

# **Desenvolvimento de pães sem glúten enriquecidos com *Tetraselmis chuii***

**Isabel Cristina Xavier Fernandes**

Dissertação para a obtenção do Grau Mestre em

**Engenharia Alimentar**

**Orientadoras:** Prof. Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo  
Prof. Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes

**Júri:**

**Presidente:** Prof. Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

**Vogais:** Prof. Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, Professora Auxiliar da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia.

Prof. Doutor Nuno Bartolomeu Mendes Godinho de Alvarenga, Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de mais quero expressar o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que direta ou indiretamente proporcionaram a minha formação em Engenharia Alimentar ao longo destes 5 anos, e em especial para a realização desta dissertação que resulta no seu culminar.

Em primeiro lugar, às professoras Anabela Raymundo e Cristiana Nunes por me terem aceite como sua orientanda, por toda a dedicação, ajuda, pelos esclarecimentos, pela paciência e por todo o apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho. E obviamente, um obrigado, pela revisão profunda deste documento.

Um obrigado, a todas as pessoas que partilharam os Laboratórios de Cereais e de Reologia e que de alguma forma me permitiram evoluir no desenvolvimento do produto e na aprendizagem dos diversos métodos de trabalho necessários e para me tornar autónoma nas minhas análises.

À minha família, e principalmente aos meus pais que me proporcionaram a minha formação, que sempre me apoiaram e me fizeram ver as coisas tal como são, que os obstáculos são ultrapassáveis e que não podemos desistir no primeiro problema. Vir para a capital e deixar a família no Norte não foi fácil, mas graças a eles e a tudo o que me ensinaram e ensinam diariamente pude crescer e evoluir. A vocês devo-vos tudo o que sou hoje.

A todos os amigos e colegas de faculdade que contribuíram para a minha formação enquanto Engenheira Alimentar, em especial ao Flávio Justo, Isabela Hipólito, Flávia Santos, Daniela Carvalho, Guilherme Roxo e a Ana Marujo que partilharam a casa e momentos únicos e que permaneceram para sempre.

A todos da “família” McDonalds Colombo pela paciência, ajuda, incentivos e apoio, em especial ao António Carvalho, Nélon Gonçalves, Henrique Ribeiro, Sandra Santos, Ana Lima, Helena Duarte, Tomás Martins e André Costa que se revelaram fundamentais.

E, por último, quero agradecer a todos os professores e a todas as pessoas que se cruzaram na minha vida e que se revelaram importantes no meu percurso.

## RESUMO

Atualmente, devido ao aumento do número de pessoas que sofrem da doença celíaca, o mercado dos alimentos isentos de glúten tem vindo a expandir a oferta, no entanto, para além de não serem sensorialmente apelativos, o preço final ao consumidor é elevado. A ausência do glúten no pão representa um desafio tecnológico, pois é necessário recorrer a matérias primas alternativas e que mimetizem as propriedades elásticas assumidas pelo glúten. Em simultâneo, também tem crescido a procura por alimentos com ingredientes bioativos e as microalgas são reconhecidas como fonte de diversos compostos com impacto positivo na saúde humana.

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de pães isentos de glúten com incorporação da alga *Tetraselmis chuii*. Esta é uma microalga verde unicelular com propriedades nutricionais interessantes para a saúde humana. No decorrer do trabalho foi desenvolvida uma formulação controlo à base de farinha de trigo sarraceno, farinha de arroz e amido de batata, utilizada como base para estudar o impacto da adição de teores de alga de 1%, 2% e 4% (m/m). Avaliou-se a textura e reologia das massas, o perfil de envelhecimento do pão, os parâmetros de cor da massa e do pão, a atividade da água e humidade do miolo dos pães, o volume final dos pães e as perdas durante a cozedura dos pães. A incorporação de biomassa microalgal de *Tetraselmis chuii* originou produtos com características tecnológicas dependentes do nível de incorporação de microalga. Para níveis de 1% e 2% (m/m) verifica-se uma desestabilização da estrutura desenvolvida pelo amido e o HPMC, obtendo-se pães mais compactos, mais firmes e com menor volume do que o pão controlo. Para 4% (m/m) de incorporação de *Tetraselmis chuii*, as proteínas da microalga em associação com o amido e o HPMC desenvolvem um outro tipo de estrutura, reforçando a viscoelasticidade da massa, dando origem a um pão com maior volume e menor firmeza. Verificou-se ainda que a incorporação de microalga tem um efeito positivo no envelhecimento do pão. A análise sensorial hedónica realizada a três das formulações – controlo, 1% e 4% (m/m) de microalga, recorrendo a um painel de 32 provadores não treinados, resultou na eleição da formulação com 1% (m/m) de microalga como a preferida do painel.

**Palavras Chave:** Pão isento de Glúten, *Tetraselmis chuii*, Textura, Reologia

## ABSTRACT

Nowadays, due to the increase in the number of people suffering from celiac disease, the market for gluten-free foods has been expanding, however they are not sensorially appealing and the costs of their acquisition are high. The absence of gluten in bread represents a technological challenge because it is necessary to resort to alternative raw materials and to mimic the elastic properties assumed by gluten. At the same time, there has also been a growing demand for food with bioactive ingredients and the microalgae are recognized as a source of several compounds with a positive impact on human health.

The main objective of this work was the development of gluten-free breads with the incorporation of the algae *Tetraselmis chuii*. This is a unicellular green microalga with nutritional properties that are very important for the human health. A new formula was created based on buckwheat flour, rice flour and potato starch, that was used to study the impact of adding algae contents of 1%, 2% and 4% (w/w). It was evaluated the texture and rheology of the doughs, the aging profile of the breads, the color parameters of the doughs and breads, the water activity and moisture of the bread crumbs, the final volume of the breads and the losses during the baking process. The incorporation of microalgal biomass of *Tetraselmis chuii* originated products with technological characteristics dependent on the level of microalga incorporation. At 1% and 2% (w/w) levels, the structure developed by starch and HPMC is destabilized, resulting in a more compact, firmer and smaller volume of bread than the original/control bread. For 4% (w/w) of *Tetraselmis chuii* incorporation, the microalgal proteins in association with starch and HPMC develop another type of structure, reinforcing the viscoelasticity of the dough, giving rise to a less consistency bread. It was also verified that microalga incorporation has a positive effect on the aging of the bread. Sensory analysis of three formulations - control, 1% and 4% (w/w) of microalga, using a panel of 32 untrained testers, resulted in the choice of 1% (w/w) as the preferred choice panel.

**Keywords:** Gluten free bread, *Tetraselmis chuii*, Texture, Rheology.

**ÍNDICE GERAL**

Agradecimentos	
Resumo	
Abstract	
Índice de figuras	
Índice de tabelas	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Introdução e Objetivos.....	1
1. Revisão Bibliográfica .....	4
1.1. Glúten.....	4
1.2. Doença Celíaca .....	5
1.3. Microalgas .....	8
1.4. <i>Tetraselmis chuii</i> .....	10
1.5. Panificação isenta de glúten .....	14
1.5.1. Farinhas e Amidos.....	15
1.5.2. Produtos Amiláceos.....	16
1.5.3. Proteínas .....	16
1.5.4. Fibras .....	17
1.5.5. Hidrocolóides.....	17
1.5.5.1. Goma Xantana.....	19
1.5.5.2. Hidroxipropilmetilcelulose .....	19
1.5.6. Gorduras e Emulsionantes .....	21
1.6. Principais etapas de fabrico de pão sem glúten.....	22
1.6.1. Papel do amido nos produtos de panificação.....	22
1.7. Caracterização do pão: propriedades físicas e sensoriais .....	24
1.7.1. Comportamento Reológico .....	24
1.7.2. Avaliação das propriedades de textura.....	25
1.8. Análise Sensorial .....	28
2. Materiais e Métodos .....	30
2.1. Materiais.....	30
2.2. Métodos.....	31

2.2.1. Processo de fabrico do pão .....	31
2.2.2.1.1. Análise instrumental da cor .....	33
2.2.2.1.2. Determinação do pH .....	33
2.2.2.1.3. Análise reológica das massas .....	33
2.2.2.1.4. Análise da atividade da água .....	34
2.2.2.1.5. Determinação da humidade .....	34
2.2.2.1.6. Volume do pão .....	35
2.2.2.1.7. Perdas na cozedura .....	35
2.2.2.1.9. Análise estatística .....	36
Resultados e Discussão .....	37
3. Resultados e Discussão .....	38
3.1. Otimização da formulação .....	38
3.1.1. Desenvolvimento de formulação base – ensaios preliminares .....	38
3.1.2. Impacto do tempo de amassadura .....	39
3.1.4. Impacto do teor de HPMC .....	42
3.2. Incorporação de <i>Tetraselmis chuii</i> .....	44
3.2.1. Propriedades físicas das massas e pães .....	44
3.2.1.1. Determinação do teor de absorção de água das formulações .....	44
3.2.1.2. Análise das propriedades viscoelásticas da massa .....	46
3.2.1.3. Análise da textura das massa e pães .....	49
3.2.1.4. Cor da massa, miolo e côdea do pão .....	53
3.2.1.5. Análise do pH da massa, atividade da água, humidade, volume e perdas na cozedura do pão .....	56
3.3. Análise Sensorial .....	57
Anexos .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Diferenças de massa formada com glúten, e apenas com gliadina e glutenina .....	4
Figura 2-Mucosa intestinal de um individuo normal e com a patologia celíaca.....	6
Figura 3- Selo da APC.....	7
Figura 4- Tc liofilizada.....	11
Figura 5-Estrutura química da Goma Xantana .....	19
Figura 6- Estrutura química HPMC .....	20
Figura 7- Texturograma .....	26
Figura 8-Micro-doughLAB.....	27
Figura 9- Firmeza dos pães produzidos com diferentes tempos de amassadura.....	39
Figura 10- Coesividade dos pães produzidos com diferentes tempos de amassadura.	39
Figura 11- Fatias de pão, resultado das variações de tempo de amassadura 7,8 e 10 min.....	40
Figura 12-Firmeza dos pães produzidos com diferentes temperaturas e tempos de cozedura.....	41
Figura 13- Coesividade dos pães produzidos com diferentes temperaturas e tempos de cozedura.....	41
Figura 14-Fatias de pão, resultado das variações de Binómios T/t distintos 160°C/60mim, 170°C/50mim,180°C/50mim,190°C/40mim.....	41
Figura 15-Firmeza dos pães produzidos com diferentes teores de HPMC.).....	42
Figura 16-Coesividade dos pães produzidos com diferentes teores de HPMC. ....	43
Figura 17-Fatias de pão, resultado das variações de 2,4%, 1,5% e 3% de HPMC ....	43
Figura 18-Curvas do MicrodoughLab finais para as diferentes formulações, e para uma absorção de 69%.....	44
Figura 19- Espectros mecânicos realizados a 5°C, das massas fermentadas a 37°C, com diferentes teores de Tc, e comparação com o controlo e mix comercial. ....	46
Figura 20- Módulo elástico para as diferentes formulações para $w=6,283$ rad/s. ....	47
Figura 21-Módulo elástico para as diferentes formulações para $w=62,83$ rad/s, ....	48
Figura 22-Valores da firmeza da massa não fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de Tc.....	49
Figura 23- Valores de coesividade da massa não fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de Tc.....	49
Figura 24-Valores da firmeza do pão no tempo zero para os diferentes níveis de incorporação de Tc e mix comercial.....	50
Figura 25- Valores de coesividade do pão no tempo zero para os diferentes níveis de incorporação de Tc e mix comercial.....	51

Figura 26- Fatias de pães com diferentes níveis de incorporação - Mix comercial, Controlo, Tc 1%, Tc 2% e Tc 4% .....	51
Figura 27- Evolução da Firmeza ao longo de 48 horas para as diferentes formulações com Tc, Controlo e Mix Comercial .....	52
Figura 28- Diferentes massas - Controlo, Tc 1%, Tc 2% e Tc 4% (da esquerda para a direita) .....	53
Figura 29- Fatias de pão controlo, Tc 1%, Tc 2% e Tc4% .....	55
Figura 30- Amostras para a realização de prova sensorial.....	57
Figura 31-Respostas dos provadores do painel sensorial (n = 32) em relação ao pão controlo e aos pães com Tc 1% e Tc 4%.....	58

### **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1-Características Filogenéticas da <i>Tetraselmis chuii</i> .....	11
Tabela 2- Composição nutricional da <i>Tetraselmis chuii</i> .....	12
Tabela 3 - Valores nutricionais de distintas espécies- peso seco, clorofila, proteína, hidratos de carbono e Lípidos.....	13
Tabela 4- Principais polissacarídeos utilizados na indústria alimentar .....	18
Tabela 5- Diferentes temperaturas de gelatinização de diversos tipos de amido .....	23
Tabela 6- Composição nutricional <i>Tetraselmis chuii</i> .....	31
Tabela 7-Formulações e respetivas % de ingredientes adicionados.....	32
Tabela 8- Formulação a otimizar .....	38
Tabela 9-Resultados obtidos no MlcrodoughLab.....	45
Tabela 10- Ajuste das equações de Lei de Potência.....	47
Tabela 11 - Valores resultantes da análise instrumental da cor da massa, .....	53
Tabela 12-Valores resultantes da análise instrumental da cor do miolo, Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações.....	54
Tabela 13-Valores resultantes da análise instrumental da cor da côdea.....	54
Tabela 14- Resultados da análise da atividade da água, humidade, volume e perdas de cozedura do pão. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Tonalidade (vermelho/ verde)
A2F	<i>Algae to Future</i> / Algas para o Futuro
APC	Associação Portuguesa de Celíacos
a <sub>w</sub>	Atividade da Água
b*	Tonalidade (amarelo/azul)
DC	Doença Celíaca
DDT	<i>Dough Development Time</i> / Tempo de desenvolvimento da massa
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nation</i> / Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
G´	Módulo Elástico
G´´	Módulo Viscoso
ISA	Instituto Superior de Agronomia
JECFA	Comité Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares
L*	Luminosidade
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> / Lipoproteína de baixa densidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
T <sub>c</sub>	<i>Tetraselmis chuii</i>
TPA	Análise do Perfil de Textura
WA	Absorção de água

# Introdução e Objetivos



## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto A2F- “Algae to Future”, cuja missão principal é a otimização da produção de microalgas para a alimentação humana e animal. Este projeto conta com 26 parceiros, tendo a equipa do Instituto Superior de Agronomia (ISA) o objetivo específico de desenvolver formulações de pães isentas de glúten com o enriquecimento de microalgas. Assim, o principal objetivo da presente dissertação é o desenvolvimento de pães rústicos sem glúten e posterior adição de microalgas, mais especificamente a *Tetraselmis chuii* (Tc).

Este novo produto constitui um desafio para os engenheiros alimentares, pois implica o recurso a conhecimentos da área da tecnologia de cereais, que permitem mimetizar o efeito tecnológico da malha de glúten, através da utilização de farinhas alternativas e da sua interação e em simultâneo o estudo e incorporação de uma microalga alimentar recentemente aprovada para a alimentação, mas ainda não especificamente para a área de panificação. Nesse sentido, este trabalho também pode constituir uma mais valia, na demonstração da potencialidade desta alga em outros alimentos ainda não aprovados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA).

Para além disso, estes pães devem possuir uma qualidade sensorial e tecnológica aceitável aos portadores de doença celíaca e/ou constituírem uma alternativa de fonte energética para a população em geral, assim foram elaboradas diferentes formulações de massas panares e também estudados diferentes níveis de incorporação da microalga. Os objetivos específicos da dissertação foram:

- Ensaio preliminares para desenvolvimento da formulação base: desenvolver uma formulação isenta de glúten com características já aceitáveis pelo consumidor;
- Incorporação de Hidroxipropilmetilcelulose para otimização da formulação base;
- Incorporação de *Tetraselmis chuii* na formulação base em níveis de 1%, 2% e 4% (m/m) e estudo do impacto nas propriedades físicas das massas e dos pães obtidos;
- Análise sensorial.

Cada uma destas fases foi fundamentada com estudos de avaliação reológica e de textura das massas, volume e textura dos pães, cor, humidade e  $a_w$  do miolo.

Do trabalho apresentado nesta dissertação, resultaram as seguintes comunicações em congressos científicos internacionais:

Nunes, M.C., Fernandes, I., Sousa, I., Raymundo, A. 2019. Structural and rheological properties of a gluten-free bread with *Tetraselmis chuii* microalga incorporation. In: Book of Abstracts of Annual European Rheology Conference 2019, Portoroz (Slovenia). Oral Communication. URL: <https://rheology-esr.org/aerc-2019/>

Martins R.B., Fernandes I., Nunes M.C., Barros A I. R. N. A., Peres JA, Raymundo A. 2018. Improving gluten free bread quality using by-products and underexploited resources. In: Livro de Resumos do XIV Encontro Luso-Galego de Química. 21 - 23 dezembro, Porto (Portugal). Comunicação Oral. URL: [http://xxivlgq.eventos.chemistry.pt/#scientific\\_program](http://xxivlgq.eventos.chemistry.pt/#scientific_program)

# Revisão Bibliográfica



## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Glúten

Em 1900, Thomas Osborne classificou as proteínas segundo a sua solubilidade; em quatro categorias: albuminas, globulinas, prolaminas e gluteninas. (Atwell, 2011).

O trigo é o cereal que dá origem à rede de glúten mais apropriada à panificação. As proteínas no trigo podem ser divididas em dois grupos, as proteínas solúveis (albuminas e globulinas) e em proteínas de reserva (gliadina e glutenina), que na operação da amassadura originam o glúten, a fonte das propriedades viscoelásticas da massa.

O glúten é uma rede tridimensional formada pela fração insolúvel das proteínas dos cereais, nomeadamente do trigo – gliadinas e gluteninas. Essa rede tridimensional confere características viscoelásticas às massas panares, que permitem a retenção do gás introduzido durante a amassadura, bem como o formado durante a fermentação sendo responsável por algumas características sensoriais do pão (Scheuer *et al.*, 2011).

