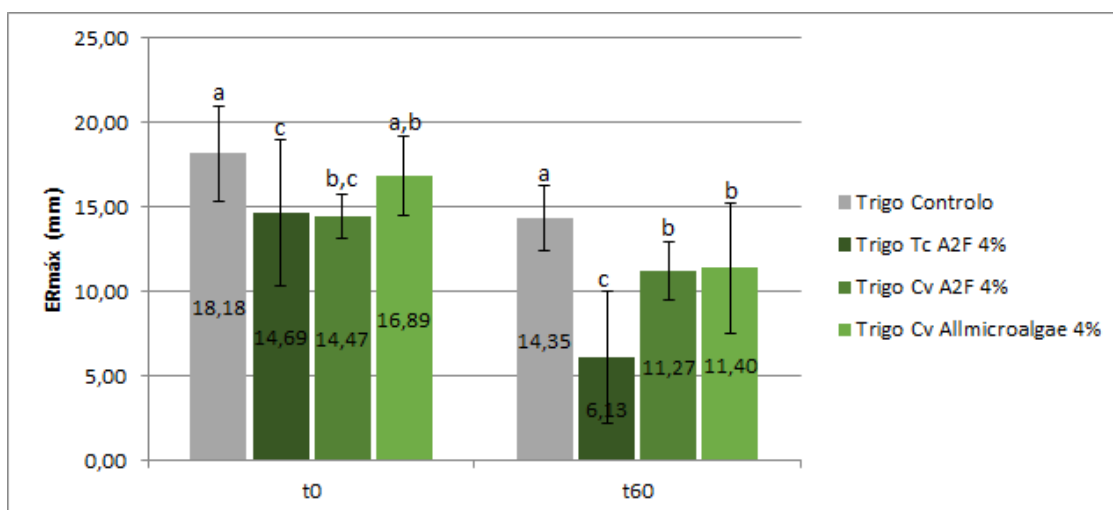


Figura 21 - Distância à qual ocorre a força máxima aplicada durante o teste de extensibilidade às massas (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p>0,05$ )

Na Figura 22 podemos observar a área total sob a curva obtida no texturómetro, como medida da energia necessária para ocorrer a fratura da massa. A energia necessária para a fratura da massa controlo é significativamente maior do que para as restantes massas ( $p < 0,05$ ) sendo que a massa que necessita de menor energia é a contendo *Tetraselmis chuii*, sendo esta significativamente diferente das contendo *Chlorella vulgaris* ( $p < 0,05$ ). Após a fermentação, a massa contendo *Tetraselmis chuii* é significativamente diferente das restantes ( $p < 0,05$ ), sendo a massa controlo e as massas contendo *Chlorella vulgaris* não significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).

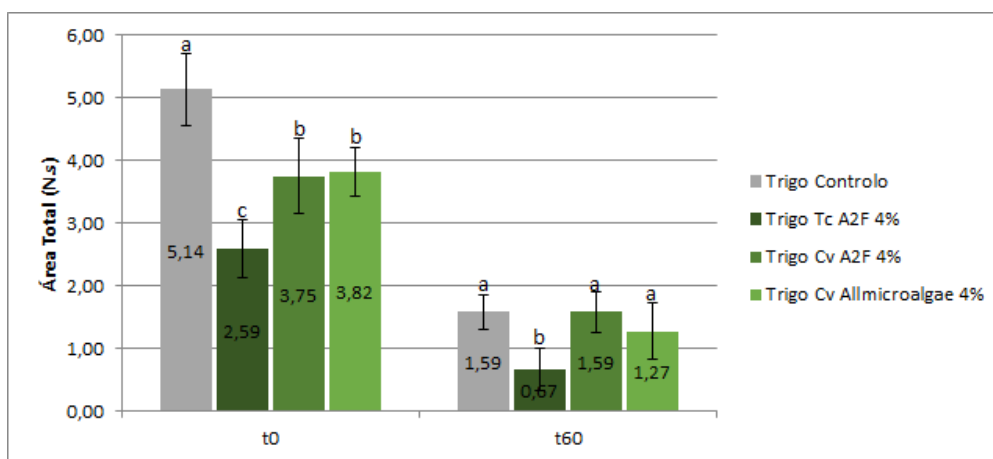


Figura 22 – Área total sob a curva traçada durante o teste de extensibilidade às massas (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*), correspondente à energia aplicada \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

Os valores obtidos para R/E estão representados na Figura 23. Como podemos observar, no tempo inicial apenas existem diferenças significativas entre as formulações com incorporação de *Chlorella vulgaris* do A2F ( $p < 0,05$ ). Após fermentação verifica-se que as formulações contendo as microalgas do projeto A2F são significativamente diferentes da formulação controlo e da formulação com *Chlorella vulgaris* comercial ( $p < 0,05$ ). Estes valores são muito superiores aos obtidos por (Nunes, et al., 2020b) apesar de terem sido realizados nas mesmas condições de ensaio, a tendência observada era que a incorporação de 1% de *C. vulgaris* comercial produzia massas de trigo com valores R/E mais elevados antes e após fermentação.

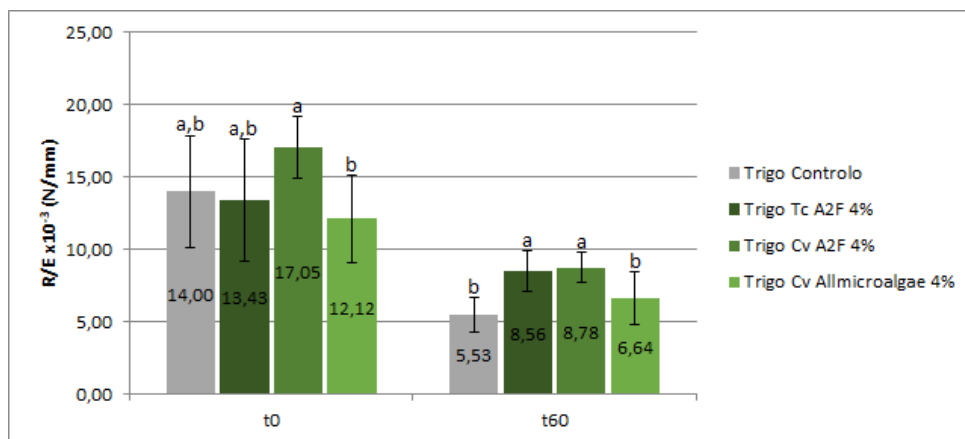


Figura 23 - Taxa de alongamento das massas das diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

Assim, o teste de extensibilidade mostra que a incorporação de 4% de *T. chuii* provoca uma destabilização da massa, o que corrobora com os resultados dos testes de reologia dinâmica. A incorporação de 4% de *C. vulgaris* do A2F possui um rácio R/E mais elevado indicando uma maior estruturação da massa, o que corrobora com o resultado obtido na reologia dinâmica, no entanto, no TPA observou-se uma maior firmeza da massa que pode estar relacionada com a menor extensibilidade observada. No caso da *C. vulgaris* comercial observou-se que após fermentação todos os parâmetros do teste de extensibilidade tinham valores próximos do controlo o que corrobora com os testes de reologia dinâmica em que os valores de  $G'$  e  $G''$  eram muito próximos dos valores do controlo, no entanto, no TPA observou-se um aumento da firmeza.