As gliadinas são caracterizadas mecanicamente por uma resistência mínima à extensão, sendo responsáveis pela coesão da massa. As gluteninas, por sua vez, são responsáveis pela resistência da massa à extensão. A associação destas duas proteínas, resulta num complexo correspondente ao glúten, conferindo à massa propriedades viscoelásticas únicas. As propriedades do glúten tornam-se aparentes quando a farinha é hidratada, originando uma massa extensível e com uma boa capacidade de retenção de gás. Esta estrutura contribui para as características da textura do miolo do produto obtido após a cozedura, o pão (Wang *et al.*, 2017).

Neste sentido, a substituição da rede de glúten no desenvolvimento tecnológico de produtos de panificação isentos de glúten é uma tarefa difícil, sendo que a sua ausência resulta em “massas” líquidas, pouco coesas, pegajosas e de baixa qualidade quando comparada com massas com glúten. A Figura 1 permite observar as diferenças de “massa” formada por glúten, apenas gliadina ou glutenina.

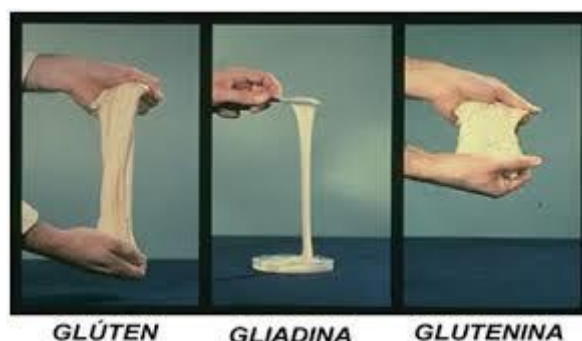


Figura 1- Diferenças de massa formada com glúten, e apenas com gliadina e glutenina (Fonte: Sojaentrigada,2016)

No entanto, é importante referir que a fração proteica glutenina existe apenas no trigo. Outros cereais, como é o caso do centeio, apresentam na sua constituição pentosanas, que resultam de ramificações de polímeros de arabinose e xilose, e que permitem a retenção de água para a matriz proteica tornando-a mais rígida e apta para a panificação (Castro,2003).

O glúten não existe no cereal, formando-se durante o processamento por interação entre as frações que o constituem. No caso específico do pão forma-se na etapa de amassadura onde se realiza a incorporação de água e dos restantes ingredientes (geralmente farinha, levedura e sal) e de ar, ocorrendo o desenvolvimento da massa. (Scheuer *et al.*, 2011).

## 1.2. Doença Celíaca

Atualmente, na Europa, estima-se que 1% da população sofra de doença celíaca, no caso específico de Portugal 1 em cada 300 indivíduos apresenta esta patologia. No entanto, estima-se que apenas 10 a 15% dos doentes celíacos estejam diagnosticados, podendo isto dever-se à falta de informação ou porque os sintomas não coincidem com o quadro típico da doença (Pinheiro,2016).

A doença celíaca (DC) é, segundo a Associação Portuguesa de Celíacos (APC), uma doença autoimune que ocorre em indivíduos com predisposição genética causada pela permanente sensibilidade ao glúten. Esta é uma inflamação crónica progressiva que provoca graves lesões na mucosa intestinal, sendo que a ingestão de glúten mesmo em pequenas quantidades provoca no organismo uma reação imunológica contra o próprio intestino delgado que se traduz numa má absorção dos nutrientes. Para tal, o doente celíaco produz anticorpos contra o glúten, que agem no intestino delgado e o

atrofiam. Na Figura 2, é possível observar a notável diferença de um intestino saudável e o de um celíaco (APC,2018).

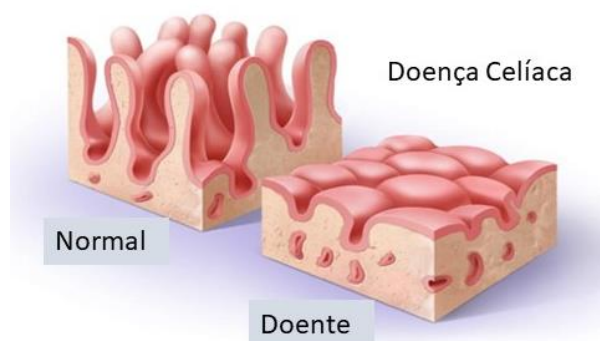


Figura 2-Mucosa intestinal de um indivíduo normal e com a patologia celíaca.  
Fonte: APC,2018

As frações tóxicas do glúten são as prolaminas que diferem de cereal para cereal, no caso do trigo é a gliadina, no centeio a secalina, na cevada a hordeína e a avenina no caso da aveia. Mais especificamente, é a fração de  $\alpha$ -gliadina que quando submetida a uma digestão parcial no trato gastrointestinal origina um conjunto de péptidos, alguns dos quais são responsáveis pelos problemas associados à doença celíaca (Nova Arroz, 2018; Nascimento, 2012).

A eliminação do glúten da alimentação leva a uma regeneração completa da lesão e permite que o organismo recupere, no entanto, se houver a reintrodução do glúten as inflamações e os sintomas reaparecem.

A DC pode aparecer em qualquer idade desde que já tenha sofrido introdução na alimentação do indivíduo. Geralmente, surge entre os 6 e os 20 meses de idade, ou seja, alguns meses após a introdução das farinhas na alimentação através de alimentos como as papas, bolachas e pão. Existem alguns sinais de alerta, para o caso desta patologia se manifestar nas crianças tais como a perda de apetite sem aumento de peso, as dejeções frequentes (diarreia) e o abdómen torna-se mais saliente e distendido, porém esta patologia não é de fácil detecção e pode se ir agravando com o tempo caso o diagnóstico seja mais demorado (APC, 2018).

Infelizmente, esta é uma patologia que não apresenta cura pelo que o tratamento dietético é fundamental e deve ser seguido para toda a vida. Este consiste na exclusão do glúten da alimentação, e para garantir que o paciente celíaco faça uma dieta isenta de glúten é necessário que este conheça os ingredientes que compõem as preparações

alimentares e faça uma leitura detalhada dos ingredientes apresentados nos rótulos dos produtos processados.

De modo a facilitar e transmitir uma maior confiança aos doentes celíacos no que diz respeito à escolha dos alimentos para o seu regime alimentar, surgiu em 2009 o Regulamento (CE) nº41/2009 relativo à composição e rotulagem dos géneros alimentícios adequados a pessoas com intolerância ao glúten, que admite que todos os géneros alimentícios industrializados que tenham como objetivo responder às necessidades das pessoas com intolerância ao glúten deverão conter obrigatoriamente no rótulo as inscrições “teor muito baixo de glúten” ou “isento de glúten”, dependendo do caso. Para fins de rotulagem, um produto só pode conter a inscrição «isento de glúten» se o teor de glúten não for superior a 20 mg/kg no alimento. Também a colaboração da APC e a colocação do selo (Figura 3) da Associação nos produtos isentos de glúten contribuem para a confiança dos consumidores.



Figura 3- Selo da APC (Fonte: APC,2018)

Apesar de se verificar nos últimos anos um aumento muito significativo do mercado dos produtos isentos de glúten, a oferta é ainda reduzida e nutricionalmente limitada, sendo que os produtos existentes apresentam em geral um elevado custo. Para além disso, existem contextos de consumo que têm associados situações de grande desconfiança, como a ingestão de refeições fora de casa, nomeadamente em restauração, onde nem sempre é possível garantir a existência de dietas isentas de glúten.

O cumprimento deste regime alimentar não é fácil e implica inúmeras mudanças a nível dos alimentos consumidos, influenciando em muito as práticas alimentares. O trigo, particularmente, está presente em muitos dos alimentos da dieta ocidental, e este é um cereal proibido na dieta celíaca. O pão é um dos exemplos de alimentos ricos em glúten e um dos mais consumidos em todo o mundo, apresenta elevado valor energético e nutricional adequado às necessidades calóricas diárias. Trata-se de um alimento que integra a dieta de diversos povos, desde tempos ancestrais, nas culturas mais diversificadas.

Existe, portanto, uma preocupação crescente na adequação nutricional da dieta isenta de glúten, pois esta é caracterizada por uma ingestão reduzida de fibras e minerais.

### 1.3. Microalgas

Atualmente, vivemos numa sociedade que se preocupa com a escassez de alimento, sendo que uma das questões pertinentes que atualmente se levanta se é se existirá até 2050 alimento para toda a população dado o aumento populacional estimado, pois consultando a balança alimentar portuguesa verifica-se que no período de 2012 a 2016 tem ocorrido uma diminuição de alimento/nutriente (INE,2017) Para tal é necessário encontrar alternativas viáveis – pensar numa economia circular onde se aproveitam os recursos ao máximo, gerando lucros e aproveitando matérias primas “esquecidas”. Em simultâneo, problemas como terras aráveis, alterações climáticas e a escassez dos recursos hídricos serão variáveis a ter em conta pois estão associadas aos meios de cultivo, e conseqüentemente, desencadeiam implicações ao nível de toda a cadeia alimentar. São necessárias fontes alimentares alternativas que completem nutricionalmente a nossa alimentação e ajudem a minimizar os possíveis efeitos gerados e assim assegurar alimentos para as gerações futuras.

As microalgas surgem como fonte alimentar alternativa, são consideradas, atualmente, o alimento inovador e promissor utilizado na produção/ desenvolvimento de novos alimentos, existindo cerca de 200 espécies distintas espalhadas pelo globo. (Enzing *et al.*,2014). As algas são uma excelente fonte alimentar, pois encontram-se associadas a elevados níveis nutricionais como proteínas, ácidos gordos polinsaturados, carotenóides, vitaminas, minerais, fenóis e outras moléculas bioativas (Batista *et al.*, 2017). Recentemente, foram utilizadas microalgas para a produção de etanol e biodiesel e encontram-se a decorrer estudos que implicam modificações genéticas para a produção de fármacos e cosméticos (Enzing *et al.*,2014). O projeto A2F, é um veículo para o desenvolvimento de novos produtos alimentares com a incorporação de microalgas, com o intuito de ser integrado no mercado alimentar futuramente, contribuindo para o uso sustentável de recursos.

As microalgas caracterizam-se por serem algas unicelulares, de tamanho microscópico e podem ser encontradas em vários tipos de ecossistemas. Estas constituem um sistema biológico de elevada eficiência no que diz respeito à transformação de energia solar em compostos orgânicos através da fotossíntese, podendo duplicar (diariamente) a sua biomassa, atingindo níveis de produtividade na

ordem das 60 toneladas por hectare por ano em regime fechado. Realizando uma comparação com plantas superiores estas apresentam uma maior taxa de crescimento e não estão dependentes das variações sazonais, e por outro lado, o facto de serem plantas não vasculares permite que toda a biomassa produzida seja aproveitada, o que não se verifica em plantas superiores, cujos produtos se concentram em folhas, raízes e sementes (Algae, 2ªEd, 2014).

As três classes mais importantes de microalgas são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas verdes (Chlorophyceae) e as algas douradas (Chrysophyceae), todas estas são eucariotas e distinguem-se de outras por terem na sua estrutura organelos responsáveis pela realização de fotossíntese (cloroplastos) e respiração (mitocôndria).

Além destas três classes existem as cianobactérias – algas verde-azuladas (Cyanophyceae) que pertencem as eubactérias e são procariotas sem um núcleo delimitado por uma membrana, como exemplo temos a espécie Spirulina. As algas verde-azuladas podem ser encontradas em diversos ecossistemas sendo que maioritariamente são caracterizados por ambientes poluentes devido à produção de toxinas.

As diatomáceas, representam o maior grupo de produtores de biomassa terrestre, existindo mais de cem mil espécies distintas, encontram-se essencialmente no fitoplâncton; as suas paredes celulares contêm sílica polimerizada e acumulam óleo e crisolaminarina (polissacárido de armazenamento) (Enzing *et al.*, 2014).

Por sua vez, as algas verdes podem ser encontradas abundantemente em água doce, sendo o amido o composto produzido em maior quantidade, posteriormente óleos. A nível comercial a microalga *Haematococcus pluvialis* é a mais importante pois é uma fonte astaxantina. Este é um pigmento carotenoide cuja cor é o rosa / salmão, este caracteriza-se por ser um antioxidante excelente, com propriedades 10 vezes superior ao betacaroteno e 80 a 550 vezes superior à vitamina E, estudos científicos comprovam que o seu consumo contribui para a proteção celular da visão e ajuda a nível dermatológico (Ivana, B. *et al*, 2015). A *Chlorella vulgaris* é amplamente utilizada como suplemento alimentar e a *Dunaliella* é uma espécie rica em  $\beta$ - caroteno (Enzing *et al.*, 2014).

As algas douradas são as que mais se assemelham as diatomáceas pois também produzem óleos e hidratos de carbono.

As microalgas são seres autotróficos, ou seja, produzem complexos orgânicos (hidratos de carbono, gordura, proteína) a partir de substâncias simples, as mais utilizadas para a alimentação são a *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella* e a *Haematococcus*. Para a produção de ácidos gordos (ómega 3) os organismos mais utilizados são *Cryptothecodinium*, *Schizochytrium* e *Ulkenia*. Espécies dos géneros *Chlorella*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Haematococcus*, *Tetraselmis* são utilizadas para a alimentação de peixes em aquacultura (Enzing *et al.*, 2014).

Outro dos aspetos positivos na utilização de microalgas, relaciona-se com o facto de estes organismos se reproduzirem por divisão binária (processo de reprodução assexuada dos organismos unicelulares que consiste na divisão de uma célula em duas cada uma com o mesmo genoma da célula mãe), permitindo um ciclo celular em poucas horas. E aliando a sua simplicidade à utilização de biotecnologia permite a utilização desta para melhoramento genético.

No que diz respeito aos sistemas de produção de microalgas podem variar existindo produções em lagoas a céu aberto, ou então lagos de sistemas fechados – fotobioreatores. Os sistemas abertos apresentam uma maior dependência do clima, ou seja, o controlo da sua temperatura é dependente do clima, e é mais suscetível à invasão de predadores parasitas, ou de outras linhagens de microalgas que possam crescer rapidamente nas condições, ou seja, poderá existir competição entre espécies. Apenas algumas espécies podem ser produzidas neste tipo de sistema, onde são aplicadas condições seletivas que permitem o desenvolvimento da espécie desejada, por exemplo a alta salinidade para a *Dunaliella*, ou a alta alcalinidade para a *Spirulina plantensis*. Este é o sistema mais amplamente utilizado para fins comerciais, gerando cerca de 30 toneladas de biomassa seca por hectare durante um ano (Enzing *et al.*, 2014). Os sistemas fechados impedem o contacto de microalgas com o ambiente, estes permitem um maior controlo das condições de cultivo (pH, temperatura, fornecimento de nutrientes, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), apesar de custos mais elevados, permitem evitar ou minimizar contaminações e são os exigidos para a produção de microalgas como ingrediente alimentar.

#### 1.4. *Tetraselmis chuii*

A *Tetraselmis chuii* (Tc) é a microalga mais abundante nos estuários europeus e que se adequa à realização de testes de toxicidade devido à facilidade de cultura em ambiente laboratorial, sendo também amplamente utilizada em ecotoxicologia e

avaliação de riscos com o intuito de avaliar a toxicidade e riscos de substâncias químicas para produtores primários de ecossistemas marinhos (Prata, 2016).

A *Tetraselmis chuii* foi isolada pela primeira vez na Grã Bretanha por Butcher em 1959, e mais tarde em diversas partes do mundo, sendo utilizada há décadas na aquicultura como alimento para crustáceos (camarões e gambas), particularmente nos países da América Central, e outras *Tetraselmis spp* são utilizadas na produção de larvas de moluscos e adultos (amêijoas, ostras e vieiras) (FAO,1996).

No que diz respeito à sua utilização para a alimentação humana, esta microalga (Figura 4), foi aprovada de acordo com o Regulamento (UE) nº 2283/2015, inserindo-se na categoria de alimentos- sais, especiarias, sopas, molhos e produtos proteico.



Figura 4- Tc liofilizada

Esta é uma microalga marinha móvel de célula única de 10 a 15 µm de tamanho, apresenta uma forma elipsoidal e é produzida por divisão binária, cujas características filogenéticas se resumem na Tabela 1 ( Pérez, et al., 2013)

Tabela 1- Características Filogenéticas da *Tetraselmis chuii* ( Pérez, et al., 2013)

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Filo</b>	Clorofita
<b>Classe</b>	Prasinophyceae
<b>Ordem:</b>	Chloroderidrales
<b>Família:</b>	Chlorodendraceae
<b>Género:</b>	<i>Tetraselmis</i>

A tabela 2, permite uma análise de todos componentes que fazem parte da composição da *Tetraselmis chuii*, onde podemos concluir que sob o ponto de vista nutricional, a microalga em estudo apresenta um elevado teor em proteínas, em que o

ácido glutâmico, o ácido aspártico e a leucina predominam na sua constituição. A nível mineral, o cálcio e o sódio são os elementos mais abundantes. Cerca de 6,7% da sua constituição diz respeito ao seu teor de gordura ( Pérez, *et al.*, 2013).

Tabela 2- Composição nutricional da *Tetraselmis chuii* ( Pérez, *et al.*, 2013)

Determinação		Resultado
Humidade (%)		6,3 ± 0,02
Proteínas (%)		37,6 ± 0,40
Cinzas (%)		15,5 ± 0,05
Hidratos de carbono (%)		31,6 ± 0,38
Fibra alimentar (%)		2,3 ± 0,00
Lípidos (%)		6,7 ± 0,25
Energia (kcal/100g)		337 ± 1,35
Energia (kJ/100g)		1408 ± 5,66
Aminograma (% de proteínas)	Valina	2,27 ± 0,12
	Triptofano	0,61 ± 0,01
	Treonina	1,81 ± 0,13
	Tirosina	1,38 ± 0,15
	Serina	1,63 ± 0,09
	Metionina	0,87 ± 0,12
	Lisina	2,03 ± 0,15
	Leucina	3,08 ± 0,09
	Isoleucina	1,57 ± 0,11
	Histidina	0,65 ± 0,13
	Glicina	2,25 ± 0,14
	Fenilalanina	1,95 ± 0,07
	Arginina	2,66 ± 0,09
	Alanina	2,79 ± 0,17
	Ácido Glutâmico	4,67 ± 0,12
	Ácido Aspártico	3,71 ± 0,25
Minerais (mg/g)	Cálcio	33,80 ± 0,26
	Magnésio	5,06 ± 0,09
	Ferro	2,01 ± 0,04
	Fósforo	6,27 ± 1,87
	Sódio	14,33 ± 4,16
	Potássio	10,40 ± 0,56
	Cloro	17,77 ± 0,25
	Cobre	0,006 ± 0,00
	Iodo (mg/kg)	5,03 ± 5,78
Ácidos Gordos (% de gordura)	Saturados	30,27 ± 0,50
	Monoinsaturados	22,97 ± 0,90
	Polinsaturados	46,77 ± 1,36

Outro dos aspetos de interesse para a utilização de Tc na alimentação é que comparando os seus valores nutricionais com outras microalgas verifica-se rapidamente que Tc é a microalga que apresenta maior quantidade de proteínas, hidratos de carbono e lípidos, como pode ser verificado através da Tabela 3, o que demonstra o seu potencial nutritivo quando comparada com outras espécies.

Tabela 3 - Valores nutricionais de distintas espécies- peso seco, clorofila, proteína, hidratos de carbono e Lípidos  
(Fonte: FAO, 1991)

Classe / Espécie de alga	Peso Seco (pg. célula <sup>-1</sup> )	Clorofila (g)	Proteína (g)	Hidratos de carbono (g)	Lípidos (g)
<b>Bacillariophyceaeophyceae</b>					
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	11.3	0.34	3.8	0.68	1.8
<i>Chaetoceros gracilis</i>	74.8	0.78	9.0	2.0	5.2
<i>Nitzschia closterium</i>	-	-	-	-	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	76.7	0.41	23.0	6.4	10.7
<i>Skeletonema costatum</i>	52.2	0.63	13.1	2.4	5.0
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	28.4	0.27	9.7	2.5	5.5
<b>Chlorophyceae</b>					
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	99.9	1.73	20.0	12.2	15.0
<i>Nannochloris atomus</i>	21.4	0.080	6.4	5.0	4.5
<b>Cryptophyceae</b>					
<i>Chroomonas salina</i>	122.5	0.98	35.5	11.0	14.5
<b>Eustigmatophyceae</b>					
<i>Nannochloropsis oculata</i>	6.1	0.054	2.1	0.48	1.1
<b>Prasinophyceae</b>					
<i>Tetraselmis chuii</i>	269.0	3.83	83.4	32.5	45.7
<i>Tetraselmis suecica</i>	168.2	1.63	52.1	20.2	16.8
<b>Prymnesiophyceae</b>					
<i>Isochrysis galbana</i>	30.5	0.30	8.8	3.9	7.0
<i>Pavlova lutheri</i>	102.3	0.86	29.7	9.1	12.3
<i>Pavlova salina</i>	93.1	0.34	24.2	6.9	11.2

A nível industrial, a aprovação da sua produção é apenas autorizada à empresa Fitoplancton Marino S.L., sediada em Cádiz em Espanha. Esta desde 2005, vende Tc liofilizada para a cultura de larvas de peixes, moluscos e crustáceos. Mais tarde, em 2009, esta microalga foi vendida aos Estados Unidos como alimento. Em 2014, o fabricante recebe a aprovação de novo alimento (Regulamento (UE) nº 2283/2015) para o seu produto na Europa e, posteriormente, foi comercializado para consumo humano. Este status surge na sequência de estudos prévios onde foi possível avaliar a sua toxicidade, tendo sido demonstrado que a Tc não constitui perigo para a população.

A Tc liofilizada é obtida através de cinco operações principais: cultura, colheita, centrifugação, liofilização e embalamento. No que diz respeito à produção esta é

realizada através do cultivo fotoautotrófico em fotobiorreatores tubulares, sendo estes sistemas fechados e em circuito. Após a obtenção da densidade populacional desejada é efetuada a colheita, seguindo para o processo de centrifugação e posterior liofilização e conservação (Enzing *et al.*,2014)

### 1.5. Panificação isenta de glúten

A ausência de glúten na preparação de massas panares tem um elevado impacto nas propriedades viscoelásticas da massa, pois origina massas pouco coesas e elásticas, pães com miolo compactado e com uma reduzida porosidade, de baixo volume e textura desintegrada (Carini *et al.*, 2015).

O glúten presente na farinha de trigo, por exemplo, é o responsável por 50% da estrutura da massa panar e pela capacidade de retenção de água na quantidade adequada. Nos produtos isentos de glúten este papel deverá ser assegurado por outros constituintes.

Geralmente, os pães sem glúten apresentam uma qualidade sensorial inferior quando comparados com pães de trigo, e o preço destes é superior quando se correlacionam.

Nos últimos anos, devido ao aumento do número de pessoas com DC, o mercado de produtos isentos de glúten tem vindo a aumentar a sua gama de produtos, têm sido utilizados vários produtos para substituir o glúten- o amido de arroz, amido de milho, amido de batata, amido de mandioca, cereais como o arroz, o milho, e ainda produtos inovadores como os pseudocereais, leguminosas, entre outros. São vários os estudos existentes que procuram conjugar as farinhas de arroz e milho com várias técnicas e aditivos para melhorar as propriedades físico químicas, a aceitação e o tempo de prateleira (Silva, 2014).

Porém, para quem produz este tipo de géneros alimentícios, existe uma desvantagem que é o facto de necessitar de uma linha exclusiva de panificação sem glúten para garantir que não existam contaminações cruzadas.

### 1.5.1. Farinhas e Amidos

Todas as farinhas isentas de glúten apresentam pontos fortes, quer devido ao perfil nutricional, quer devido ao sabor, ou às características de estrutura que conferem uma textura mais favorável ao pão.

Usualmente, as farinhas utilizadas na panificação são as farinhas de trigo, centeio, triticales ou mesmo a de aveia. Destas, a aveia é por natureza isenta de glúten, mas devido aos procedimentos de plantação e reprodução é considerada não isenta de glúten (Schaer, Janeiro 2018).

Para a produção isenta de glúten todas as farinhas referidas anteriormente estão proibidas e apenas são permitidas farinhas isentas de glúten para utilização como matérias-primas na padaria isenta de glúten, tais como: farinhas de arroz, milho, amaranto, trigo sarraceno, quinoa, mandioca, castanha, chia, soja, coco, entre outras (Raymond *et al.*, 2006). Cada uma das farinhas apresenta um comportamento tecnológico distinto.

#### 1.5.1.1.1. Farinha de arroz

O arroz é dos cereais que apresenta um maior consumo a nível mundial, existindo atualmente cerca de 8000 variedades de arroz, que são classificadas segundo vários critérios como o comprimento do grão, a variedade, o grau de gomosidade, o aroma e o tipo de processamento que necessita. Em Portugal são produzidos anualmente 150 milhões de quilograma de arroz por ano, sendo que cerca de 80% corresponde ao arroz carolino. Esta é a variedade que melhor se adapta aos solos portugueses devido a condições de temperatura, atividade da água e a exposição solar e os 20% correspondem a arroz agulha. Portugal apresenta o maior consumo per capita de arroz 15-16 Kg, comparando com a média europeia que ronda os 6 Kg. O nosso país apresenta uma indústria arroseira forte, que gera anualmente quantidades muito significativas de trinca, que pode ser convertida em farinha e de farelo de arroz, que pode funcionar como um excelente ingrediente alimentar, devido à sua riqueza nutricional.

Esta farinha apresenta um baixo nível de prolamina, sódio e gordura, e alta quantidade de hidratos de carbono facilmente digeríveis, o que torna esta farinha ideal para a panificação isenta de glúten.

### 1.5.1.2. Farinha de trigo Sarraceno

Os grãos de trigo-sarraceno ou mourisco apresentam uma forma incomum, em pirâmide, com um fundo arredondado e, quando maduro, cor castanha escura. Apesar do nome este grão não apresenta uma correlação com os verdadeiros trigos, este corresponde da semente de um fruto (Silva,2018).

O seu componente principal é o amido, acumulado no endosperma. São ricos em aminoácidos, apresentando um conteúdo superior aos cereais comuns em fibra, lisina e elementos, como o manganês, fósforo, cobre e magnésio. Os teores elevados de rutina, catequinas e outros polifenóis, bem como a atividade antioxidante são também de grande importância para o valor dietético deste grão (Motta,2015). O seu consumo é muitas vezes associado à diminuição dos níveis de colesterol, em especial da fração de baixa densidade (LDL), controlo glicémico na diabetes e obesidade (Motta,2015)

### 1.5.2. Produtos Amiláceos

Os produtos amiláceos são também uma opção viável para a panificação sem glúten, sendo que os amidos ou féculas são utilizados para promover a consistência dos produtos a desenvolver. A diferença entre o amido e a fécula reside na parte da qual os produtos amiláceos são extraídos. O amido é extraído da parte aérea da planta, enquanto que a fécula é obtida da parte subterrânea. Os amidos e féculas mais utilizados são principalmente obtidos a partir do arroz, mandioca, batata e milho. O tipo de amido utilizado pode influenciar a consistência da massa e a taxa de gelatinização/retrogradação, ambos aspetos relacionados com a qualidade do pão. O amido de milho possui um maior teor de amilose/ temperatura de gelatinização e conseqüentemente menor resistência à retrogradação relativamente ao amido de batata e mandioca. O amido de milho apresenta cerca de 25% amilose e 75% amilopectina, já as féculas de batata e mandioca apresentam cerca de 20% de amilose e 80% de amilopectina (Elisena *et al.*, 2007).

### 1.5.3. Proteínas

As proteínas são compostos poliméricos complexos, formados por moléculas orgânicas (aminoácidos). Estas são responsáveis por exercerem várias funções biológicas, destacando-se as contráteis (actina e miosina), as estruturais (colagénio e queratina), os biocatalizadores (enzimas), as hormonais (insulina, glucagon), e reserva (caseína e ovoalbumina).

Na produção de pão isento de glúten, é usual a utilização de proteínas de origem animal (leite e ovo) e de origem vegetal (ervilha e soja). As proteínas do leite apresentam um elevado valor nutritivo e também são utilizadas por terem uma estrutura química idêntica às proteínas do glúten, o caseinato é um bom emulsionante e apresenta capacidade de estabilizar a massa. As proteínas do ovo, são uma boa alternativa para a produção de pão sem glúten pois são agentes de formação de espuma e estabilizadores do miolo. As proteínas da gema do ovo funcionam como emulsionante, facilitando a dispersão e estabilização das bolhas de gás, enquanto que as proteínas da clara do ovo são responsáveis pelo processo de formação de gel e da espuma, através de interações hidrofóbicas para retenção da água, adquirindo estabilidade na massa. As proteínas de leguminosas são ótimas para a criação de um gel forte e podem ser utilizadas na produção de emulsões e espumas. (Silva, 2014)

#### 1.5.4. Fibras

Segundo o *Codex Alimentarius* (2009) a fibra alimentar consiste no conjunto de cadeias glucídicas com 10 ou mais monómeros, que não hidrolisados por enzimas endógenas ao intestino delgado.

As fibras são utilizadas como substitutos de gordura, pois apresentam propriedades tecnológicas que permitem uma melhoria da estabilidade e da textura dos produtos durante a produção e armazenamento; dentro de algumas funcionalidades pode-se destacar a formação de gel, a ação quelante e de texturização (Carli, *et al.*, 2015). De acordo com Katina *et al* (2006) a adição de fibras em produtos de panificação é considerada benéfica, porém pode causar problemas a nível da qualidade tecnológica do pão, diminuindo a elasticidade do miolo e o volume.

#### 1.5.5. Hidrocolóides

Os hidrocolóides são um grupo de polímeros de elevado peso molecular que se caracterizam por terem a capacidade de formar dispersões e/ou géis viscosos quando dispersos em água (Milani *et al.*, 2012). Estes são extraídos de algas, de sementes e de cereais, ou de subprodutos vegetais, como os exsudados de plantas ou de microrganismos, ou são derivados de celulose (Castro, 2003).

A denominação de “hidrocolóide” ou “colóide hidrofílico” assenta corretamente, devido as propriedades de retenção das moléculas de água e pela sua capacidade de formação de dispersão, que é intermédia entre uma solução e uma suspensão.

Este grupo de compostos tem uma grande variedade de propriedades funcionais nos alimentos, incluindo: espessamento, gelificação, emulsionante, de estabilização e de revestimento.

O principal motivo para a ampla utilização dos hidrocolóides como aditivos na indústria alimentar recai na sua capacidade de modificar a reologia e a textura de suspensões aquosas de sistemas alimentares e também as propriedades sensoriais. São várias as formulações alimentares, tais como sopas e molhos que utilizam os hidrocolóides para alcançar a viscosidade e a sensação na boca requeridas. Podem também ser encontrados em muitos outros produtos alimentares como os gelados, geleias, gelatinas, sobremesas e bolos para criar a textura desejada (Milani *et al*, 2012).

Os principais polissacáridos utilizados na indústria alimentar são apresentados na Tabela 4, bem como a sua origem e o código “E”.

Tabela 4- Principais polissacarídeos utilizados na indústria alimentar Fonte: (Gomes, 2003; CAC, 1995)

Origem	Tipo	Nº E
Exsudados de plantas	Goma arábica	E414
	Goma adragante	E413
	Goma Karaya	E416
	Goma ghatti	E419
Extratos de plantas	Agar	E406
	Alginatos	E400-404
	Carragenatos	E407
Extratos de sementes	Goma guar	E412
	Goma de alfarroba	E410
	Goma de tara	E417
	Goma de Konjac	E425
Extratos de cereais ou tubérculos	Amidos	-
	Amidos modificados	-
Extratos de subprodutos vegetais Exsudados de microrganismos	Pectinas	E440
	Goma xantana	E415
	Goma gelano	E418
	Dextrano	-
Derivados de celulose	Metilcelulose	E461
	Carboximetilcelulose	E466
	Hidroxipropilmetilcelulose	E464

### 1.5.5.1. Goma Xantana

A goma xantana é um polissacárido aniônico produzido por fermentação aeróbia de substratos glucídicos da bactéria *Xanthomonas campestris*, sendo este o primeiro polissacárido de origem microbiana aprovado para alimentos.

A cadeia principal da goma xantana é idêntica à da celulose, ou seja, é um polímero de  $\beta$ -D-glucose em ligações 1-4, mas ramificado. De duas em duas moléculas de glucose da cadeia principal está ligado um trissacárido, constituído por  $\alpha$ -D-manose, originando uma unidade de repetição (Gomes, 2003; Sharma *et al.*, 2006) (Figura 5).

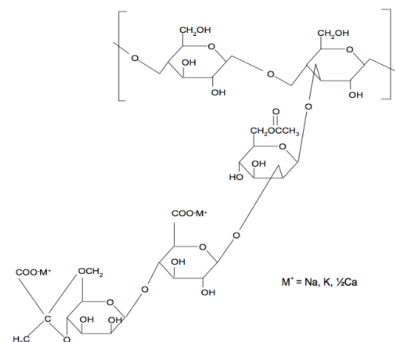


Figura 5-Estrutura química da Goma Xantana (Fonte: Sharma et al.,2006)

A goma xantana é solúvel em água fria e em solução apresenta uma conformação ordenada, estabilizada por ligações não covalentes entre a cadeia principal e as cadeias laterais (Gomes de Castro, 2003). Este biopolímero é utilizado como espessante e estabilizante em molhos para salada e maioneses, conservas, produtos instantâneos e em produtos lácteos e de padaria (Gomes de Castro, 2003; Sharma *et al.*, 2006).

### 1.5.5.2. Hidroxipropilmetilcelulose

A Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um produto fibroso, inodoro e insípido, a sua coloração é branca, este resulta de uma modificação sintética de um polímero natural – a celulose (George,2007).

O HPMC resulta de uma modificação da celulose alcalina, através de uma purificação da polpa da madeira, que é tratada com recurso a uma solução de hidróxido de sódio a 18%, éter metílico e hidroxipropílico que quimicamente são introduzidos na molécula da celulose e originam o HPMC. A sua estrutura química encontra-se representada na Figura 6.

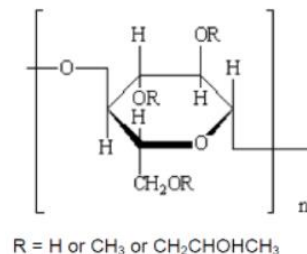


Figura 6- Estrutura química HPMC (Adaptado de JECFA,2011)

O HPMC quando em contacto com a água forma uma solução coloidal viscosa, tal facto resulta das ligações intramoleculares dos grupos metoxilo, quanto maior a concentração/ ligação maior será a viscosidade.

Este é um produto que está disponível comercialmente em diferentes graus de viscosidade e é utilizado na indústria alimentar, farmacêutica e em suplementos alimentares. Na indústria alimentar é utilizado como estabilizador de emulsões e espumas, reposição de gordura, agente de volume não calórico nos alimentos, e também como barreira ao óleo e à humidade.