#### 4.5. Determinação do pH

As massas fermentadas com adição de microalgas têm um valor de pH mais elevado. A massa fermentada com pH mais ácido é a massa controlo (5,14). A massa fermentada com pH mais elevado é a massa com incorporação de *Tetraselmis chuii* (5,84). Todas as massas apresentam um pH significativamente diferente entre si ( $p < 0,05$ ). Com incorporação das microalgas ocorre um aumento no pH, sendo a massa obtida menos ácida que o controlo. Os valores de pH obtidos para cada uma das massas encontram-se na Tabela 10.

O aumento dos valores de pH corrobora com estudos já realizados em que a incorporação de microalgas leva a um aumento de pH (García-Segovia, et al., 2017; Khemiri, et al., 2020). O valor de pH da massa com incorporação de 4% de *T. chuii* é bastante próximo do obtido por (Nunes, et al., 2020a) (5,9), apesar de este valor ser para um pão isento de glúten.

Tabela 10 - Valores de pH das massas fermentadas de cada uma das formulações em estudo. \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

	pH	
Controlo	5,14 ± 0,09	d
Tc 4%	5,84 ± 0,12	a
Cv A2F 4%	5,30 ± 0,06	c
Cv Allmicroalgae 4%	5,50 ± 0,04	b

#### 4.6. Medição da cor das massas

Na Tabela 11 encontram-se os valores dos parâmetros da cor,  $L^*$  e coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$ , assim como a saturação da cor ( $C^*_{ab}$ ), a tonalidade da cor ( $h_{ab}$ ) e a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ), para cada uma das massas fermentadas.

Tabela 11 - Valores do parâmetro  $L^*$  e das coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$ , saturação da cor, a tonalidade da cor e a diferença total de cor das massas fermentadas (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*). \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ( $p > 0,05$ )

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
Controlo	79,5 ± 2,3 a	1,7 ± 0,7 a	16,4 ± 0,7 b	16,5 ± 0,7 b	84,0 ± 1,1 d	
Tc 4%	42,2 ± 0,7 c	-11,9 ± 0,4 d	21,1 ± 1,0 a	24,2 ± 1,1 a	119,5 ± 0,6 a	40,0
Cv A2F 4%	41,6 ± 0,5 c	-3,4 ± 0,2 b	16,7 ± 1,0 b	17,0 ± 1,0 b	101,6 ± 0,9 c	38,2
Cv Allmicroalgae 4%	46,2 ± 0,8 b	-10,1 ± 0,5 c	21,9 ± 1,7 a	24,1 ± 1,5 a	114,6 ± 2,1 b	35,7

A massa com coloração mais clara, ou seja,  $L^*$  mais elevado, é a massa controlo (79,5), sendo esta significativamente diferente das restantes massas ( $p < 0,05$ ). As massas com incorporação de microalga apresentam-se numa localização no espaço de cor nas regiões do verde e do amarelo, ou seja, valores de  $a^*$  negativos e  $b^*$  positivos.

Quanto à saturação ( $C^*_{ab}$ ) podemos verificar que as formulações com *Tetraselmis chuii* e com *Chlorella vulgaris* comercial apresentam uma saturação significativamente maior do que as restantes formulações ( $p < 0,05$ ), significando que apresentam uma cor mais viva. Em relação à tonalidade ( $h_{ab}$ ), podemos observar que a formulação controlo e a com incorporação de *C. vulgaris* do projeto apresentam valores entre 70 e 105° o que corresponde a uma tonalidade amarela, enquanto as formulações com incorporação de *T.*

*chuii* e de *C. vulgaris* comercial apresentam valores entre 105 e 195°, correspondente a uma tonalidade verde. No entanto, a massa contendo *C. vulgaris* do projeto A2F apresenta uma cor verde amarelada.

Quanto à diferença total de cor podemos observar que entre qualquer uma das formulações com incorporação de microalga e a formulação controlo existe uma clara percepção da diferença na cor das massas, uma vez que o  $\Delta E^*$  é muito superior a 3,5 (Mokrzycki & Tatol, 2011). Diferenças totais de cor superiores a 5 são referidas em estudos anteriores com outras microalgas (García-Segovia, et al., 2017; Khemiri, et al., 2020), e em pão sem glúten com valores de 77 para incorporação de 4% de *T. chuii* (Nunes, et al., 2020a). Num estudo anterior foi obtido um valor de  $\Delta E^*$  de 12,5 em pão de trigo com adição de 1% de *C. vulgaris* (Nunes, et al., 2020b).

#### 4.7. Avaliação da textura do pão

A análise de textura do pão foi realizada através de testes TPA. Os dois parâmetros mais representativos da textura do pão são a firmeza e a coesividade. Na Figura 24 encontram-se os valores de firmeza inicial dos pães e na Figura 25 encontram-se os valores de coesividade dos mesmos.

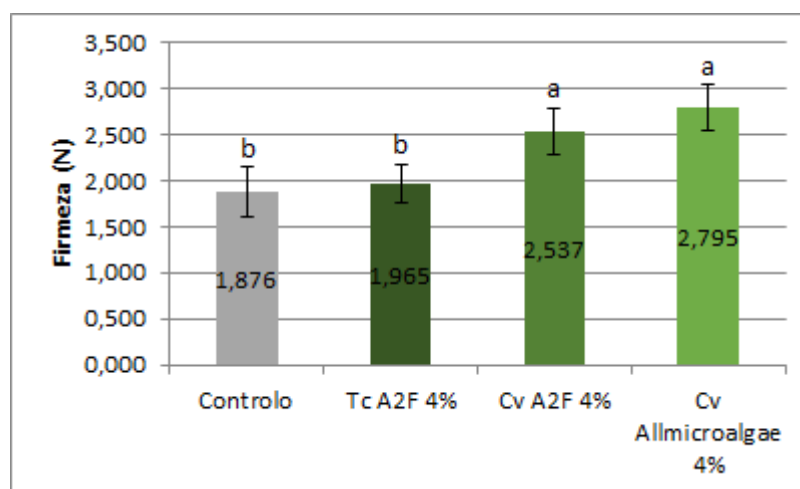


Figura 24 - Valores de firmeza inicial dos pães com as diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*). \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os pães ( $p > 0,05$ )

Os pães que apresentam uma firmeza inicial mais baixa são o pão controlo e o pão com incorporação de 4% *Tetraselmis chuii*, não sendo estes significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ), mas sendo significativamente diferentes dos pães com incorporação de *Chlorella vulgaris* ( $p < 0,05$ ). Por sua vez os pães com incorporação de *Chlorella vulgaris* não são significativamente diferentes entre si, o que permite concluir

que a adição desta microalga na massa do pão reforça a estruturação do produto, este resultado é não é concordante com o obtido num estudo anterior onde se estudou a incorporação de diferentes níveis desta microalga e se verificou que em incorporações de 1 a 5% a firmeza não é diferente da do controlo (Graça, et al., 2018). No entanto, em estudo anterior de incorporação de *T. chuii* em pão sem glúten verificou-se uma clara tendência de aumento da firmeza (Nunes, et al., 2020a).