No ano de 1989, o E464 foi avaliado pela JECFA (Comité Conjunto de Especialistas da FAO / OMS sobre Aditivos Alimentares) e durante a reunião foram definidas especificações para a identidade e pureza, no entanto, não foi definida uma dose diária aceitável. Mais tarde, procedeu a um estudo acerca dos usos alimentares do HPMC e estabeleceu uma dose diária não especificada para a sua utilização dado o baixo nível de toxicidade em mamíferos. Os dados demonstraram que o HPMC administrado por via oral adquiriu um comportamento de fibra não nutritiva. Consequentemente, este é um aditivo alimentar aprovada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), que garante segurança na utilização deste aditivo, com o código E 464. As especificações atuais do HPMC estão estabelecidas no Regulamento (UE) nº1333/2012 da Comissão, de 9 de março de 2012, que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos do Regulamento (UE) nº1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. Recentemente, em 2015, forma encontrados distintos benefícios para a saúde humana pois o seu consumo ajuda na uniformização de concentrações normais de colesterol no sangue (EFSA,2015).

A incorporação de HPMC melhora a retenção de gás e a absorção de água da massa sem glúten, uma propriedade que é geralmente conferida pelo glúten. A sua adição em formulações de pão sem glúten aumenta o teor de humidade do miolo e o volume de pão, reduz a velocidade de endurecimento do miolo, melhora a textura do miolo e as propriedades sensoriais (Ngemakwe *et al.*, 2014).

Nesta dissertação, o aditivo utilizado foi o WELLENCE™ Gluten Free 321, fabricado pela Dow Food, de modo a atingir-se as características abaixo enunciadas:

- Aumento do volume do pão;
- Uniformidade do miolo;
- Auxiliar na retenção do volume durante a cozedura;
- Prevenção do colapso durante a cozedura e o arrefecimento;
- Contribuição para o aumento do prazo de validade.

#### **1.5.6. Gorduras e Emulsionantes**

As gorduras assumem um papel importante no desenvolvimento da panificação sem glúten, tendo a função de lubrificação das massas promovendo a retenção de gás, e consequentemente, um aumento do volume da massa, atribuindo-lhe textura, aroma e cor.

Os emulsionantes, por sua vez, permitem reforçar a estrutura da massa, a textura do pão e reduzem a velocidade de endurecimento deste. Exemplos de emulsionantes utilizados na panificação são o ácido láctico, ácido tartárico, lecitina de ovo, SSL-Estearoil lactilato de sódio (derivado de Glicerol-Monoacilgliceróis hidrófilos substituídos), entre outros (Sciarini, *et al.*, 2012).

#### **1.5.7. Sal**

O sal, é constituído essencialmente por cloreto de sódio, vulgarmente conhecido como “sal comum” ou “sal de cozinha”, é utilizado em grande escala na alimentação humana.

Este é responsável pelo aroma, sabor, textura, pelo aumento da estabilidade da massa, e pelo controlo da fermentação. Sendo que quando utilizado em grande

quantidade inibe a atividades das leveduras e não ocorre a fermentação, quando utilizado em pequena dose promove a fermentação mais rápida.

Segundo o Regulamento (UE) nº75/2009 foi estabelecido um teor máximo de sal permitido para o pão sendo este de 1,4g por 100g de pão.

### **1.6. Principais etapas de fabrico de pão sem glúten**

O processamento de panificação isenta de glúten compreende várias etapas, no entanto, destas, três apresentam elevada importância - amassadura, a fermentação e a cozedura. (Heller, 2009).

A amassadura possui como principal objetivo a mistura e homogeneização de todos os ingredientes, possibilitando a hidratação da farinha e a incorporação de ar que permite o desenvolvimento da massa, e posterior formação da rede proteica.

O passo seguinte, a fermentação, ocorre à temperatura ótima para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (37°C). Esta é responsável pela conversão dos açúcares livres, provenientes do amido em etanol (álcool), dióxido de carbono (gás) e outros compostos secundários (ácidos orgânicos, álcoois e ésteres) que posteriormente serão compostos associados ao sabor e aroma do pão. A velocidade de fermentação pode ser afetada pela quantidade de levedura e pelo teor de sal(Heller, 2009).

A etapa de cozedura ocorre entre os 180 e 220°C. Numa primeira fase de cozedura evidencia-se o aumento no volume da massa devido uma maior atividade da levedura, e conseqüente produção de gás. Ao atingir os 60°C ocorre a morte térmica das células de levedura e evapora-se o etanol, iniciando-se a gelatinização do amido e a coagulação das proteínas. No final da cozedura são favorecidas as reações de Maillard e a dextrinização do amido que levam ao escurecimento da còdea e ao desenvolvimento do aroma e sabor característicos do pão (Heller, 2009).

#### **1.6.1. Papel do amido nos produtos de panificação**

O amido é a fonte de reserva mais importante dos vegetais, este pode ser encontrado em raízes, sementes e tubérculos, sendo considerada a matéria-prima mais abundante e barata para a alimentação humana.

Quimicamente, o amido é constituído por dois polissacáridos: a amilose e a amilopectina, constituindo em conjunto pequenas unidades denominadas de grânulos. Estes grânulos permanecem intactos durante as principais etapas de processamento

(moagem, separação, purificação do amido), e o seu tamanho diverge de planta para planta(Elisena, A. et al, 2007).

Naturalmente, este possui uma capacidade limitada de absorver água fria, apresentando uma humidade de 12-14%, no entanto quando sujeito a calor, ocorre a quebra de ligações das pontes de hidrogénio entre as cadeias de amilose e amilopectina e, conseqüentemente, os grânulos tornam-se mais disponíveis e estabelecem ligações com água, promovendo-se a intumescência dos grãos e a formação de uma estrutura viscosa. Este processo denomina-se de gelatinização e é dependente das características do amido, mais concretamente das respetivas temperaturas de gelatinização que se relacionam com o teor de amilose. Na Tabela 5, apresentam-se as diferentes temperaturas de gelatinização do amido de diversas fontes. O processo de gelatinização prossegue até que haja a rotura dos grânulos por completo e a amilose seja lixiviada do grânulo formando uma pasta (Elisena *et al.*, 2007).

Tabela 5- Diferentes temperaturas de gelatinização de diversos tipos de amido

Amido	Temperatura (°C)
Milho	61-72
Batata	62-68
Batata doce	82-83
Mandioca	59-70
Trigo	53-64
Arroz	65-73

Na panificação este processo ocorre durante a cozedura e a estrutura viscoelástica formada torna-se numa estrutura esponja pela disrupção e dispersão dos grânulos do amido. Após a cozedura, quando o gel de amido é deixado a arrefecer, ocorre um realinhamento dos polímeros de glucose e um aumento da rigidez do produto. A este fenómeno denomina-se de retrogradação do amido, que leva a um aumento da consistência final, e na panificação, especificamente, ocorre um endurecimento de todos os produtos à base de amido.

A retrogradação, será tanto maior, quando maior for o teor de amilose no amido, pois as amiloses são moléculas lineares, que se ligam facilmente umas às outras, dando origem a uma recristalização e a um aumento de rigidez. A taxa de retrogradação varia com a razão amilose/amilopectina, temperatura, concentração de amido e concentração de outros ingredientes. Este fenómeno apresenta elevado impacto sobre a textura de produtos de panificação, onde a perda de frescura no armazenamento, especialmente do sabor, em simultâneo existe um endurecimento do miolo e uma perda de humidade(Elisena *et al.*, 2007).

## 1.7. Caracterização do pão: propriedades físicas e sensoriais

### 1.7.1. Comportamento Reológico

A Reologia é a ciência que estuda o escoamento e a deformação dos materiais quando submetidos a uma dada tensão. As propriedades reológicas são caracterizadas de acordo com a relação entre uma solitação mecânica (tensão) e a respetiva resposta do material (deformação), sendo que nos materiais líquidos a propriedade reológica de interesse é a viscosidade e nos sólidos é a elasticidade (Barnes, *et al* 1989).

Porém, existem materiais que assumem simultaneamente as duas características (de um fluido viscoso e de um sólido elástico) designando-se de materiais viscoelásticos, sendo que as massas panares se inserem nesta categoria.

Para a avaliação das propriedades reológicas dos alimentos existem diferentes tipos de ensaios utilizados – ensaios fundamentais, empíricos e imitativos. Os ensaios reológicos fundamentais são utilizados em estudos fundamentais, através de aparelhos sofisticados para previsão da microestrutura de materiais complexos, escoamento de fluídos estruturados e parâmetros viscoelásticos. Os ensaios empíricos, por sua vez, envolvem geralmente aparelhos simples, e analisam a macroestrutura de alimentos sólidos e medições correlacionadas com a avaliação sensorial, sendo os resultados obtidos dependentes das condições de realização do teste e da geometria da amostra. Os ensaios imitativos são testes empíricos que reproduzem as etapas de processamento do produto em escala laboratorial, para pré-avaliação do comportamento do produto (Sousa,2011).

A avaliação do comportamento viscoelástico linear é efetuada a partir de ensaios reológicos fundamentais em regime oscilatório, podendo ser de tensão ou de deformação controlada. De um modo geral, o comportamento reológico dos produtos viscoelásticos é representado pelo módulo complexo  $G^*$  (equação1). O  $G'$  (módulo elástico ou de armazenamento) representa a parte real e corresponde à energia armazenada. A componente viscosa do material é dada pelo  $G''$  (módulo viscoso ou de dissipação) que corresponde à parte imaginária da equação 1 e representa a energia que foi dissipada (Barnes *et al.*, 1989).

#### Equação 1

$$G^* = G' + i.G''$$

Assim, para o estudo do comportamento de materiais viscoelásticos, a avaliação das componentes  $G'$  e  $G''$  em função da frequência, através de teste de varrimento

de frequência, com valores de tensão e temperatura constantes, proporciona informação relevante acerca da estrutura interna do material analisado, sendo representado por uma curva designada de espectro mecânico. Este teste permite a caracterização adequada de géis, emulsões e espumas alimentares, permitindo a distinção entre géis consistentes (verdadeiros) de géis fracos. É importante referir que previamente à realização do teste de varrimento de frequência deve ser realizado um teste de varrimento de tensão, para garantir que a tensão utilizada não destrói a estrutura interna do alimento, estando compreendida na zona viscoelástica linear (Sousa,2011).

### 1.7.2. Avaliação das propriedades de textura

A textura é uma conceção meramente sensorial, e depende principalmente das propriedades estruturais percebidas pelo tato, visão e principalmente pela boca, através dos processos de mastigação e deglutição, esta é a propriedade mais importante dos alimentos sólidos. As propriedades sensoriais de determinados produtos podem ser traduzidas em propriedades físicas, macroscópicas, e mensuráveis instrumentalmente e que são, por outro lado, uma representação da estrutura do alimento resultante da sua composição química (Sousa, 2001).

A dureza ou firmeza é uma propriedade física utilizada na avaliação instrumental da textura dos alimentos. Geralmente, o termo dureza é associado a materiais predominantemente sólidos, como os frutos, e o termo firmeza a alimentos menos firmes como a massa de pão ou mesmo o pão, no entanto, os dois termos apresentam o mesmo significado físico.

O texturómetro permite simular a ação de mastigação da boca humana, sendo um ensaio reológico considerado empírico, este é um equipamento composto por um braço que fornece ao material em análise energia mecânica a taxa constante, e permite ao dinamómetro medir a energia fornecida. Através de uma sonda, contacta com a amostra e deforma o alimento através de um processo de compressão ou penetração. Pode realizar-se um teste com dois ciclos (duas dentadas), de modo a mimetizar as duas primeiras dentadas. Esse teste designa-se geralmente por teste de duas dentadas ou Análise de Perfil de Textura (*Texture Profile Analysis-TPA*). Os valores de força obtidos durante o deslocamento da sonda em contacto com a amostra são registados, obtendo-se um gráfico de força versus distância ou força versus tempo (texturograma – Figura7), a partir do qual se podem calcular diversos parâmetros de textura, como a firmeza, adesividade e coesividade .(Bourne, 2002)

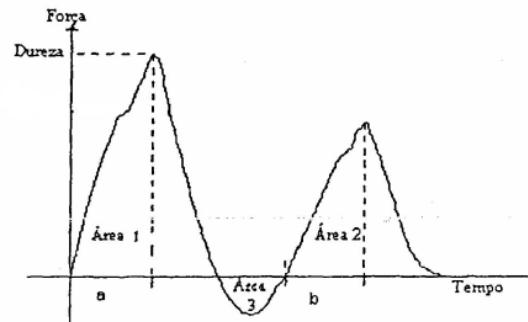


Figura 7- Texturograma

Fonte:(Bourne, 2002)

Durante o teste TPA é realizada uma primeira compressão ou penetração seguida de uma relaxação durante um curto período (5s) e segue-se uma segunda compressão. A partir deste teste pode obter-se os seguintes parâmetros de textura da amostra (Bourne 2002):

- Dureza ou firmeza - força máxima durante o primeiro ciclo de compressão;
- Coesividade - razão entre a área de força positiva durante o segundo ciclo de compressão, e a área de força positiva durante o primeiro ciclo de compressão ( $\text{Área 2}/\text{Área 1}$ ).
- Adesividade - trabalho necessário para ultrapassar as forças de atração entre o material e a superfície da sonda. É dado pelo valor da área correspondente à força negativa ( $\text{Área 3}$ ).
- Elasticidade - razão entre a distância necessária para atingir o pico na segunda compressão e a mesma distância para a primeira compressão, e normalmente representa-se em percentagem ( $b/a \times 100\%$ ).

O micro-doughLAB (Figura 8), desenvolvido pela Perten Instruments, é um misturador de massa em pequena escala (4g). É um sistema de análise com a ação de mistura de braço para determinar a qualidade e as características de processamento da farinha e da massa. O facto de utilizar pouca amostra revela-se ideal para o uso de amostras limitadas e/ou valiosas (Perten Instruments, 2018).



Figura 8-Micro-doughLAB

Este é um aparelho que auxilia na determinação das características de uma farinha, como a quantidade de água absorvida para atingir a consistência ideal da massa, a exigência de tempo de mistura e a estabilidade da massa. No Método Padrão de Teste, a farinha é misturada com a água a temperatura constante (30°C) e velocidade de 63 rpm durante 20 minutos, a resistência à mistura é medida como torque, que é apresentado nos resultados como um gráfico de torque versus tempo.

O teste padrão, para massas com glúten, visa atingir um torque máximo de 100 mNm, enquanto que para as massas sem glúten, o valor é, geralmente, muito inferior. As amostras podem ser avaliadas quanto à absorção ótima de água (WA), tempo de desenvolvimento da massa, estabilidade e outros parâmetros tecnológicos. O método é aplicável a qualquer farinha, incluindo farinha integral e formulações sem glúten (Perten Instruments, 2018).

Para o uso deste método é importante ressaltar que o WA corresponde à absorção de água e é a percentagem de água bruta absorvida pela mistura de farinhas. P é o parâmetro que representa o pico máximo de torque atingido pela amostra. O DDT é a variável que representa o tempo de desenvolvimento da massa, e relaciona-se com o teor de proteína, a qualidade da amostra de farinha e as condições do teste. Por sua vez, a estabilidade corresponde à tolerância da farinha à mistura. O Abrandamento, corresponde à diferença de torque no tempo correspondente ao DDT e o torque final. O

pico de energia corresponde à energia mecânica acumulada aplicada à massa durante o tempo de desenvolvimento. Por fim, o último parâmetro analisado é a consistência final e esta corresponde ao valor final retirado do gráfico torque *versus* tempo (Perten Instruments, 2017).

### 1.8. Análise Sensorial

De uma forma geral, a análise sensorial consiste numa disciplina da Ciência usada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos alimentos tal como são percebidos pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (Estevão, 2014)

No desenvolvimento de novos produtos a aceitabilidade do produto pelo consumidor é determinante, pois o objetivo principal de uma empresa é vender os produtos que fabrica, sendo por isso imprescindível o desenvolvimento e fabrico de produtos do agrado do consumidor. No entanto, a relação das características sensoriais com a avaliação da textura dos alimentos é um aspeto crucial na área do desenvolvimento de produtos.

Existem diversos testes para avaliar sensorialmente os produtos alimentares. Os mais utilizados são os testes de diferenciação, testes descritivos e testes hedónicos. Os primeiros são usados para determinar a probabilidade de diferença ou igualdade entre amostras (ISO 6658:2005). Os testes descritivos envolvem a deteção, descrição e quantificação das características dos produtos por um painel de provadores treinados (Alvelos, 2002). Os testes hedónicos relacionam-se com a avaliação dos produtos por parte dos consumidores, sendo utilizados com o objetivo de perceber até que ponto o consumidor gosta do produto, o que prefere relativamente a outros ou o que considera aceitável do ponto de vista das suas características sensoriais, sendo este o teste aplicado nesta dissertação (Alvelos, 2002).

# Materiais e Métodos



## 2. Materiais e Métodos

O primeiro passo para a execução da presente dissertação foi uma cuidada pesquisa de diversas formulações de pães isentos de glúten em diferentes fontes bibliográficas. Destas, a que se revelou mais adequada para o presente estudo foi a receita estudada por Gulsum, *et al* (2015), a partir da qual foram realizados ensaios preliminares para modificação e otimização das características pretendidas, através da observação sensorial direta dos pães obtidos, manuseamento das massas e avaliação da sua consistência.

Seguidamente, após a seleção de uma formulação controlo, procedeu-se à sua otimização onde foram estudados os tempos de amassadura - os tempos de 7,8 e 10 minutos. Posteriormente, foi avaliado o impacto do teor de HPMC - variando os seus teores - 1,5%, 2,4% e 3% (m/m). Por fim, foi avaliado o impacto do binómio Tempo/Temperatura de cozedura para a obtenção do produto final (160°C, 180°C, 190°C).

Numa terceira fase do trabalho, avaliou-se o impacto da incorporação da microalga *Tetraselmis chuii* nas propriedades físicas das massas e dos pães.

### 2.1. Materiais

Todos os ingredientes utilizados foram selecionados de acordo com o custo de mercado e garantia de isenção de glúten.

Utilizou-se farinha de arroz (Espiga), farinha de trigo sarraceno (Próvida), fécula de batata (Globo), o hidrocolóide HPMC (WELLENCE™ Gluten Free 321, Dow), levedura desidratada (Fermipan), sal (continente), açúcar (Sidul) e óleo vegetal (Fula). Todos os produtos referidos anteriormente foram selecionados sempre do mesmo lote.