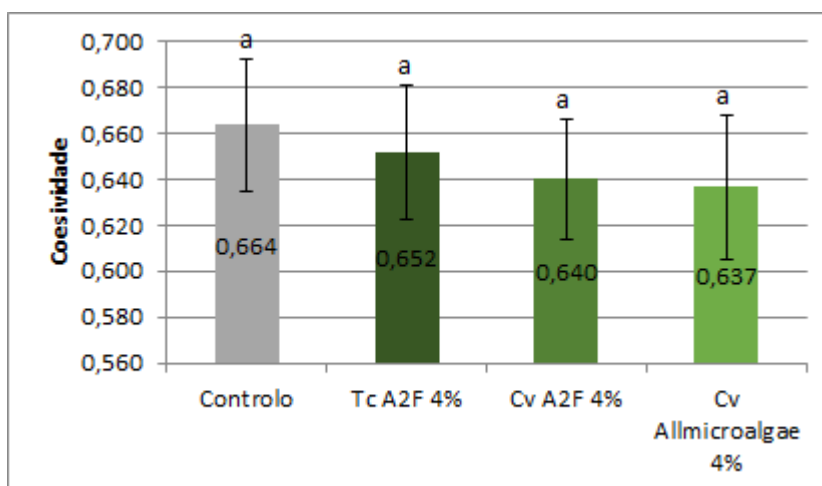


Figura 25- Valores de coesividade dos pães com as diferentes formulações (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*). \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os pães ( $p > 0,05$ )

Quanto à coesividade podemos observar que não existem diferenças significativas entre os pães com as diferentes formulações ( $p > 0,05$ ), permitindo concluir que a adição das microalgas não influenciou significativamente a coesividade dos pães.

Na Figura 26 encontra-se a evolução da firmeza do pão ao longo do tempo de armazenamento, em intervalos de 24 horas até um máximo de 72 horas. A adição de *Tetraselmis chuii* não influencia significativamente a firmeza ao longo do tempo de armazenamento, não sendo significativamente diferente da firmeza do pão controlo em todos os tempos em análise ( $p > 0,05$ ). Quanto aos pães com adição de *Chlorella vulgaris* podemos observar que estes apresentam uma firmeza distinta do pão controlo e com adição de *Tetraselmis chuii* em todos os tempos em análise exceto às 48 horas em que o pão com adição de *Chlorella vulgaris* comercial não é significativamente diferente do pão controlo ( $p > 0,05$ ). Assim, a adição de *Chlorella vulgaris* tem um efeito nefasto no envelhecimento do pão, pelo aumento significativo da firmeza ( $p < 0,05$ ).

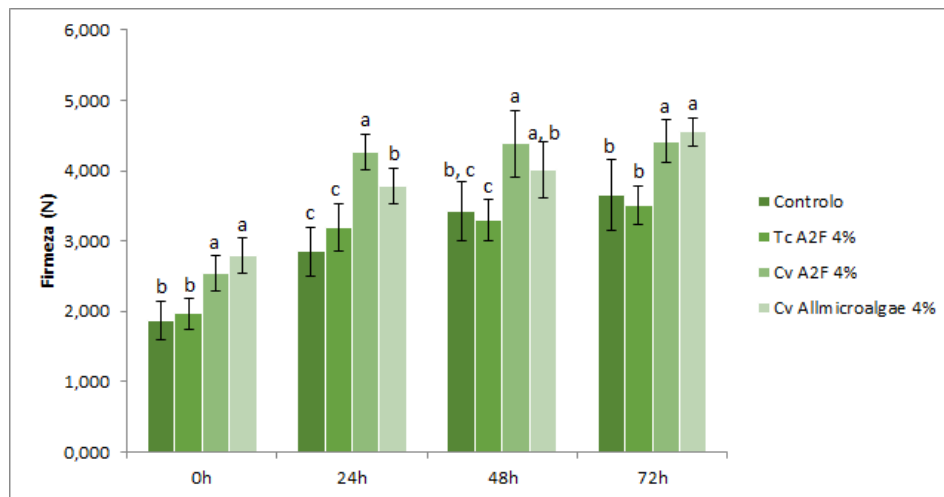


Figura 26 - Evolução da firmeza dos pães (controlo e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*) ao longo do tempo de armazenamento, letras diferentes correspondem a resultados significativamente diferentes para o mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os pães ( $p > 0,05$ )

A partir das médias das firmezas para cada pão em cada hora foi também avaliada a cinética de envelhecimento. Na Figura 27 pode-se observar a firmeza ao longo do tempo de armazenamento. A partir das regressões lineares foram determinados parâmetros: velocidade de envelhecimento (A) e firmeza inicial (B).

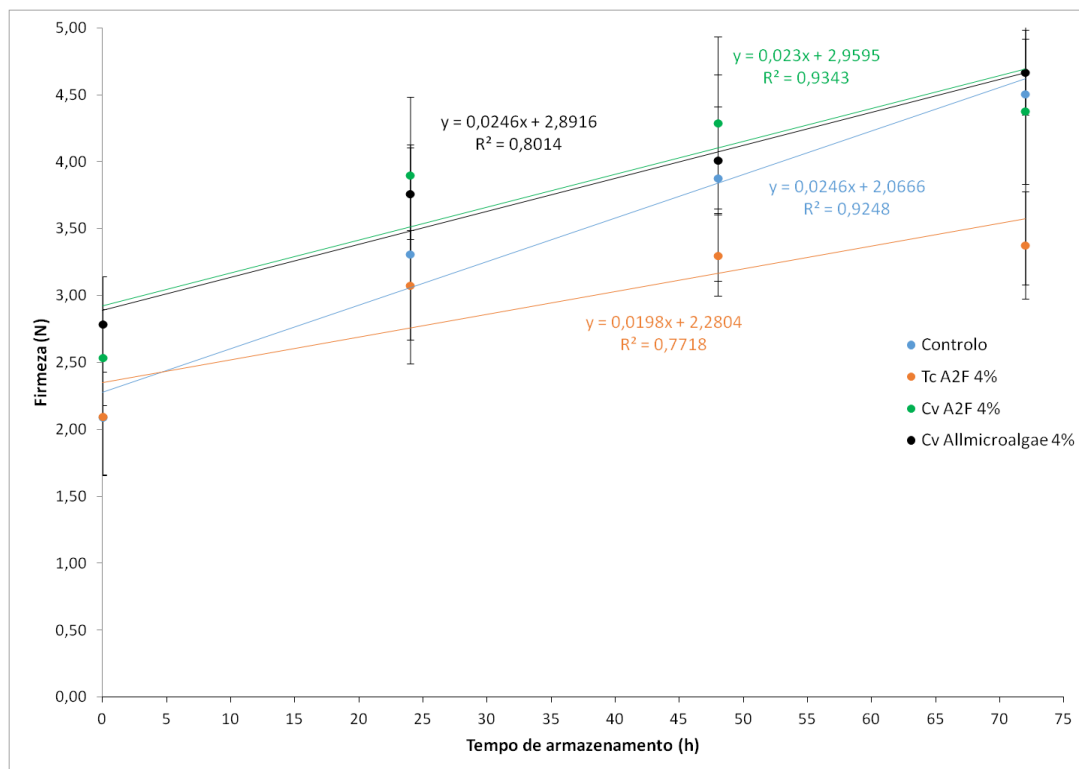


Figura 27 - Cinética de envelhecimento dos pães controlo e com incorporação das microalgas (*T. chuii* e *C. vulgaris*). \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os pães ( $p > 0,05$ )

Na Tabela 12 podemos observar os valores retirados das regressões lineares. Como podemos ver a formulação que apresenta uma menor declive é a formulação com incorporação de *Tetraselmis chuii*, contudo apresenta um menor coeficiente de determinação. As restantes velocidades de envelhecimento têm valores muito próximos uns dos outros.

Tabela 12 - Parâmetros da cinética de envelhecimento retirados das regressões lineares efetuadas

F (N)= A t (h) + B	A	B	R <sup>2</sup>
Controlo	0,0246	2,0666	0,9248
Tc A2F 4%	0,0198	2,2804	0,7718
Cv A2F 4%	0,0230	2,9595	0,9343
Cv Allmicroalgae 4%	0,0246	2,8916	0,8014

A incorporação de microalgas é benéfica na velocidade de envelhecimento exceto no caso da *Chlorella vulgaris* comercial pois apresenta um valor idêntico ao da formulação controlo. Em estudo semelhante da incorporação de *C. vulgaris* em pão de trigo observou-se um efeito nefasto na cinética de envelhecimento diretamente relacionado com a quantidade de incorporação de microalga, em que a incorporação de 4% de microalga correspondeu a um aumento em 72% na velocidade de envelhecimento (Graça, et al., 2018).

#### 4.8. Medição da cor do pão

##### 4.8.1. Cor da còdea

Na Tabela 13 encontram-se os valores dos parâmetros da cor, L\* e coordenadas cromáticas a\* e b\*, assim como a saturação da cor (C\*<sub>ab</sub>), a tonalidade da cor (h<sub>ab</sub>) e a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ), para as còdeas dos pães.

Tabela 13 - Valores do parâmetro L\* e das coordenadas cromáticas a\* e b\*, saturação da cor, a tonalidade da cor e a diferença total de cor das cêdeas dos pães (controle e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*). \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os pães (p>0,05)

	L*	a*	b*	C* <sub>ab</sub>	h <sub>ab</sub>	ΔE*
Controle	71,3 ± 2,4 a	7,9 ± 1,3 a	28,7 ± 3,6 a	29,8 ± 3,8 a	74,6 ± 0,9 b	
Tc 4%	39,9 ± 1,1 c	1,4 ± 0,7 b	20,3 ± 2,4 b,c	20,3 ± 2,3 b,c	85,9 ± 1,3 a	33,1
Cv A2F 4%	42,0 ± 0,7 b,c	0,9 ± 0,2 b	17,8 ± 0,8 c	17,8 ± 0,8 c	87,0 ± 0,7 a	32,0
Cv Allmicroalgae 4%	43,5 ± 2,0 b	0,9 ± 0,4 b	22,2 ± 2,4 b	22,2 ± 2,4 b	87,5 ± 1,3 a	29,4

As cêdeas com coloração mais escura, ou seja, L\* mais baixo, são as dos pães com incorporação de microalgas sendo estas significativamente diferentes da cêdea do pão controle (p<0,05). As cêdeas dos pães com incorporação de microalga apresentam-se numa localização no espaço de cor nas regiões do vermelho e do amarelo, ou seja, valores de a\* e b\* positivos.

Quanto à saturação (C\*<sub>ab</sub>) podemos verificar que as formulações com *Tetraselmis chuii* e com *Chlorella vulgaris* apresentam uma saturação significativamente mais baixa do que a formulação controle (p<0,05), significando que apresentam uma cor menos viva. Em relação à tonalidade (h<sub>ab</sub>), podemos observar que todas as formulações apresentam valores entre 70 e 105°, o que corresponde a uma tonalidade amarela, a formulação controle apresenta um valor significativamente diferente das formulações com incorporação de microalgas (p<0,05). No entanto, a tonalidade observada é de um verde-escuro em todas as cêdeas dos pães com incorporação de microalgas. A formação de compostos de cor acastanhada decorrentes da degradação da clorofila, tais como feoforbídeos e pirofeoforbídeos, também pode afetar a percepção visual da cor e, consequentemente, o posicionamento da amostra dentro do espaço tridimensional L\*a\*b\* (Batista, et al., 2019).

Quanto à diferença total de cor podemos observar que entre qualquer uma das formulações com incorporação de microalga e a formulação controle existe uma clara percepção da diferença na cor das massas, uma vez que o ΔE\* é muito superior a 3,5 (Mokrzycki & Tatol, 2011).

A diferença de cor é importante na aceitabilidade pelo consumidor, como por exemplo, em pão com incorporação de 3% de *Spirulina* não foi bem aceite pelo painel de consumidores devido à sua cor mais pronunciada, mais diferente da do controle (Achour, et al., 2014).

#### 4.8.2. Cor do miolo

Na Tabela 14 encontram-se os valores dos parâmetros da cor,  $L^*$  e coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$ , assim como a saturação da cor ( $C^*_{ab}$ ), a tonalidade da cor ( $h_{ab}$ ) e a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ), para os miolos dos pães.

Tabela 14 - Valores do parâmetro  $L^*$  e das coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$ , saturação da cor, a tonalidade da cor e a diferença total de cor dos miolos dos pães (controle e com incorporação das microalgas *T. chuii* e *C. vulgaris*). \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os pães ( $p > 0,05$ )

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
Controlo	75,0 ± 1,1 a	0,5 ± 0,2 a	18,3 ± 0,3 c	18,3 ± 0,3 c	88,4 ± 0,5 c	
Tc 4%	37,8 ± 0,8 c	-3,4 ± 0,4 c	31,6 ± 1,0 a	31,8 ± 1,0 a	96,1 ± 0,6 a	39,8
Cv A2F 4%	35,2 ± 1,2 d	-2,0 ± 0,1 b	24,6 ± 0,7 b	24,7 ± 0,7 b	94,6 ± 0,2 b	40,4
Cv Allmicroalgae 4%	41,4 ± 0,8 b	-3,0 ± 0,8 c	30,7 ± 2,0 a	30,8 ± 1,9 a	95,6 ± 1,8 a,b	36,0

O miolo que apresenta uma coloração mais clara, ou seja,  $L^*$  mais elevado, é o do pão controlo sendo este significativamente diferente dos restantes miolos ( $p < 0,05$ ). Os miolos das formulações com incorporação de microalga apresentam-se numa localização no espaço de cor nas regiões do verde e do amarelo, ou seja, valores de  $a^*$  negativos e  $b^*$  positivos, enquanto a formulação controlo se encontra nas regiões do vermelho e do amarelo (valores de  $a^*$  e  $b^*$  positivos).

Quanto à saturação ( $C^*_{ab}$ ) podemos verificar que as formulações com *Tetraselmis chuii* e com *Chlorella vulgaris* comercial apresentam uma saturação significativamente mais elevada do que a formulação controlo ( $p < 0,05$ ), significando que apresentam uma cor mais viva. Em relação à tonalidade ( $h_{ab}$ ), podemos observar que todas as formulações apresentam valores entre 70 e 105°, o que corresponde a uma tonalidade amarela, a formulação controlo apresenta um valor significativamente mais baixo do que as formulações com incorporação de microalgas ( $p < 0,05$ ). No entanto, a cor observada é verde em todos os miolos dos pães com incorporação de microalgas (Figura 28). A formação de compostos de cor acastanhada decorrentes da degradação da clorofila, tais como feoforbídeos e pirofeoforbídeos, pode afetar a perceção visual da cor e, conseqüentemente, o posicionamento da amostra dentro do espaço tridimensional  $L^*a^*b^*$  (Batista, et al., 2019).