De modo a comparar os resultados com um produto industrial já existente no mercado utilizou-se um preparado/mix de farinhas para pão rústico sem glúten da marca Schär.

A microalga *Tetraselmis chuii* foi produzida à escala piloto pelos nossos parceiros noruegueses do projeto A2F, tendo posteriormente sido sujeito a um processo de disrupção celular usando um moinho de esferas e depois desidratado por liofilização. As condições de disrupção usadas no moinho de esferas (15% de matéria seca durante

o processamento, esferas de vidro de 0,2-0,4mm, Câmara de 600 ml com 85% de enchimento) permitiram atingir um nível de disrupção celular da ordem dos 90%. Este lote de Tc corresponde ao produzido em fevereiro de 2018 no âmbito deste projeto, a sua composição nutricional (Tabela 6) foi determinada por um dos grupos de investigação do projeto Algae2Future.

Tabela 6- Composição nutricional *Tetraselmis chuii*

Composição Nutricional	Média (por 100g)
Proteínas	47,7g
Lípidos	11,4g
EPA	3,6g
DHA	0g
Sal	2,3g
Amido	2,4g
Humidade	7,5g

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Processo de fabrico do pão

Para a preparação das massas, e de forma a uniformizar as condições de amassadura, os ingredientes foram misturados num processador de cozinha (Bimby, Vorwek, Germany). Em primeiro lugar, foi feita a pesagem de 300g de misturas de farinhas (farinha de arroz, fécula de batata e farinha de trigo sarraceno). De seguida, foi ativada a levedura através da adição de água e o açúcar, a 37°C durante 2 min. Seguidamente, adicionaram-se os restantes ingredientes e misturou-se durante 10 min à velocidade espiga. Posteriormente, a massa obtida foi colocada numa forma retangular (dimensão 25,5x12,0x6,5 cm). Depois, procedeu-se à fermentação durante 50 min a temperatura controlada a 40°C numa estufa de fermentação (Unox, Itália). Após a fermentação, a massa foi cozida (180°C) num forno elétrico (Johnson A60) durante 50 min. No forno foi colocado um recipiente com água para garantir um ambiente húmido, e evitar a formação precoce da crosta do pão. De seguida, efetuou-se o arrefecimento dos pães, num período de 2 h, até à temperatura ambiente (25°C),

para posterior corte e análise. Por fim, as fatias dos pães foram embaladas em sacos de polietileno e armazenadas à temperatura ambiente durante um período de 48 h.

A Tabela 7, apresenta as diferentes percentagens de ingredientes utilizados para o desenvolvimento das diferentes formulações desde o Controlo, as formulações com incorporação de Tc.

Tabela 7-Formulações e respetivas % de ingredientes adicionados

Ingredientes (%)	Controlo	Tc 1%	Tc 2%	Tc 4%
<i>Tetraselmis chuii</i>	-	1	2	4
Farinha de arroz	31	30.7	30.4	29.8
Farinha de trigo sarraceno	46	45.5	45.1	44.2
Fécula de batata	23	22.8	22.5	22.1
Água	69			
Os restantes ingredientes (%) são adicionados em relação à mistura de farinhas+Tc				
Levedura	2,8			
Açúcar	2,8			
Sal	1,8			
Óleo	5,5			
HPMC	4,6			

### 2.2.2. Avaliação da textura

Para a Análise do Perfil de Textura (TPA) das diferentes amostras foi utilizado um texturómetro (TA.XTplus), sendo esta avaliação realizada numa sala com temperatura controlada a  $20 \pm 5$  °C.

Nos ensaios realizados à massa não fermentada, foi utilizada uma sonda acrílica com 19 mm de diâmetro (P/19L). Efetuaram-se pelo menos 4 repetições usando uma distância de penetração de 20 mm, velocidade da sonda de  $1\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  e 5 s de espera entre ciclos de penetração sendo a massa colocada em recipientes cilíndricos de  $9,5 \times 6,0 \text{ cm}^3$  de dimensões.

Nos testes efetuados ao pão, a sonda acrílica utilizada foi de 10 mm de diâmetro (P/10). Realizaram-se, também tal como para a massa, pelo menos 4 repetições, a uma

distância de penetração de 10 mm, velocidade de  $1\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  e 5 s de espera entre ciclos de penetração em locais distintos de cada amostra (fatia) com 2 cm de altura.

#### **2.2.2.1.1. Análise instrumental da cor**

A cor é um atributo determinante da aceitabilidade do produto. No presente estudo foi analisada instrumentalmente a cor da massa e do pão.

A avaliação instrumental da cor foi efetuada através de um colorímetro Minolta (CR400), com recurso ao sistema CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), usando um padrão branco de calibração ( $L^*= 94,61$ ;  $a^*= -0,53$ ;  $b^*=3,62$ ). Para cada formulação foram efetuadas pelo menos 6 repetições das quais se apresenta a média e o desvio padrão, é importante de ressaltar que o colorímetro foi sempre calibrado com um padrão a cada formulação.

Esta é uma escala / sistema, em que as cores são descritas através da Luminosidade( $L^*$ ) – os valores variam entre 0% (preto) e 100% (branco), e das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ . Os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  variam entre as tonalidades vermelho (+60) e verde (-60) e tonalidades amarelo (+60) e azul (-60), respetivamente. (A Guide to Understanding color communication,2007)

#### **2.2.2.1.2. Determinação do pH**

Para a determinação do pH das massas utilizou-se um potenciómetro com um eletrodo de sólidos, previamente calibrado com duas soluções padrão pH 4,01 e pH 7,00. O eletrodo foi inserido no centro das diferentes massas e as análises foram realizadas em quadruplicado e utilizadas duas amostras de cada produto.

#### **2.2.2.1.3. Análise reológica das massas**

A caracterização reológica das massas fermentadas foi realizada num reómetro de tensão controlada (MARS III, Haake, Alemanha), utilizando um sistema sensor de pratos paralelos serrados (PP20 - 20mm de diâmetro) com 1 mm de distância entre pratos.

Após amassadura, a massa é dividida em pequenas porções para análise no reómetro e colocada na câmara de fermentação. Após fermentação, a amostra é colocada no prato do reómetro, e coberta com parafina líquida, de modo a evitar perdas por desidratação.

Primeiro foi efetuado um teste de varrimento de tensão para se determinar a zona de viscoelasticidade linear de cada amostra e selecionar a tensão a aplicar no teste de varrimento de frequência a realizar posteriormente. Novamente, coloca-se uma porção de massa sob o prato e realizou-se o teste de varrimento de frequência, com o intuito de obter um espectro mecânico. Ambos os testes foram realizados a 5°C para parar a fermentação e as determinações foram feitas pelo menos em triplicado.

Para se analisar a evolução das propriedades reológicas da massa e determinar o torque máximo de todas as formulações utilizou-se o MicrodoughLAB. Pesa-se 4g da mistura de farinhas, HPMC, açúcar, sal, com ou sem microalga, que posteriormente foi colocado no misturador do equipamento, considerando uma absorção de água de 69%, o teste foi realizado a uma velocidade de 63 rpm durante 20 minutos. Obteve-se os gráficos de Torque (mN.m) versus Tempo(mim), que posteriormente foi tratado na análise de resultados.

#### **2.2.2.1.4. Análise da atividade da água**

A atividade da água ( $a_w$ ) é definida como a água livre disponível no alimento, ou seja a água que não estabelece ligações com os outros constituintes do alimento e que está disponível para o crescimento microbiano, reações químicas e enzimáticas. Este é um parâmetro importante para a conservação dos alimentos principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento microbiano, mais especificamente valores de  $a_w$  superiores a 0,75 são determinantes no crescimento de leveduras e bactérias.

As medições de  $a_w$  do miolo do pão foram efetuadas após o arrefecimento das amostras, através do medidor de atividade da água equipamento HygroPalm AW (Rotronic, Reino Unido) sendo realizada a temperatura constante. Foram efetuadas medições em triplicado e apresentados os resultados da média e respetivo desvio padrão.

#### **2.2.2.1.5. Determinação da humidade**

A determinação do teor de humidade do pão e das farinhas foi feita utilizando um medidor de humidade PMB 202 a uma temperatura de 130°C. Realizaram-se medições em triplicado de todos os pães e farinhas.

#### 2.2.2.1.6. Volume do pão

A medição do volume do pão é realizada de acordo com norma internacional AACC 10-05.01. Esta norma corresponde ao método de deslocamento de sementes de colza para a medição de volume.

Com recurso a uma caixa com dimensões de 52x20x10 cm foi colocado o pão e encheu-se até à superfície com sementes de colza. Depois, mediu-se o volume das sementes que estavam no interior da caixa de metal. Foram realizadas medições em triplicado para cada formulação e apresentados os valores médios obtidos. Através deste método é possível a determinação do volume do pão, que se calcula subtraindo ao volume da caixa, o volume necessário de sementes para perfazer o volume total da caixa com o pão.

#### 2.2.2.1.7. Perdas na cozedura

As perdas durante a cozedura, este é um parâmetro que nos permite verificar qual a % de água perdida na cozedura, este é calculado através da expressão:

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

#### 2.2.2.1.8. Análise Sensorial

Para a análise sensorial foram selecionados os pães com incorporação de 1% e 4% de *Tetraselmis chuii* e também o pão Controlo, por serem os que apresentam maior interesse sob o ponto de estrutura e volume.

Para a avaliação dos pães no que diz respeito à sua aceitação sensorial foram selecionados os atributos de cor, aroma, sabor, textura, apreciação global e intenção de compra. Assim, foi aplicada uma folha de prova (Anexo I) com uma escala de classificação hedónica a cada um dos atributos, que varia de “muito desagradável” a “muito agradável” e também sobre a intenção de compra. As provas foram realizadas recorrendo a um painel de 32 provadores não treinados, sendo que cada provador foi instruído sobre a forma mais correta de realizar a prova e se explicou a importância de enxaguar a boca entre amostras. Todas as amostras foram codificadas com duas letras e um número distinto. Os resultados foram analisados por perfil sensorial (ISO13299:2003).

#### 2.2.2.1.9. Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados experimentais foi feito recorrendo ao software *OriginPro8*. Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) usando o teste de Tukey para um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), para avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores médios dos diferentes parâmetros analisados.

## Resultados e Discussão



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Otimização da formulação

##### 3.1.1. Desenvolvimento de formulação base – ensaios preliminares

Para o desenvolvimento da formulação base (controlo) foram testadas diversas formulações que resultaram das pesquisas feitas previamente em distintas fontes bibliográficas.

Ao longo da realização dos testes preliminares os maiores entraves para o desenvolvimento do produto corresponderam a baixo volume, côdea elevada, miolo desadequado e elevada quantidade de água na matriz. Para tal utilizaram-se farinhas distintas e outras matérias primas, em proporções diferentes, e também hidrocolóides como a xantana, *psyllium* e o HPMC.

Depois de vários testes, foi possível encontrar uma formulação com potencialidade para o projeto a apresentada na tabela 8 , sendo que esta necessitava de otimizar algumas fraquezas, nomeadamente a estrutura do miolo pois este ainda apresentava alguma desintegração.

Tabela 8- Formulação a otimizar

Ingredientes	%	Fotografia
Farinha de arroz	16,48	
Farinha de Trigo Sarraceno	24,72	
Fécula de Batata	12,36	
Fermento	1,48	
Açúcar	1,48	
Óleo	0,99	
HPMC	2,45	
Sal	2,97	
Água	37,08	

Na fase seguinte pretende estudar-se o impacto de algumas das variáveis de processamento (tempo de amassadura, quantidade de HPMC e tempo-temperatura de cozedura) na textura final do pão.

### 3.1.2. Impacto do tempo de amassadura

Avaliou-se o impacto do tempo de amassadura nas propriedades de textura e aspecto geral dos pães (formulação controlo – Tabela 7), testando os tempos 7, 8 e 10 minutos, mantendo constante as outras variáveis de processo.

Pela análise das Figuras 9 e 10 é possível verificar que o parâmetro firmeza do pão aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) quando o tempo de amassadura aumenta de 7 ou 8 min para 10 min. Verifica-se que não existe diferença significativa para os tempos de amassadura de 7 e 8 min.

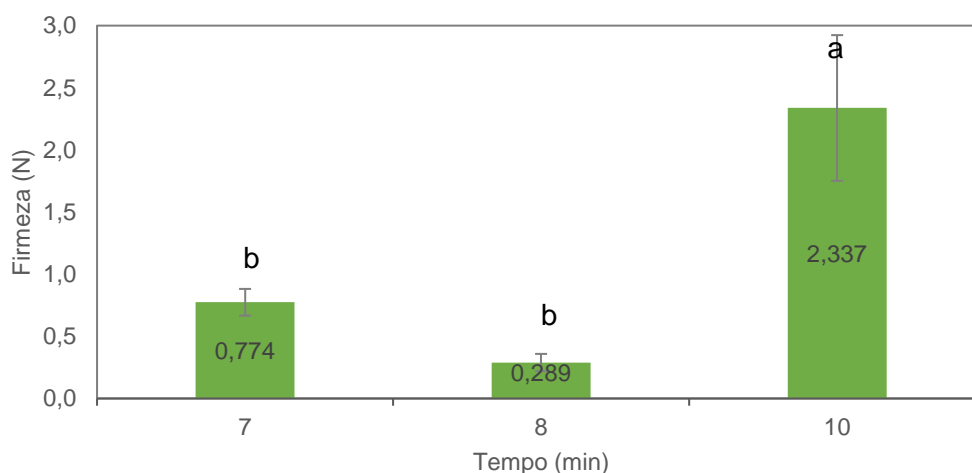


Figura 9- Firmeza dos pães produzidos com diferentes tempos de amassadura. As barras de erro representam o desvio padrão obtido. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

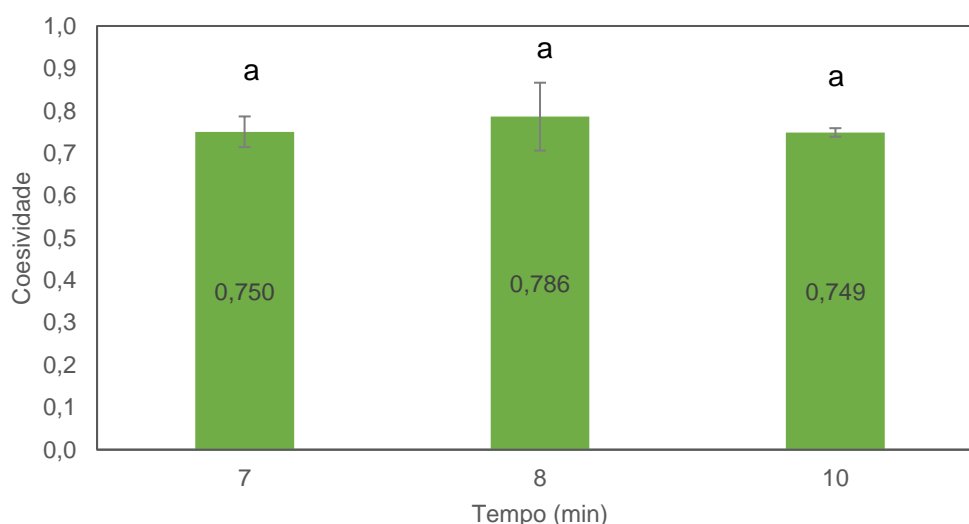


Figura 10- Coesividade dos pães produzidos com diferentes tempos de amassadura. As barras de erro representam o desvio padrão obtido. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

No que diz respeito à coesividade não existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os diferentes tempos de amassadura estudados.

Todas as formulações geraram um volume e uma cõdea adequada como pode ser observado na Figura 11, as diferenças entre formulações dizem respeito ao miolo do pão, ou seja, verifica-se que o tempo de amassadura influencia a estruturação do miolo, pois para tempos de amassadura inferiores a 10 min o miolo esfarela mais.

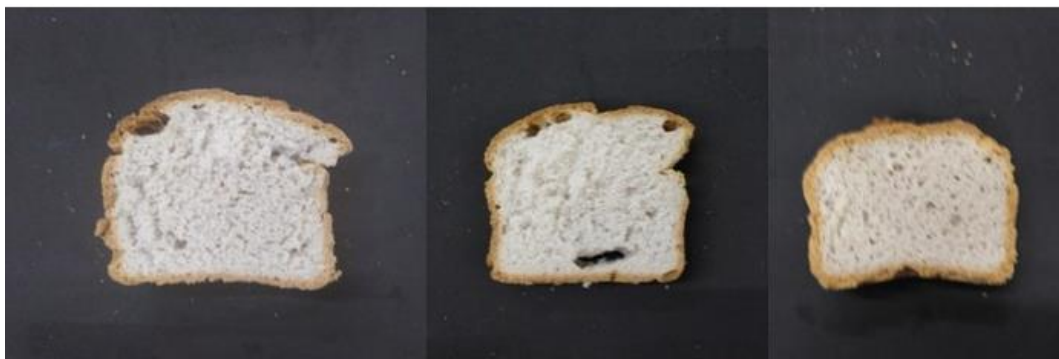


Figura 11- Fatias de pão, resultado das variações de tempo de amassadura 7,8 e 10 min (da esquerda para a direita)

Deste modo, tendo em conta os parâmetros de firmeza e coesividade e o aspeto geral dos pães obtidos, o tempo de amassadura escolhido para os testes seguintes foi 10 min, por apresentar um valor de firmeza idêntico ao mix comercial analisado (1,7 N – Figura 24).

### **3.1.3. Impacto do binómio Tempo/Temperatura do processamento térmico**

O tempo e temperatura de cozedura são variáveis importantes no estudo, pois diferentes binómios tempo-temperatura conduzem a resultados diferentes ao nível das propriedades físicas do pão. Foram estudados 4 binómios de tempo temperatura – 160°C/60min, 170°C/50 min, 180°C/ 50 min e 190°C/40min. O tempo de amassadura mantido foi o de 10 min e o teor de HPMC foide 2,4%.

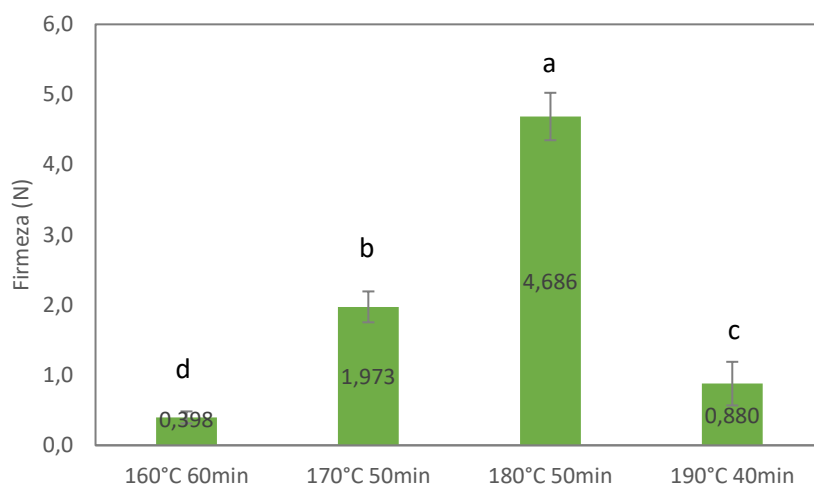


Figura 12-Firmeza dos pães produzidos com diferentes temperaturas e tempos de cozedura. As barras de erro representam o desvio padrão obtido. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

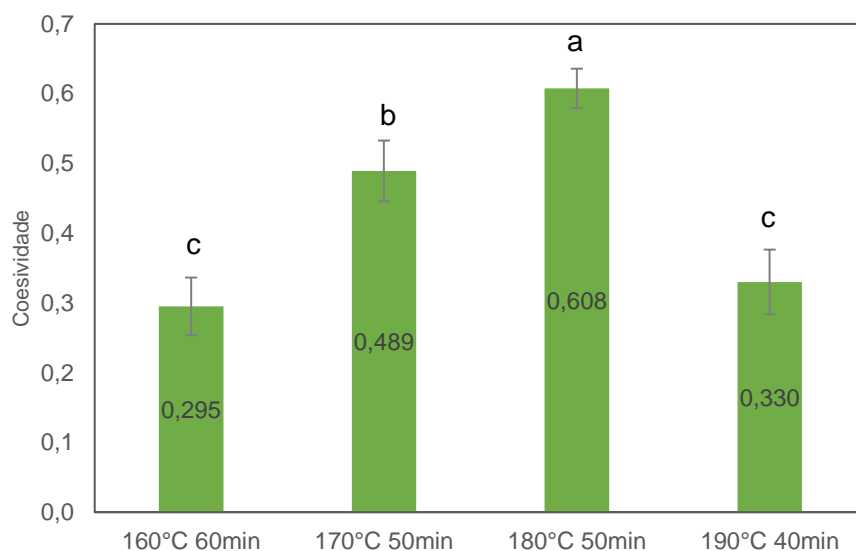


Figura 13- Coesividade dos pães produzidos com diferentes temperaturas e tempos de cozedura. As barras de erro representam o desvio padrão obtido. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



Figura 14-Fatias de pão, resultado das variações de Binómios T/t distintos 160°C/60min, 170°C/50min,180°C/50min,190°C/40mim ( da esquerda para a direita)

Pela análise das Figuras 12 e 13 pode-se concluir que as firmezas são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sendo superior para o binómio tempo/temperatura de 180 °C. Por sua vez, a coesividade apresenta valores

significativamente superiores para 170 °C e 180 °C – 50 min, com a temperatura de 180 °C-50 min com a maior coesividade.

Na Figura 14 apresentam-se as imagens das fatias dos pães obtidos usando os diferentes binômios T/t, é de rápida percepção que o pão de 160°C/ 60 min apresenta uma separação da crosta e do miolo, o que é esperado dado os valores de firmeza e coesividade serem os mais baixos. No entanto para as restantes formulações o aspeto geral é idêntico.

Assim, o binómio 180°C-50 min é o que se revela mais indicado para o estudo, pois é o que produz melhor resultado em simultâneo para os parâmetros firmeza e coesividade e o que se aproxima mais das características finais de um pão.

### 3.1.4. Impacto do teor de HPMC

A quantidade de HPMC em estudo é uma variável determinante, pois diferentes teores de incorporação conduzem a resultados diferentes quer na firmeza, quer na coesividade. Foram estudados três teores de HPMC- 1,5%, 2,4% e 3,0%, com um tempo de amassadura de 10 min e um binómio de 180°C/50 min.

Foi também testada uma concentração abaixo de 1% de HPMC (0,26%) mas não se verificou aumento de volume no produto como resultado da introdução deste espessante, mas sim um pão muito compacto, o que demonstra a importância deste agente estruturante para o reforço da matriz de amido, o constituinte com maior importância nas formulações de pão sem glúten.

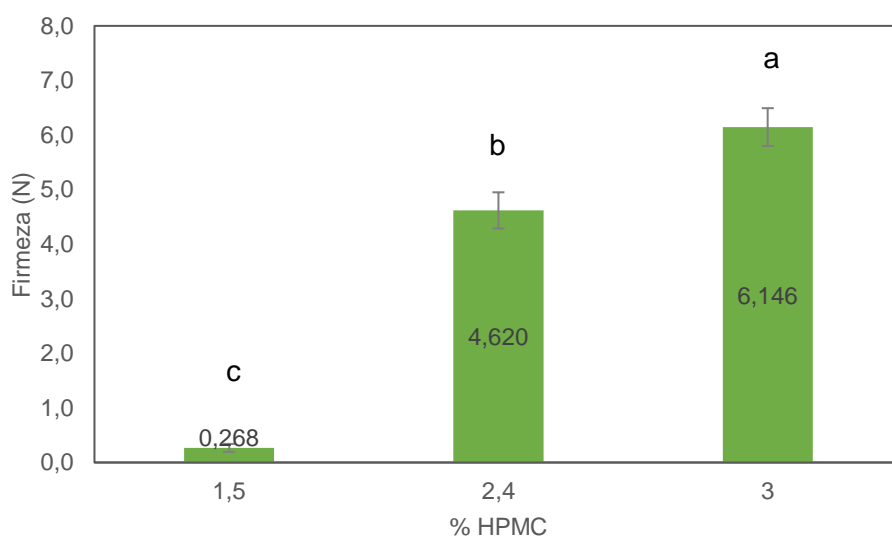


Figura 15-Firmeza dos pães produzidos com diferentes teores de HPMC. As barras de erro representam o desvio padrão obtido. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

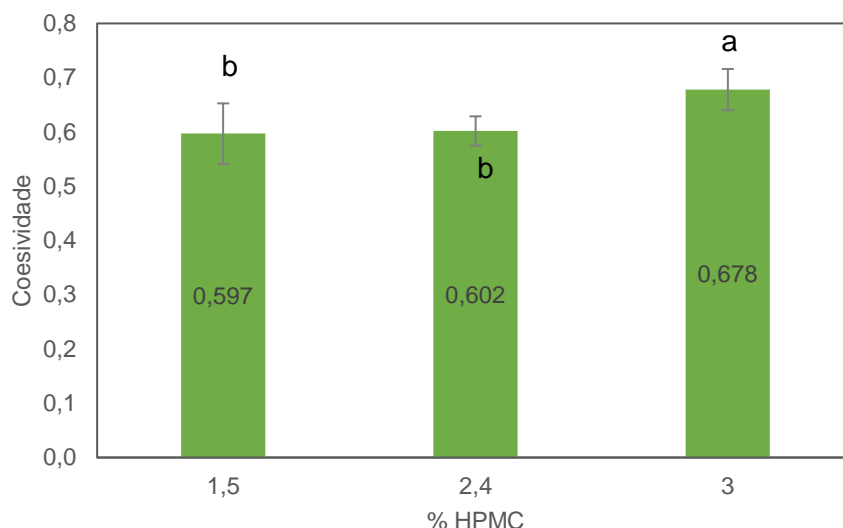


Figura 16-Coesividade dos pães produzidos com diferentes teores de HPMC. As barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).



Figura 17-Fatias de pão, resultado das variações de 1,5%, 2,4% e 3% de HPMC (da esquerda para a direita)

Pela análise das Figuras 15 e 16 pode-se concluir que a firmeza do pão aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) com o nível de incorporação de HPMC, variando de 0,27 N a 6,1 N. Por sua vez, a coesividade não apresenta valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para 1,5% e 2,4%, verificando-se um ligeiro aumento para 3% de HPMC.

Através da Figura 17 observa-se que existem diferenças ao nível do volume dos pães. Na fatia à esquerda que corresponde a uma percentagem de 1,5 de incorporação de HPMC verifica-se que o volume gerado é baixo, a cêdea é adequada, e o miolo apresenta poucos alvéolos, na fatia com 2,4% de incorporação de HPMC o produto obtido apresenta um volume e cêdea adequados e um miolo com alvéolos. Por sua vez, com 3% verifica-se uma diminuição do volume, a cêdea é adequada, no entanto o miolo apresenta poucos alvéolos.

Assim, a percentagem de 2,4% é a que se revela mais indicada para o estudo, quer pelos parâmetros de firmeza e coesividade, quer pelo aspeto geral do pão.

### 3.2. Incorporação de *Tetraselmis chuii*

Após a seleção da formulação controlo e das condições de processo a utilizar, e considerando que esta formulação tem cerca de 69% de água, para uma base de 14% de humidade da mistura de farinhas (arroz, trigo sarraceno e fécula de batata), utilizou-se o Micro-doughLAB para analisar a evolução das propriedades reológicas durante a amassadura a 63rpm e determinar o torque máximo da formulação controlo.

#### 3.2.1. Propriedades físicas das massas e pães

##### 3.2.1.1. Determinação do teor de absorção de água das formulações

Na Figura 18 e na Tabela 9 apresentam-se as curvas obtidas no Micro-doughLAB e os resultados dos parâmetros obtidos nos testes a 63 rpm para as massas com diferentes níveis de incorporação de microalga, utilizando uma absorção de água igual à do controlo, de 69% (WA).

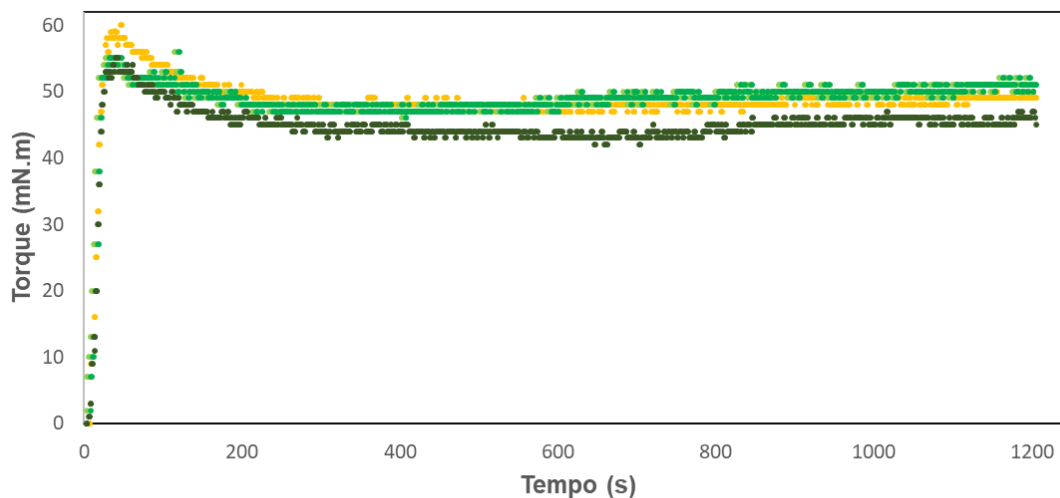


Figura 18-Curvas do MicrodoughLab finais para as diferentes formulações, e para uma bsorção de 69%

Tabela 9-Resultados obtidos no Micro-doughLAB, letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações (p<0,05).

	WA (%)	P (mN.m)		DDT (s)		Estabilidade(s)		Abrandamento (mNm)		Pico de Energia (Wh/kg)		Consistência final (mN.m)
<b>Controlo</b>	69,0	56	a	48	a	30	a	9,0	a	0,60	a	49
<b>Tc 1%</b>	69,0	51	a,b	48	a	44	a	6,7	a	0,50	a	51
<b>Tc 2%</b>	69,0	56	a,b	50	a	44	a	6,7	a	0,60	a	51
<b>Tc 4%</b>	69,0	49	b	48	a	50	a	9,3	a	0,48	a	46

A Tabela 9 permite-nos a observação dos parâmetros relevantes ao estudo de absorção e estabilidade da massa.

A primeira conclusão a retirar é que não foi necessário fazer um ajuste do valor de absorção de água (WA) nas amostras com Tc, uma vez que o valor da consistência final das massas não variou mais do que 5% em relação ao controlo.

A segunda conclusão corresponde ao efeito da adição de Tc nas propriedades reológicas das massas. Verifica-se após análise estatística (ANOVA) que a adição desta microalga não tem impacto nos parâmetros obtidos no MicrodoughLab, ou seja, as propriedades reológicas da massa durante a operação de amassadura não apresentam diferenças significativas entre si, demonstrando que a adição de 1%, 2% e 4% Tc não tem impacto significativo.

Tal não era o esperado pois com a adição de uma quantidade superior de microalga, e conseqüentemente de proteína, seria de esperar o aumento da capacidade de absorção de água. Assim, a Tc apresenta um comportamento diferente ao estudado por Mohammed *et al.* (2012) com a adição de proteínas de leguminosas à farinha de trigo, que verificaram o aumento da absorção de água com o aumento da proteína. O mesmo foi verificado por Graça *et al.* (2018) através da adição da microalga *Chlorella vulgaris* no pão de trigo, sendo que com o aumento da incorporação de proteínas vegetais ou outras fontes proteicas – concentrados ou isolados -, verificaram que existe um aumento da capacidade de competição pela água com outros constituintes no sistema da massa, e o resultado é exibirem uma maior capacidade de absorção de água.

### 3.2.1.2. Análise das propriedades viscoelásticas da massa

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos nos testes de varrimento de frequência efetuados às massas fermentadas - formulação controlo, mix comercial e formulações com adição de 1%, 2% e 4% de *Tetraselmis chuii*.

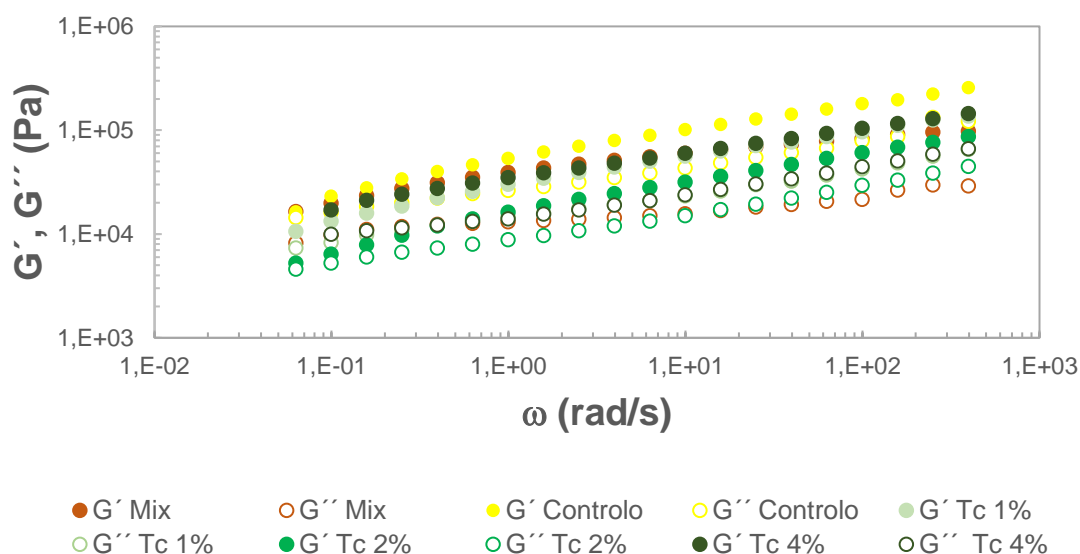


Figura 19- Espectros mecânicos realizados a 5°C, das massas fermentadas a 37°C, com diferentes teores de Tc, e comparação com o controlo e mix comercial.

Analisando os espectros mecânicos da Figura 19 verifica-se que todas as massas possuem uma componente elástica (G') superior à componente viscosa (G''), o que permite dizer que a massa fermentada apresenta um comportamento semelhante a um gel estruturado, embora os módulos viscoelásticos apresentem um distanciamento inferior a uma década.