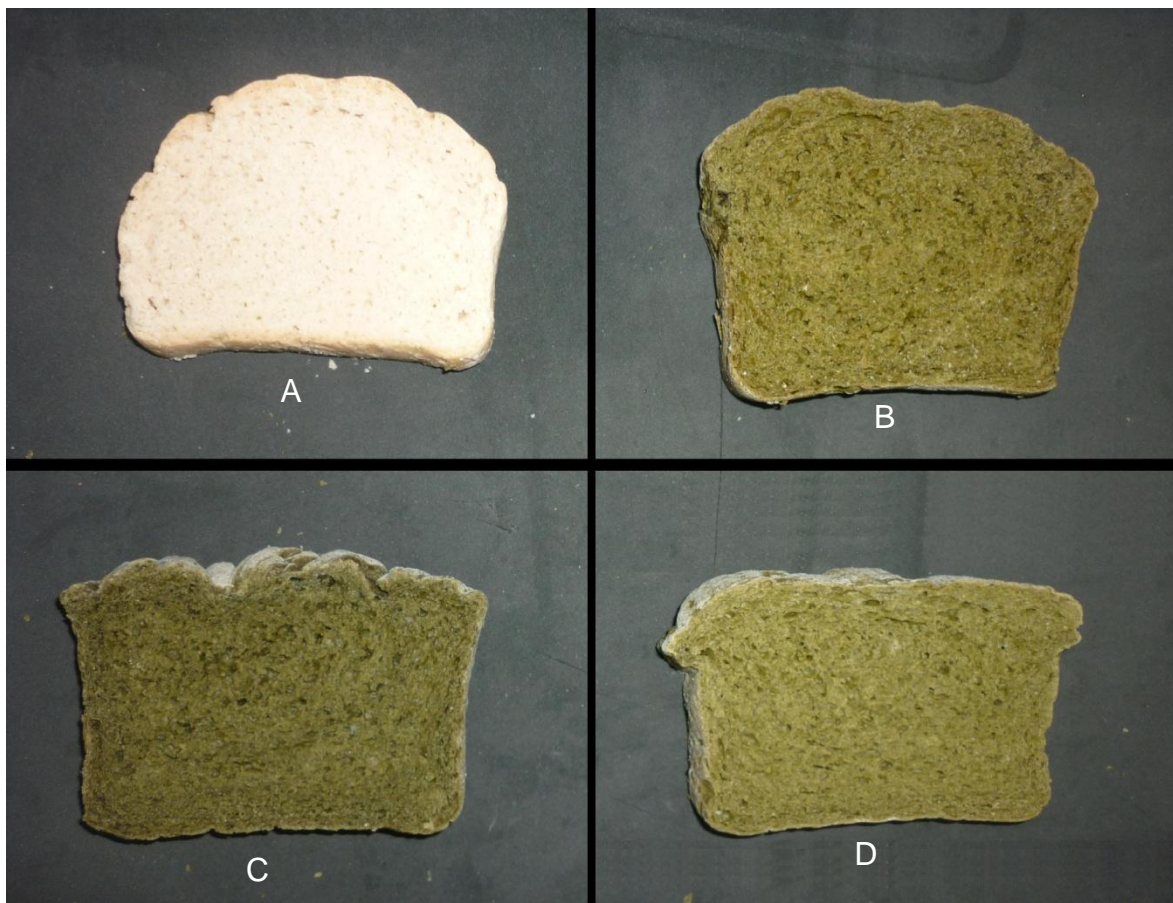


Figura 28 - Fotografias de fatias de pão. A) Controlo B) *T. chuii* C) *C. vulgaris* A2F D) *C. vulgaris* Allmicroalgae

Quanto à diferença total de cor podemos observar que entre qualquer uma das formulações com incorporação de microalga e a formulação controlo existe uma clara percepção da diferença na cor do miolo, uma vez que o  $\Delta E^*$  é superior a 3,5 (Mokrzycki & Tatol, 2011), resultados concordantes com outros estudos, sendo de 12,5 no caso de incorporação com 1% de *C. vulgaris* (Nunes, et al., 2020b). Em estudo sobre a incorporação de *T. chuii* em pão sem glúten observou-se uma diferença total de cor de 77, muito superior à obtida neste trabalho (Nunes, et al., 2020a).

#### 4.9. Determinação da atividade da água, do teor de humidade, das perdas na cozedura e do volume dos pães

Na Tabela 15 encontram-se representados os resultados obtidos para a atividade da água ( $a_w$ ), humidade, volume, volume específico e perdas na cozedura dos diferentes pães, sendo que as determinações do volume e das perdas na cozedura apenas foram realizadas em duplicado.

Tabela 15 - Valores de atividade da água ( $a_w$ ), humidade, volume, volume específico e perdas na cozedura dos diferentes pães. \*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os pães ( $p>0,05$ )

	$a_w$	Humidade (%)	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume específico (cm <sup>3</sup> /g)	Perdas na cozedura (%)
Controlo	0,93 ± 0,01 a	40,99 ± 0,51 b	1130	2,73	15,52
Tc 4%	0,92 ± 0,01 a	42,18 ± 0,17 a	1210	2,91	16,07
Cv A2F 4%	0,93 ± 0,01 a	42,40 ± 0,16 a	1175	2,79	15,76
Cv Allmicroalgae 4%	0,93 ± 0,003 a	42,32 ± 0,32 a	1082,5	2,57	14,86

Através da análise de resultados é possível concluir que a atividade da água para todos os pães é bastante elevada, pois esta encontra-se próxima de 1. Os valores obtidos são semelhantes aos existentes em bibliografia, encontrando-se entre os valores obtidos para pão de trigo com incorporação a 1,5% de *I. galbana*, *T. suecica*, *S. almeriensis* e *N. gaditana* (perto de 0,98) (García-Segovia, et al., 2017) e os valores obtidos para pão sem glúten com incorporação a 3% de *Chlamydomonas* sp e *N. gaditana* (entre de 0,83 e 0,89) (Khemiri, et al., 2020). Os pães com incorporação de microalgas apresentam uma atividade da água não significativamente diferente da do pão controlo ( $p>0,05$ ). Assim, pode concluir-se que a adição de microalgas não tem impacto significativo na atividade da água, *i.e.*, na conservação do pão.

Verifica-se que a adição de microalgas aumenta o teor de humidade dos pães, sendo que, os valores de humidade destes são significativamente mais elevados do que a humidade do pão controlo ( $p<0,05$ ).

Quanto ao volume específico dos pães podemos observar que o pão com incorporação de *Tetraselmis chunii* possui um valor mais elevado e o pão com incorporação de *Chlorella vulgaris* comercial o que apresenta um menor volume específico. Um menor volume específico do pão pode estar relacionado com uma maior firmeza do miolo, no entanto, a firmeza do controlo não é significativamente diferente da do pão com 4% de *T. chunii* ( $p>0,05$ ). No caso dos pães com incorporação de *C. vulgaris*, ambos apresentam valores de firmeza superiores ao controlo mas o pão com *C. vulgaris* do A2F apresenta um volume específico superior ao controlo.

Os valores obtidos para a formulação controlo são ligeiramente superiores aos encontrados na literatura (2,27 cm<sup>3</sup>/g), num estudo sobre a incorporação de Spirulina em pão de trigo (Achour, et al., 2014). Nesse estudo, o volume específico aumentou significativamente com incorporações de 1 e 3% de Spirulina (Achour, et al., 2014). O

aumento do volume específico também foi observado em pão de mistura de trigo e centeio com incorporação de *Dunaliella salina* a 5, 7,5 e 10% (Tertychnaya, et al., 2020).

Um estudo em incorporação de *C. sorokiniana* a 2,5 e 5% em pão sem glúten não obteve diferenças significativas no volume específico entre as formulações (1,9 cm<sup>3</sup>/g para todas as formulações) (Diprat, et al., 2020). No caso das perdas na cozedura todas as formulações têm valores muito semelhantes, o que significa que a retenção de água é bastante semelhante entre o controlo e os pães com incorporação de microalgas, não sendo este afetado pela incorporação a 4% destas microalgas. Um estudo em incorporação de *C. sorokiniana* a 2,5 e 5% em pão sem glúten também não obteve diferenças significativas entre as formulações (14,5 para o controlo e de 13,4 para 2,5 e 5% de microalga) (Diprat, et al., 2020).