A dependência do módulo elástico e do módulo viscoso da frequência pode ser descrito pela equação da Lei de Potência (equação 2):

$$G' = \alpha' f^{b'}$$

$$G'' = \alpha'' f^{b''}$$

Os valores de  $\alpha$  e  $b$  são determinados através da regressão linear do logaritmo  $G'$  e  $G''$  versus o logaritmo da frequência, onde  $\alpha'$  e  $\alpha''$  são as ordenadas na origem e  $b'$  e  $b''$  são os declives (Bernaerts *et al.*, 2017). Os valores obtidos para estes parâmetros são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Ajuste das equações de Lei de Potência, letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

	$\alpha'$	$b'$	$\alpha''$	$b''$
<b>Mix comercial</b>	38397 a	0,182 d	13942 a,b	0,130 a
<b>Controlo</b>	43446 a	0,289 a,b	23896 a	0,239 a
<b>Tc1%</b>	31724 a,b	0,267 b,c	15642 a,b	1,497 a
<b>Tc2%</b>	11639 b	0,318 a	6875 b	0,268 a
<b>Tc4%</b>	37213 a	0,249 c	17555 a	0,223 a

( $R^2$  0,91-0,99)

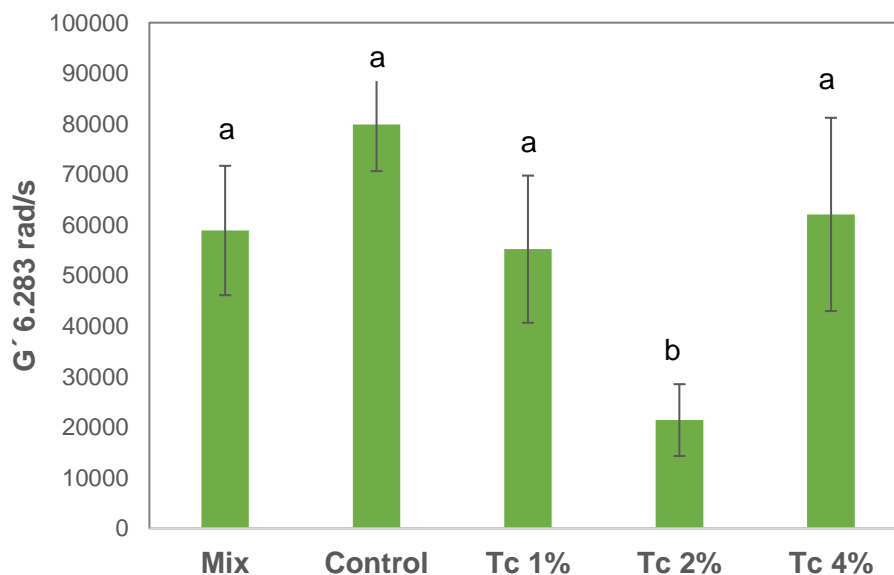


Figura 20- Módulo elástico para as diferentes formulações para  $w=6,283$  rad/s, letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

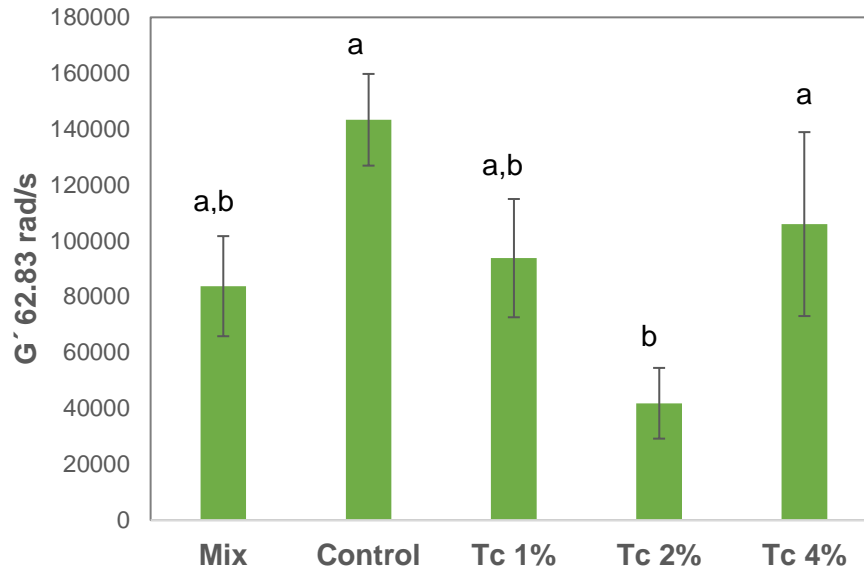


Figura 21-Módulo elástico para as diferentes formulações para  $\omega=62,83$  rad/s, letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p<0,05$ ).

O teste de varredura de frequência foi realizado para avaliar o impacto da adição de Tc na estrutura da massa fermentada. Os espectros mecânicos permitem concluir que a adição de Tc (1-4%) não teve impacto nas propriedades viscoelásticas das massas fermentadas, uma vez que os valores de ajuste da Lei de Potência não apresentam diferenças significativas. Uma exceção que se verifica é o valor de declive do mix comercial, sendo inferior aos outros valores de declives do controlo e de massas com Tc, o que nos permite concluir que existe uma menor dependência do módulo elástico ( $G'$ ) da frequência, correspondente a um maior grau de maturação, embora o valor de  $\alpha'$  indicador de magnitude de  $G'$  não apresente diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o controlo e massas com Tc.

No entanto, comparando os valores do módulo elástico ( $G'$ ) retirados dos espectros mecânicos a duas frequências distintas (6,28 e 62,83 rad/s), conforme as figuras 21 e 22, verifica-se que a 6,28 rad/s existem diferenças significativas entre a formulação Tc 2% e as restantes formulações estudadas.. Também é de destacar o comportamento distinto da massa Tc 2%, com menor valor de  $G'$  a 62,83 rad/s, correspondente a um menor nível de estruturação.

### 3.2.1.3. Análise da textura das massa e pães

As Figuras 22 e 23 representam os resultados de firmeza e coesividade obtidos no teste de TPA, para as massas sem glúten.

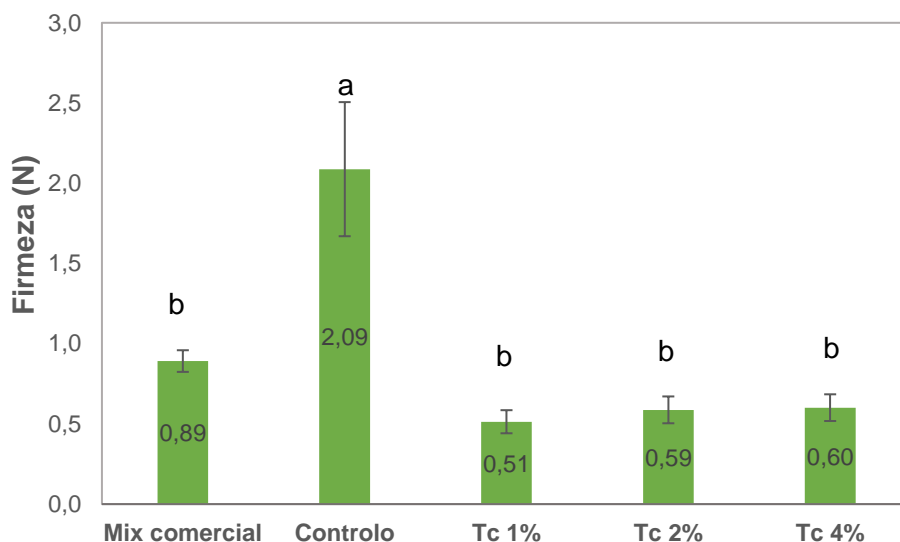


Figura 22-Valores da firmeza da massa não fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de Tc. Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações ( $p < 0,05$ ).

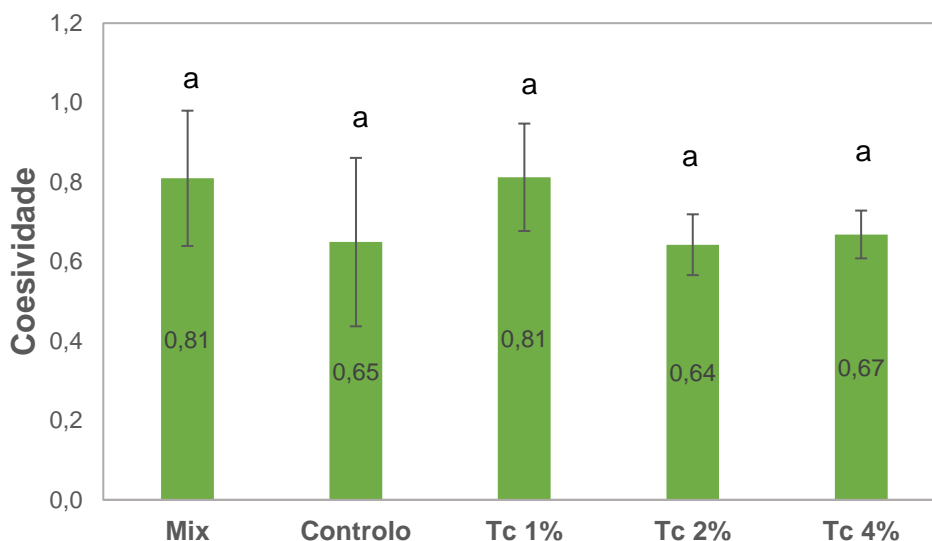


Figura 23- Valores de coesividade da massa não fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de Tc. Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações ( $p < 0,05$ ).

A primeira conclusão a retirar é que a adição de Tc (1 a 4% m/m) tem impacto na textura da massa, reduzindo os valores de firmeza, embora não exista diferença significativa nos valores de coesividade entre todas as amostras analisadas ( $p < 0,05$ ). A firmeza do mix é idêntica à das formulações com Tc. Contudo, para estes níveis de concentração de Tc, não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na textura das massas

não fermentadas com diferentes níveis de incorporação de biomassa de Tc. Embora os resultados obtidos no MicrodoughLab não tenham permitido discriminar as massas com adição de biomassa de Tc da massa controlo, com o TPA verificou-se uma redução dos valores de firmeza das massas com incorporação de microalga.

As Figuras 24 e 25 representam os resultados de firmeza e coesividade obtidos no teste TPA para o pão no tempo zero (0 horas) para as diferentes formulações e mix comercial.

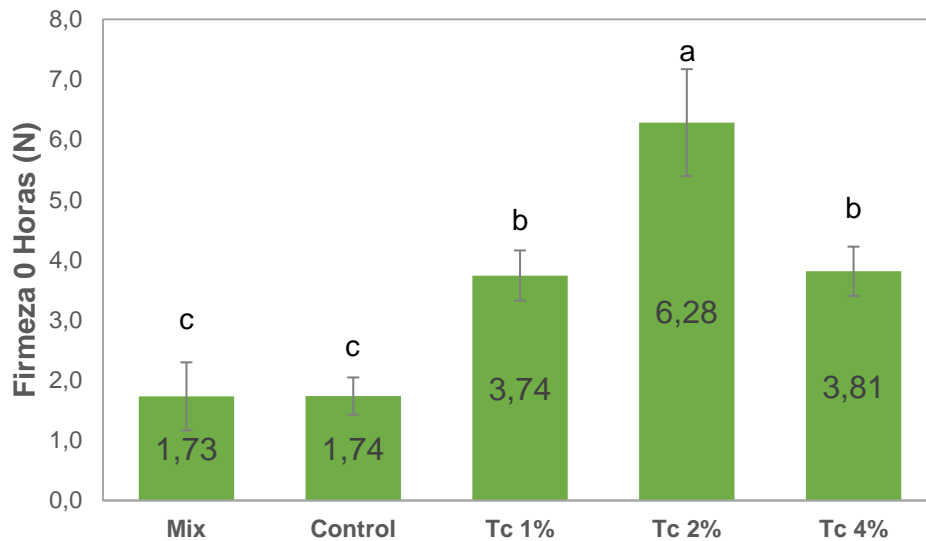


Figura 24-Valores da firmeza do pão no tempo zero para os diferentes níveis de incorporação de Tc e mix comercial. Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações ( $p < 0,05$ ).

Através da análise da Figura 24 podemos concluir que o pão Tc 2% é o que apresenta um valor superior de firmeza (6,28 N) e o mix comercial e o controlo são os que apresentam valores mais baixos de firmeza, mas não significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A adição de Tc tem impacto na textura do pão, sendo este efeito dependente do nível de incorporação de alga, pois verifica-se um aumento da firmeza face ao controlo para teores de 1% e 2% ,mas de 2% para 4% Tc há uma diminuição da firmeza do pão (6,25 N para 3,81 N). O valor de firmeza do pão com 4% Tc não é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) da do pão com 1% Tc.

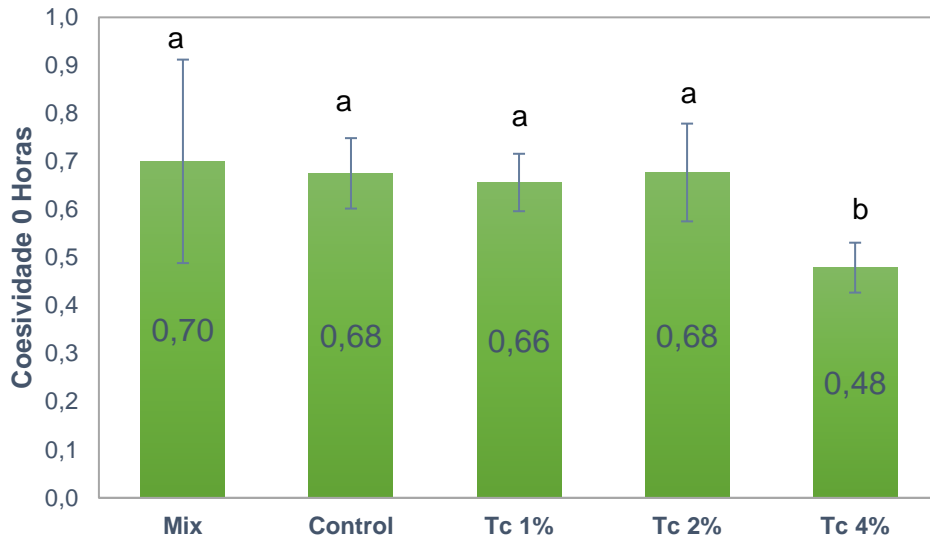


Figura 25- Valores de coesividade do pão no tempo zero para os diferentes níveis de incorporação de Tc e mix comercial. Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações ( $p < 0,05$ ).

No que diz respeito à coesividade, verifica-se que o valor mais baixo corresponde à formulação Tc 4% (0,48) e que não existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o controlo e o mix comercial. Analisando as formulações com Tc, não existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores obtidos para as formulações Tc 1% e Tc 2%, e também destas em relação ao controlo, o que demonstra que a adição de microalga não provoca um impacto significativo na coesividade.

Na figura 26, apresentam-se as fotografias das fatias de pães produzidos com diferentes níveis de incorporação de Tc, em comparação com o controlo e o mix comercial. Pode-se concluir que há uma redução do volume do pão com incorporação de 2% Tc, conforme resultados da análise de volume apresentados na Tabela 14.



Figura 196- Fatias de pães com diferentes níveis de incorporação - Mix comercial, Controlo, Tc 1%, Tc 2% e Tc 4% (da esquerda para a direita)

Os resultados de firmeza e volume obtidos no presente estudo parecem evidenciar que a microalga Tc tem um efeito desestabilizador da estrutura formada pelo amido e HPMC quando se usam níveis de incorporação de 1% e 2%, sendo este efeito mais marcado para o maior teor de alga. O volume dos pães obtidos é menor em comparação com o controlo e a firmeza aumenta, correspondente a um miolo mais compacto. Contudo, quando a Tc é usada em teores de 4%, a proteína da microalga

deverá contribuir para a estrutura, com efeito de aumento de volume e redução da firmeza da rede formada pelo amido, HPMC e proteína.

Na Figura 27 apresentam-se os resultados da análise de textura ao longo do tempo de armazenamento (0h e 48h).

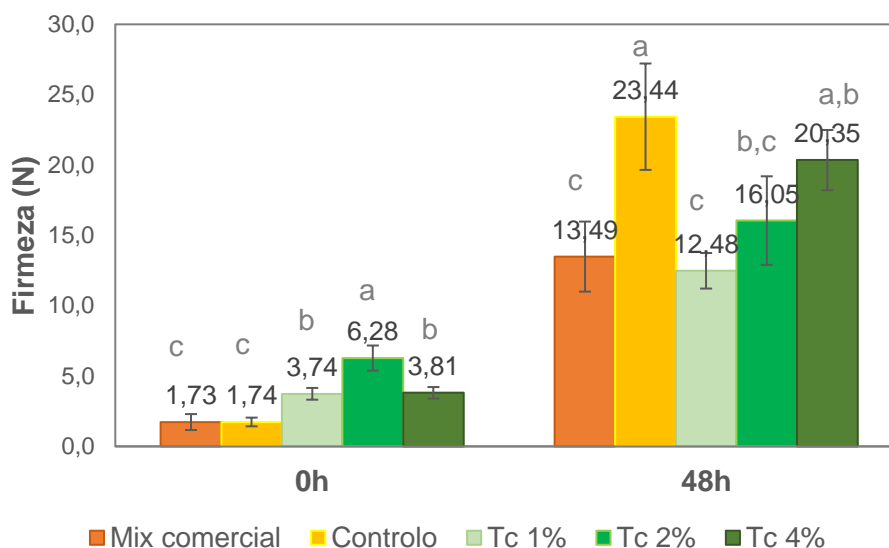


Figura 27- Evolução da Firmeza ao longo de 48 horas para as diferentes formulações com Tc, Controlo e Mix Comercial

No que diz respeito à firmeza, verifica-se como seria de esperar, um aumento ao longo do tempo de armazenamento, no tempo 48h verifica-se que o mix comercial, Tc 1% e Tc 2% apresentam comportamentos idênticos não existindo diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), enquanto que o controlo e o Tc 4% apresentam comportamentos idênticos e diferentes dos anteriores.

A adição de Tc apresenta um efeito positivo no envelhecimento do pão, já que os valores de firmeza após 48h são menores nos pães com Tc, tal facto poderá ser explicado pela capacidade de retenção de água das proteínas da alga.

Segundo alguns estudos, o amido está envolvido no processo de envelhecimento do pão, ou seja, o aumento da firmeza do miolo está relacionado com a retrogradação do amido (Gary, 2003). A humidade é outro dos parâmetros que influencia o envelhecimento, sendo que a taxa de retrogradação do amido é diretamente proporcional ao teor de humidade.