## 5. Conclusão

As microalgas, muito embora já sejam usadas na alimentação humana há milhares de anos, podem hoje ser encaradas como novos ingredientes sustentáveis, com uma reduzida pegada de carbono no processo de produção, e com inúmeros compostos biológicos de interesse, desde compostos com propriedades antioxidantes, anti-tumorais, e anti-inflamatórios, entre outros. Estas apresentam também um elevado valor nutricional. Ao longo das últimas décadas têm vindo a ser desenvolvidos vários produtos com microalgas, no entanto, é necessário ter em conta a aceitabilidade destes por parte dos consumidores, pois níveis tecnologicamente aceitáveis podem não o ser sensorialmente.

Com os estudos apresentados nesta dissertação, concluiu-se que a incorporação de biomassa das microalgas *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* têm impacto nas propriedades reológicas das massas e na aptidão tecnológica dos pães de trigo.

A determinação das propriedades reológicas durante a mistura da farinha e microalga, analisadas no micro-doughLAB, permitiu concluir que a adição de microalga aumenta o tempo de desenvolvimento da massa e a estabilidade, levando a concluir que a massa fica mais estruturada.

Com a adição de *Chlorella vulgaris* ocorre um aumento da firmeza da massa fermentada, devido ao reforço da estrutura, atribuído ao seu elevado teor em proteína. A adição de ambas as microalgas produzidas no âmbito do projeto A2F, *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chuii*, provocou um aumento da coesividade das massas.

A caracterização das massas fermentadas através do seu comportamento viscoelástico linear permitiu detetar diferenças que estarão relacionadas com a estrutura interna do material. Todas as massas possuem um comportamento predominantemente elástico. A adição da *Chlorella vulgaris* do projeto A2F provocou um aumento do nível de estruturação da massa, enquanto a adição de *Tetraselmis chuii* provocou uma destabilização da estrutura, e também provocou uma diminuição acentuada da extensibilidade da massa fermentada, medida no texturómetro com recurso à sonda SMS/Kieffer Dough.

As massas controlo e com incorporação da *Chlorella vulgaris* do projeto apresentam uma tonalidade verde amarelada, enquanto as massas com incorporação de *Tetraselmis chuii* e de *Chlorella vulgaris* comercial apresentam uma tonalidade verde. Depois da cozedura todas as côdeas e os miolos dos pães apresentaram uma tonalidade verde.

Aptidão tecnológica dos pães sofre alteração com a adição de biomassa microalgal às formulações. Com a adição de *Chlorella vulgaris* ocorre um aumento da firmeza do pão, enquanto a adição de *Tetraselmis chuii* não tem efeito na firmeza. Quanto

à cinética de envelhecimento do pão, a microalga que se destacou pelo seu efeito benéfico foi a *Tetraselmis chuii*, atrasando este fenómeno.

A adição das microalgas teve impacto na humidade, sendo que esta aumentou significativamente, a atividade da água não sofreu alterações. O volume específico dos pães também se alterou, sendo que a incorporação de *Tetraselmis chuii* foi a que teve um impacto positivo maior e a adição de *Chlorella vulgaris* comercial teve um efeito negativo no volume específico, estando relacionado com a firmeza do pão. As biomassas de *Chlorella vulgaris* utilizadas têm composições diferentes, mas também têm processos de produção e secagem diferentes, que provocam alterações substanciais nas características das biomassas, conduzindo a resultados diferentes apesar de as biomassas incorporadas serem da mesma espécie.

A cor dos pães é verde, exceto a do controlo que é amarela, apesar de as coordenadas no espaço de cor indicarem que pertencem à zona dos amarelos. Todas as amostras apresentam uma diferença total de cor para o controlo superior a 35, significando que o olho humano distingue perfeitamente as amostras com incorporação de microalgas do controlo.

Seria ainda importante realizar os estudos da composição nutricional, da atividade antioxidante, da biodigestibilidade e a análise sensorial que estavam inicialmente previstos e que não foi possível realizar devido à pandemia de SARS-CoV-2.

## 6. Bibliografia

- Abd El Baky, H., El baroty, G., & Ibrahem, E. (2015). "Functional characters evaluation of biscuits sublimated with pure phycocyanin isolated from *Spirulina* and *Spirulina* biomass." *Nutricion Hospitalaria*, 32, pp. 231-241.
- Achour, H., Doumandji, A., Sadi, S., & Saadi, S. (2014). "Evaluation of nutritional and sensory properties of bread enriched with *Spirulina*." *Annals Food Science and Technology*, 15(2), pp. 270–275.
- Ak, B., Avşaroğlu, E., Isik, O., Ozyurt, G., Kafkas, E., Etyemez, M., & Uslu, L. (2016). "Nutritional and Physicochemical Characteristics of Bread Enriched with Microalgae *Spirulina platensis*." *International Journal of Engineering Research and Application*, 6, pp. 30-38.
- Babuskin, S., Krishnan, K. E., Babu, P. A., Sivarajan, M., & Sukumar, M. (2014). "Functional Foods Enriched with Marine Microalga *Nannochloropsis oculata* as a Source of  $\omega$ -3 Fatty Acids." *Food Technology and Biotechnology*, 52(3), pp. 292–299.
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. (2019). "Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition." *Marine Drugs*, 17, p. 340.
- Barnes, H., Hutton, J., & Walters, K. (1989). "An introduction to rheology." (Vol. 3). n.l.: Elsevier.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). "Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products." *Algal Research*, 2, pp. 164-173.
- Batista, A. P., Niccolai, A., Bursic, I., Sousa, I., Raymundo, A., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). "Microalgae as Functional Ingredients in Savory Food Products: Application to Wheat Crackers." *Foods*, 8(12), p. 611.
- Batista, A. P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I., & Raymundo, A. (2017). "Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility." *Algal Research*, 26, pp. 161–171.

- Bernaerts, T. M. (2017). "Microalgal biomass as a (multi)functional ingredient in food products: Rheological properties of microalgal suspensions as affected by mechanical and thermal processing." *Algal Research*, 25, pp. 452–463.
- Bernaerts, T. M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Kermani, Z. J., Vandionant, S., Foubert, I., Hendricckx, M. E., & Van Loey, A. M. (2018). "Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides." *Algal Research*, 32, pp. 150-161.
- Bolanho, B., Egea, M., Morocho-Jácome, A., Campos, I., Carvalho, J., & Danesi, E. (2014). "Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre." *Journal of Food and Nutrition Research*, 53, pp. 171-179.
- Borowitzka, M. A. (2018). "Biology of Microalgae." In *Microalgae in Health and Disease Prevention*, I. A. Levine, & J. Fleurence (Edits.), (pp. 23-72). Academic Press, ISBN 9780128114056.
- Bourne, M. C. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement (Second Edition)*. Academic Press, ISBN 9780121190620.
- Burešová, I., Kráčmar, S., Dvořáková, P., & Středa, T. (2014). "The relationship between rheological characteristics of gluten-free dough and the quality of biologically leavened bread." *Journal of Cereal Science*, 60(2), pp. 271–275.
- Cauvain, S. (2012). "Breadmaking: an overview." In *Breadmaking*, S. Cauvain (Ed.), (Second Edition, pp. 9-31). Woodhead Publishing, ISBN 9780857090607.
- Choudhury, A. K. (2014). "Using instruments to quantify colour." In *Principles of Colour and Appearance Measurement*, A. K. Choudhury, (1st Edition, pp. 270–317). United Kingdom: Woodhead Publishing.
- Coulombier, N., Blanchier, P., Le Dean, L., Barthelemy, V., Lebouvier, N., & Jauffrais, T. (2020). "The effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification on *Tetraselmis* biomass production, photophysiology and antioxidant activity: a comparison using batch and continuous culture." *Journal of Biotechnology*.
- Diprat, A. B., Silveira Thys, R. C., Rodrigues, E., & Rech, R. (2020). "Chlorella sorokiniana: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread." *LWT - Food Science and Technology*, 134, p. 109974.

- Dobraszczyk, B. J., & Morgenstern, M. P. (2003). "Rheology and the breadmaking process." *Journal of Cereal Science*, 38(3), pp. 229-245.
- Donato, N. R., Queiroz, A. J., Feitosa de Figueirêdo, R. M., Feitosa, R. M., Moreira, I. D., & Lima, J. F. (2019). "Production of Cookies Enriched With *Spirulina platensis* Biomass." *Journal of Agricultural Studies*, 7(4), pp. 323-342.
- Dunnewind, B., Sliwinski, E. L., Grolle, K., & Vliet, T. (2003). "The Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig - An Experimental Evaluation." *Journal of Texture Studies*, 34(5-6), pp. 537-560.
- El Khoury, D., Bafour-Ducharme, S., & Joye, I. J. (2018). "A Review on the Gluten-Free Diet: Technological and Nutritional Challenges." *Nutrients*, 10, pp. 1410-1435.
- Fang, X., Wei, C., Zhao-Ling, C., & Fan, O. (2004). "Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp." *Journal of Applied Phycology*, 16(6), pp. 499-503.
- Figueira, F. d., Crizel, T. d., Silva, C. R., & Salas-Mellado, M. d. (2011). "Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*." *Brazilian Journal of Food Technology*, 14 (4), pp. 308-316.
- Finney, K. F., Pomeranz, Y., & Bruinsma, B. (1984). "Use of algae *Dunaliella* as a protein supplement in bread." *Cereal Chemistry*, 61(5), pp. 402-406.
- Food Processing. (23 de novembro de 2020). "Top food trends to accelerate innovation in 2021." Obtido em 16 de dezembro de 2020, de Food Processing: <https://www.foodprocessing.com.au/content/food-design-research/news/top-food-trends-to-accelerate-innovation-in-2021-1295020614>
- Fradinho, P., Niccolai, A., Soares, R., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020). "Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta." *Algal Research*, 45, p. 101743.
- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2010). "Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), pp. 1656-1664.

- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2013). "Isochrysis galbana and Diacronema vlkianum biomass incorporation in pasta products as PUFA's source." *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), pp. 312–319.
- Friedman, H. H., Whitney, J. E., & Szczesniak, A. S. (1963). "The Texturometer? A New Instrument for Objective Texture Measurement." *Journal of Food Science*, 28(4), pp. 390–396.
- García-Segovia, P., García Alcaraz, V., Tárrega, A., & Martínez-Monzó, J. (2020). "Consumer perception and acceptability of microalgae based breadstick." *Food Science and Technology International*, 26(6), pp. 493–502.
- García-Segovia, P., Pagán-Moreno, M. J., Lara, I. F., & Martínez-Monzó, J. (2017). "Effect of microalgae incorporation on physicochemical and textural properties in wheat bread formulation." *Food Science and Technology International*, 0, pp. 1-11.
- Ghaly, A., Hammouda, A., & Al Hattab, M. (2015). "Development and Sensory Evaluation of Spirulina Chocolate Chip Oatmeal Cookies." *International Journal of Bioprocess and Biotechnological Advancements*, 1(2), pp. 63-73.
- Golmakani, M., Moayyedi, M., Raissjalali, A., Pasaran, Y., & Aghajani, A. (2015). "Investigation of Physicochemical, Nutritional, Textural, and Sensory Properties of Iranian Yazdi Cupcake Enriched with Spirulina (*Arthrospira platensis*)." In *International Conference on Latest Trends in Food, Biological & Ecological Sciences* (Vol. 7, pp. 30-34). Dubai (UAE).
- Gouveia, L., Batista, A. P., Miranda, A., Empis, J., & Raymundo, A. (2007). "Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies." *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), pp. 433–436.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2008). "Functional biscuits with PUFA- $\omega$ 3 from Isochrysis galbana." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), pp. 891-896.
- Gouveia, L., Marques, A. E., Sousa, J. M., Moura, P., & Bandarra, N. M. (2010). "Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients." *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(2), pp. 21–37.

- Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., & Raymundo, A. (2018). "Impact of *Chlorella vulgaris* on the rheology of wheat flour dough and bread texture." *LWT - Food Science and Technology*, 89, pp. 466-474.
- Hadnađev, T., Pojić, M., Hadnađev, M., & Torbica, A. (2011). "The Role of Empirical Rheology in Flour Quality Control." In *Wide Spectra of Quality Control*, I. Akyar (Ed.), (pp. 335-360). Rijeka, Croácia: InTech.
- Hossain, A. K., Brennan, M. A., Mason, S. L., Guo, X., Zeng, X. A., & Brennan, C. S. (2017). "The Effect of Astaxanthin-Rich Microalgae "*Haematococcus pluvialis*" and Wholemeal Flours Incorporation in Improving the Physical and Functional Properties of Cookies." *Foods*, 6(8), p. 57.
- Hu, Q. (2013). "Environmental Effects on Cell Composition." In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 114–122), John Wiley & Sons, <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch7>.
- Khemiri, S., Khelifi, N., Nunes, M. C., Ferreira, A., Gouveia, L., Smaali, I., & Raymundo, A. (2020). "Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties." *Algal Research*, 50, p. 101998.
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019). "Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans." *Food Science and Human Wellness*, 8(1), pp. 16–24.
- Lafarga, T., Mayre, E., Echeverria, G., Viñas, I., Villaró, S., Ación-Fernández, F. G., Castellari, M., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). "Potential of the microalgae *Nannochloropsis* and *Tetraselmis* for being used as innovative ingredients in baked goods." *LWT - Food Science and Technology*, 115, p. 108439.
- Lucas, B. F., Morais, M. G., Santos, T. D., & Costa, J. A. (2017). "Effect of *Spirulina* addition on the physicochemical and structural properties of extruded snacks." *Food Science and Technology*, 37(spe), pp. 16–23.
- Lucas, B. F., Morais, M. G., Santos, T. D., & Costa, J. A. (2018). "*Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations." *LWT - Food Science and Technology*, 90, pp. 270-276.

- Masure, H. G., Fierens, E., & Delcour, J. A. (2016). "Current and forward looking experimental approaches in gluten-free bread making research." *Journal of Cereal Science*, 67, pp. 92-111.
- McKenna, B. M., & Lyng, J. G. (2001). "Rheological measurements of foods." In *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*, E. Kress-Rogers, & C. J. Brimelow (Edits.), (2nd Edition, pp. 425-452). Woodhead Publishing.
- McLellan, M. R., Lind, L. R., & Kime, R. W. (1995). "Hue angle determinations and statistical analysis for multiquadrant Hunter L,a,b data." *Journal of Food Quality*, 18(3), pp. 235–240.
- Minolta. (2007). *Precise Color Communication*. Osaka, Japão: Konica Minolta Sensing, Inc, 9242-4830-92.
- Mohammadi, M., Kazeroni, N., & Javaheri Baboli, M. (2015). "Fatty Acid Composition of the Marine Micro Alga *Tetraselmis Chuii* Butcher in Response to Culture Conditions." *Journal of Algal Biomass Utilization*, 6(2), pp. 49–55.
- Mokrzycki, W., & Tatol, M. (2011). "Color Difference Delta E - A Survey." *Machine Graphics and Vision*, 20(4), pp. 383–411.
- Mondal, A., & Datta, A. (2008). "Bread baking – A review." *Journal of Food Engineering*, 86, pp. 465–474.
- Moore, T. R. (2016). "Breads". In *Reference Module in Food Science*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00116-5>.
- Morais, M. G., Miranda, M. Z., & Costa, J. A. (2006). "Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físicoquímicas, sensoriais e digestibilidade." *Alimentos e Nutrição*, 17(3), pp. 323–328.
- Mostolizadeh, S. S., Moradi, Y., Mortazavi, M. S., Motallebi, A. A., & Ghaeni, M. (2019). "Effects of incorporation *Spirulina platensis* (Gomont, 1892) powder in wheat flour on chemical, microbial and sensory properties of pasta." *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(1), pp. 410-420.
- New Nutrition Business. (2020). *10 Key Trends in Food, Nutrition & Health 2021*. Acesso em: 16 de dezembro de 2020, de New Nutrition Business: <https://www.new-nutrition.com/keytrend?id=195>

- Niccolai, A., Venturi, M., Galli, V., Pini, N., Rodolfi, L., Biondi, N., D'Ottavio, M., Batista, A. P., Raymundo, A., Granchi, L., & Tredici, M. R. (2019). "Development of new microalgae-based sourdough "crostini": functional effects of *Arthrospira platensis* (spirulina) addition." *Scientific Reports*, 9(1), p. 19433.
- Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B., & Lemaire, J. (2020). "Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review." *Biotechnology Advances*, 45, p. 107650.
- Nunes, M. C., Fernandes, I., Vasco, I., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020a). "Tetraselmis chuii as a Sustainable and Healthy Ingredient to Produce Gluten-Free Bread: Impact on Structure, Colour and Bioactivity." *Foods*, 9(5), p. 579.
- Nunes, M. C., Graça, C., Vlaisavljević, S., Tenreiro, A., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020b). "Microalgal cell disruption: Effect on the bioactivity and rheology of wheat bread." *Algal Research*, 45, pp. 1-11.
- Onacik-Gür, S., Zbikowska, A., & Majewska, B. (2018). "Effect of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) addition on textural and quality properties of cookies." *Italian Journal of Food Science*, 30, pp. 1-12.
- Padalino, L., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2016). "Overview on the General Approaches to Improve Gluten-Free Pasta and Bread." *Foods*, 5, pp. 87-105.
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Georgalaki, M., Alexandraki, V., Kazou, M., Anastasiou, R., & Tsakalidou, E. (2019). "Sourdough Bread." In *Innovations in Traditional Foods*, C. M. Galanakis (Ed.), (1st Edition, pp. 127–158). Woodhead Publishing, ISBN 978-0-12-814887-7.
- Perten Instruments. (2017). *Micro-DoughLAB 2800 Installation and Operation Manual*.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). "Valuable products from biotechnology of microalgae." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), pp. 635–648.
- Rao, M. A. (2007). "Measurement of Flow and Viscoelastic Properties." In *Rheology of Fluid and Semisolid Foods* (2nd Edition ed., pp. 59–151). n.l.: Springer US.
- Regulamento (UE) N.º 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de novembro de 2015 relativo a novos alimentos.

Regulamento de Execução (UE) n.º 2017/2470 da Comissão de 20 de dezembro de 2017 que estabelece a lista da União de novos alimentos.

Rodríguez De Marco, E., Steffolani, M. E., Martínez, C. S., & León, A. E. (2014). "Effects of spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta." *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), pp. 102–108.

Rosell, C. M. (2019). "Trends in Science of Doughs and Bread Quality." In *Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention*, V. R. Preedy, & R. R. Watson (Edits.), (Second Edition, pp. 333–343). Academic Press.

Różyło, R., Hassoon, W. H., Gawlik-Dziki, U., Siastała, M., & Dziki, D. (2017). "Study on the physical and antioxidant properties of gluten-free bread with brown algae." *CyTA - Journal of Food*, 15, pp. 196-203.

Rubel, W. (2011). *Bread: A Global History*. (1st Edition). London: Reaktion Books.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp. 265-278.

Sahni, P., Sharma, S., & Singh, B. (2019). "Evaluation and quality assessment of defatted microalgae meal of *Chlorella* as an alternative food ingredient in cookies." *Nutrition & Food Science*, 49(2), pp. 221-231.

Sanjari, S., Sarhadi, H., & Shahdadi, F. (2018). "Investigating the Effect of *Spirulina Platensis* Microalgae on Textural and Sensory Properties of Baguette Bread." *Journal of Nutrition and Food Security*, 3, pp. 218-225.

Shetty, V., & Sibi, G. (2014). "Relationship Between Total Phenolics Content and Antioxidant Activities of Microalgae Under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth." *Journal of Food Resource Science*, 4(1), pp. 1–9.

Singh, P., Singh, R., Jha, A., Rasane, P., & Gautam, A. K. (2013). "Optimization of a process for high fibre and high protein biscuit." *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), pp. 1394–1403.

Sousa, I. (2001). "A Reologia Dos Produtos Alimentares." In *Reologia e as Suas Aplicações Industriais*, A. G. Castro, J. Covas, & A. Diogo (Edits.) (pp. 131–57). Lisboa: Instituto PIAGET, ISBN 978-972-771-382-0.

- Tańska, M., Konopka, I., & Ruszkowska, M. (2017). "Sensory, Physico-Chemical and Water Sorption Properties of Corn Extrudates Enriched with Spirulina." *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(3), pp. 250–257.
- Tertychnaya, T., Manzhesov, V., Andrianov, E., & Yakovleva, S. (2020). "New aspects of application of microalgae *Dunaliella Salina* in the formula of enriched bread." In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 422, 012021.
- Tietze, S., Jekle, M., & Becker, T. (2016). "Possibilities to derive empirical dough characteristics from fundamental rheology". *Trends in Food Science & Technology*, 57, pp. 1-10.
- University of Texas at Austin. (2020). Obtido em 15 de outubro de 2020, de UTEX Culture Collection of Algae: <https://utex.org/>
- Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2019). "Effect of microalgae addition on mineral content, colour and mechanical properties of breadsticks." *Food & Function*, 10(8), pp. 4685–4692.
- Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., Reino-Moyón, J., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2020). "Effect of Microalgae (*Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*) Addition on 3D Printed Cookies." *Food Biophysics*, 16(1), pp. 27–39.
- Vieira, M. V., Oliveira, S. M., Amado, I. R., Fasolin, L. H., Vicente, A. A., Pastrana, L. M., & Fuciños, P. (2020a). "3D printed functional cookies fortified with *Arthrospira platensis*: Evaluation of its antioxidant potential and physical-chemical characterization." *Food Hydrocolloids*, 107, p. 105893.
- Vieira, R. C., Medeiros, J. A., do Nascimento, M. A., Abud, A. K., Raymundo, A., & Silva, C. E. (2020b). "Microalgae as sustainable food: incorporation as strategy in the formulation of functional food." In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, A. A. Rastegari, A. N. Yadav, & N. Yadav (Edits.), (pp. 19-30), Elsevier, ISBN 9780128205280.
- World Register of Marine Species. (2020). Acesso em: 10 de novembro de 2020, de WoRMS: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=browser&id=160576#focus>

Zouari, N., Abid, M., Fakhfakh, N., Ayadi, M. A., Zorgui, L., Ayadi, M., & Attia, H. (2011). "Blue-green algae (*Arthrospira platensis*) as an ingredient in pasta: free radical scavenging activity, sensory and cooking characteristics evaluation." *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), pp. 811–813.