### 3.2.1.4. Cor da massa, miolo e cõdea do pão

A Figura 28 permite observar as diferenças existentes entre as várias formulações com Tc e o controlo. Na Tabela 11, resumem-se os valores dos parâmetros resultantes da avaliação instrumental da cor, obtidos para as massas não fermentadas das seguintes formulações: mix comercial, controlo e com incorporação de 1%, 2% e 4% de *Tetraselmis chuii*.



Figura 20- Diferentes massas - Controlo, Tc 1%, Tc 2% e Tc 4% (da esquerda para a direita)

Tabela 11 - Valores resultantes da análise instrumental da cor da massa, Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações

	L(%)	a*	b*	$\Delta E^*$ em relação ao controlo	$\Delta E^*$ em relação à formulação Tc
<i>Mix Comercial</i>	97,904 ± 2,022 <b>a</b>	0,609 ± 0,182 <b>a</b>	3,132 ± 1,142 <b>c</b>		
<i>Controlo</i>	77,773 ± 7,147 <b>a</b>	-0,258 ± 0,185 <b>a</b>	15,265 ± 0,915 <b>b</b>		
<i>Tc 1%</i>	36,902 ± 8,137 <b>c</b>	-8,352 ± 2,451 <b>b</b>	14,905 ± 5,792 <b>b</b>	42	
<i>Tc 2%</i>	20,923 ± 1,976 <b>d</b>	-9,305 ± 0,594 <b>b</b>	20,100 ± 0,679 <b>a</b>	58	17
<i>Tc 4%</i>	27,980 ± 3,312 <b>d</b>	-12,878 ± 1,382 <b>c</b>	22,380 ± 2,058 <b>a</b>	52	8

De um modo geral, valores de L\* mais elevados indicam uma massa mais clara. No que diz respeito aos parâmetros de cromaticidade – a\* e b\*, foi possível observar que todas as formulações apresentam uma localização espacial na zona do verde e do amarelo – que admite valores negativos para a coordenada a\*, para o parâmetro b\* estes valores apresentam valores positivos.

Realizando uma avaliação mais detalhada, no que diz respeito à luminosidade (L\*) verifica-se que o valor foi superior no mix comercial, seguido do controlo, sendo que existe diferença significativa entre estes ( $p < 0.05$ ). Analisando o a\* verifica-se que o valor é superior para o mix comercial, e para a mesma formulação no parâmetro b\* este é o

valor inferior localizando-se espacialmente na zona dos amarelos/vermelhos, como seria de esperar. As restantes formulações situam-se na zona dos verdes/ azuis

Para se saber qual o impacto da incorporação de Tc na coloração das massas, calculou-se a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) entre a amostra controlo e as amostras com Tc, usando a equação.

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

É possível verificar que a massa com 2% Tc é a que apresenta um valor superior de  $\Delta E^*$ . Também se efetuou o cálculo para a diferença de cor entre cada massa com Tc e a anterior, com menor nível de incorporação de microalga, com o objetivo de saber se o olho humano consegue detetar as diferenças de cor entre as formulações estudadas. Dado que sob condições controladas um valor de  $\Delta E$  maior ou igual a 1 é detetado pelo olho humano. (Odaira, 2011). No que diz respeito à variação de cor pode-se concluir que o Tc 2% é a formulação que apresenta maior diferença em relação ao controlo, e também em relação à formulação anterior.

Tabela 12-Valores resultantes da análise instrumental da cor do miolo, Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações

	L(%)	a*	b*	$\Delta E^*$ em relação ao controlo	$\Delta E^*$ em relação à formulação Tc
<i>Mix Comercial</i>	97,17 ± 10,95 <b>a</b>	<b>8,513 ± 0,92 a</b>	23.97 ± 2,92 <b>a,b</b>		
<i>Controlo</i>	102,59 ± 8,20 <b>a</b>	1,37 ± 0,18 <b>b</b>	19,23 ± 1,11 <b>c</b>		
<i>Tc 1%</i>	38,91 ± 4,13 <b>b</b>	-1,06 ± 0,67 <b>c</b>	16,18 ± 2,99 <b>d</b>	64	
<i>Tc 2%</i>	29,78 ± 2,99 <b>b,c</b>	-1,34 ± 0,331 <b>c</b>	27,05 ± 1,81 <b>a</b>	73	14
<i>Tc 4%</i>	25,68 ± 1,93 <b>c</b>	-0,30 ± 0,16 <b>c</b>	22,15 ± 1,13 <b>b,c</b>	77	6

Tabela 13-Valores resultantes da análise instrumental da cor da cõdea, Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações

	L (%)	a*	b*	$\Delta E^*$ em relação ao controlo	$\Delta E^*$ em relação à formulação Tc
<i>Mix Comercial</i>	93,00 ± 8,91 <b>a</b>	9,38 ± 2,20 <b>a</b>	<b>26,76 ± 3,97 a</b>		
<i>Controlo</i>	102,73 ± 10,49 <b>a</b>	9,84 ± 1,90 <b>a</b>	41,51 ± 5,46 <b>b</b>		
<i>Tc 1%</i>	35,64 ± 5,96 <b>b</b>	2,66 ± 0,58 <b>b</b>	10,00 ± 4,42 <b>d</b>	74	
<i>Tc 2%</i>	34,59 ± 15,68 <b>b</b>	0,91 ± 0,48 <b>b</b>	17,17 ± 1,57 <b>c</b>	73	7
<i>Tc 4%</i>	28,41 ± 6,52 <b>b</b>	2,04 ± 1,00 <b>b</b>	18,26 ± 2,10 <b>c</b>	78	6

No que diz respeito ao miolo, é possível verificar-se que o controlo é o que apresenta um valor mais alto para a luminosidade (L), e no que diz respeito a tonalidade ( $a^*$  e  $b^*$ ) é possível verificar-se que tal como na massa este se encontra na zona amarelos/vermelhos. Analisando as restantes formulações com Tc é possível verificar que o parâmetro L diminui com o aumento da incorporação de Tc, enquanto que o  $a^*$  vai diminuindo e o  $b^*$  aumentando face ao controlo, no entanto, não existem diferenças significativas entre estes. Especialmente e tal como se verifica no comportamento das massas não fermentadas, a cor dos pães encontra-se na zona dos verdes/ azuis. A Figura 30 também permite a visualização dos diferentes miolos e respetivas colorações.



Figura 29- Fatias de pão controlo, Tc 1%, Tc 2% e Tc4% ( da frente para trás)

Em relação à variação total de cor em relação ao pão controlo, o valor é superior no pão com Tc 4% e diferença é menor para o Tc 1%. No que diz respeito à variação total de cor em relação à formulação de Tc esta é superior na formulação Tc 2%, ou seja, é onde existe uma maior diferença de cor.

De seguida, procedeu-se à análise instrumental de cor ao nível da cõdea, de um modo geral o comportamento idêntico ao do miolo (analisando anteriormente). O mix e o controlo localizam-se numa zona espacial mais próxima dos amarelos/vermelhos, enquanto que as restantes formulações se apresentam na zona verde/azul. No que diz respeito à variação total de cor em relação ao controlo, a maior diferença de cor, como seria de esperar, diz respeito ao Tc 4%, e em relação à variação entre formulações a maior diferença diz respeito ao Tc 2%.

### 3.2.1.5. Análise do pH da massa, atividade da água, humidade, volume e perdas na cozedura do pão

A Tabela 14 apresenta um resumo dos resultados obtidos para os parâmetros atividade de água, humidade, volume e perdas na cozedura do pão. Estes parâmetros são essenciais pois estão intrinsecamente relacionados com a conservação do produto, pois tanto o  $a_w$  como a humidade se relacionam com a deterioração do produto final pois valores muito elevados podem significar um tempo de prateleira reduzido.

Tabela 14- Resultados da análise da atividade da água, humidade, volume e perdas de cozedura do pão. Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre formulações.

	pH massa	Perdas na cozedura (%)	Volume pão (cm <sup>3</sup> )	aW pão	Humidade pão
Mix Comercial	5,30 a	18,6 a	6743 b	0,941 a,b	47,7
Controlo	5,42 b	24,7 b	7008 a	0,981 a	33,0
Tc 1%	5,53 c	16,9 b	6417 c	0,925 b	28,7
Tc 2%	5,73 d	13,8 b	6120 d	0,943 a,b	28,9
Tc 4%	5,88 e	23,6 a,b	6400 c	0,932 a,b	38,1

O pH da massa, apresenta um aumento com o aumento de incorporação de Tc, sendo que o valor é mais elevado para o Tc 4%, no entanto os valores não são discrepantes, e o controlo é bastante próximo do mix comercial.

As perdas durante a cozedura, o pão que apresentou maior perda na cozedura foi o Tc 4%, enquanto que o menor foi o Tc 2%, tal facto deve se provavelmente ao elevado teor de água que a microalga retém e que posteriormente é evaporada durante a etapa de cozedura. No estudo realizado por Duarte (2018) obtiveram-se valores de perdas de cozedura de 17,5 a 19,6% com a adição de diferentes concentrações de *Chlorella vulgaris* a uma formulação de pão sem glúten, o que permite apoiar os nossos resultados. Correia *et al* (2017) realizaram um estudo onde obtiveram perdas durante a cozedura mais baixos, de cerca de 10% para pão sem glúten, no entanto este estudo não considerou nenhuma adição de microalga.

Quanto ao volume, parâmetro muito importante para a aceitabilidade do produto, observa-se que o volume do pão controlo (7008 cm<sup>3</sup>) é superior ao volume do pão com Tc. Este facto pode ser explicado pela incorporação de microalga pois esta apresenta um impacto no volume do pão, bem como na estrutura dos alvéolos do miolo. A estrutura

interna do pão com Tc provoca uma alteração ao nível da estrutura interna da massa, tal pode ser verificado no estudo realizado por Mis *et al* (2012), com conclusões idênticas através da adição de outras fontes de proteínas ao pão.

É possível verificar que os resultados obtidos na avaliação do volume dos pães estão em concordância com os resultados de firmeza dos pães. O volume diminui para níveis de 1% e 2% de Tc, acompanhado de um aumento de firmeza do pão com o aumento dos teores de alga, mas para 4% Tc verifica-se o aumento de volume, acompanhado da redução de firmeza do pão.

A atividade da água ( $a_w$ ) de todas as amostras é elevada, próxima de 1, sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), ou seja, a adição de Tc não apresenta qualquer impacto para a atividade da água. Segundo Correia *et al* (2007) obteve valores de  $a_w$  idênticos (0.91) e segundo a literatura a atividade de água do pão sem glúten é de 0,96, portanto pode-se concluir que os resultados obtidos estão dentro dos valores estipulados.

Relativamente aos valores de humidade do pão, obtivemos valores elevados, no entanto, estes não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Comparativamente com o estudo de Duarte (2018), verificamos que a humidade presente no nosso estudo é inferior

### 3.3. Análise Sensorial

A prova de análise sensorial foi realizada aos pães com incorporação de 1% e 4% (m/m) de Tc e ao Controlo. Na Figura 30 estão apresentadas as amostras e os códigos de identificação utilizados.



Figura 30- Amostras para a realização de prova sensorial

Para a realização desta prova foi utilizado o modelo de ficha que avalia os atributos de cor, aroma, sabor, textura, intenção de compra e apreciação global

apresentada no Anexo I. A representação gráfica da figura 39 apresenta os resultados da análise sensorial efetuada às três amostras de pão selecionadas de acordo com os atributos considerados.

A prova foi realizada com recurso a um painel de 32 provadores não treinados, cujo faixa etária variou dos 16 aos 65 anos. No entanto, nenhum destes provadores era doente celíaco ou consumia diariamente produtos sem glúten.

A representação gráfica da Figura 31 apresenta os resultados da análise sensorial efetuada às três amostras de pão selecionadas de acordo com os atributos considerados.

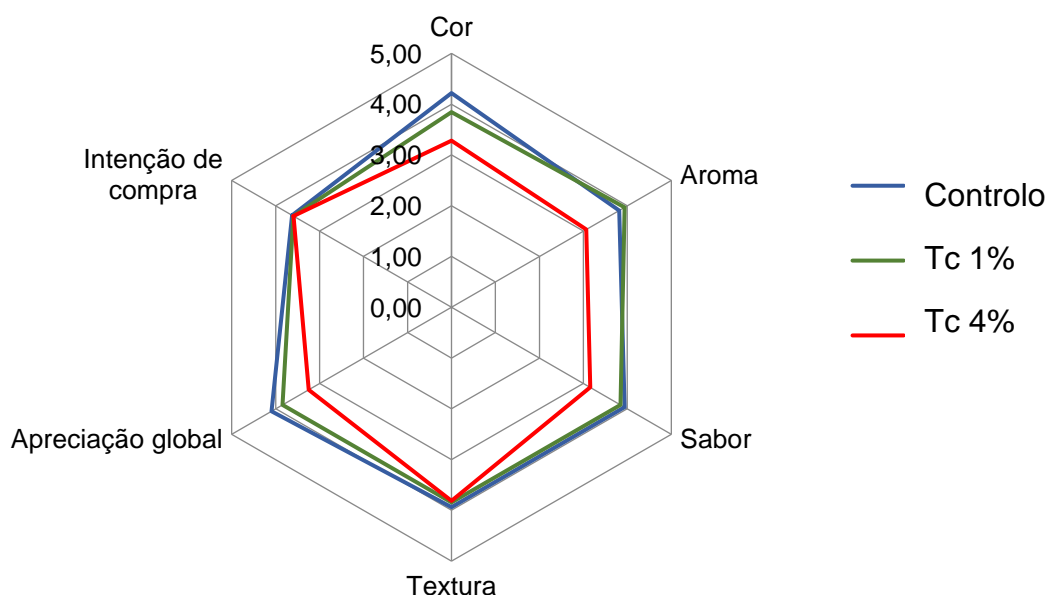


Figura 31-Respostas dos provadores do painel sensorial (n = 32) em relação ao pão controle e aos pães com Tc 1% e Tc 4%.

Assim, observa-se que o pão com incorporação de Tc 1% obteve uma classificação superior ao pão com Tc 4%, assemelhando-se ao pão controle. Quanto ao atributo da apreciação global, os pães com Tc 4% tiveram uma classificação de 3 (indiferente) enquanto que o pão Tc 1% e o controle obtiveram uma classificação de 4 (agradável). Quanto ao atributo da textura, os três pães obtiveram a mesma classificação de 4 valores (agradável). Relativamente à intenção de compra, os provadores transmitem que não sabem se comprariam (3 valores).

Aos provadores, foi pedido que após a degustação das 3 amostras, e tendo em conta os distintos parâmetros em estudo, que ordenassem por grau de preferência de

modo a perceber qual o produto com mais aceitação por parte do consumidor. Assim, a amostra com Tc 1% foi a preferida pelos consumidores (37,5), seguida do controlo (34,4%) e, por último, a Tc 4% (28,1%).

Concluindo, os resultados obtidos na prova mostraram que os produtos teriam uma aceitação no mercado. De um modo geral, todos os parâmetros foram considerados agradáveis para o consumidor. Alguns dos provadores inicialmente estavam receosos de degustarem o produto pela cor, e pelo produto propriamente dito, e muitos ficaram surpreendidos pela globalidade, a amostra de pão com concentração superior foi a que mais impacto causou pelo seu aroma distinto das restantes, uma vez, que o grau de intensidade é superior o público não está habituado a esta tipologia de produtos alimentares.

Através da prova pode perceber que o produto poderia ser integrado num mercado, no entanto, a sua intensidade teria de ser inferior a 4% de incorporação e apesar de ser um produto diferente do habitual, o consumidor adquiriria para uma ocasião específica.

## Conclusões



A realização da presente dissertação permitiu verificar que a incorporação da microalga *Tetraselmis chuii* originou pães com características tecnológicas e sensoriais desejáveis.

Nos estudos iniciais de desenvolvimento da formulação controlo, verificou-se que o tempo de amassadura e o binómio tempo/temperatura têm impacto na firmeza dos pães. A adição de HPMC favorece o aumento de volume e aumenta a firmeza e a coesividade dos pães, concluindo-se que este espessante melhora a estrutura do pão e torna o miolo mais macio. Nesta etapa do estudo o pão que revelou as melhores características foi o pão com 10 min de amassadura, cozedura a 180°C durante 60 min e 2,4% de HPMC.

O estudo do comportamento reológico durante a amassadura, permitiu concluir que a capacidade de absorção de água da mistura de farinhas não foi alterada com a incorporação de proteína de microalga, ou seja, a Tc não provocou um impacto na consistência da massa (valores de torque).

Em relação aos estudos de avaliação do impacto da incorporação de microalga nas propriedades físicas das massas e pães, conclui-se que a sua adição provoca um aumento de firmeza das massas comparativamente ao controlo. No caso do pão verifica-se um aumento da firmeza para níveis de 1% e 2% Tc, acompanhado da redução de volume dos pães. Contudo, para 4% Tc, verifica-se um efeito positivo da adição de biomassa microalgas, com redução de firmeza e aumento de volume do pão. Tal será devido ao papel das proteínas da *Tetraselmis chuii* na formação da estrutura do material, conjuntamente com o amido e o HPMC.

Ao nível de cor, conclui-se que com a adição de Tc os pães adquirem uma cor mais verde escura, o que seria de esperar devido à cor desta microalga.

Sensorialmente, o produto foi considerado agradável para os diversos parâmetros em estudo, e a população em estudo admite que o compraria. A formulação com Tc 1% foi a que apresentou a maior aceitação e preferência pelo painel.

Esta microalga apresenta, assim, um impacto positivo a nível nutricional pois permite o aumento do conteúdo de proteína e minerais a um produto sem glúten. Em simultâneo, permite utilizar uma microalga, cuja produção é sustentável. De um modo geral, esta não apresenta impacto negativo na estrutura do pão sem glúten em estudo, o efeito depende do nível de concentração e a nível sensorial é positivo.

Dadas todas as conclusões do presente estudo seria benéfico a aprovação desta microalga para utilização em produtos de panificação.

O produto final, destaca-se por um elevado potencial nutritivo, facilitando a ingestão de nutrientes em maior quantidade na dieta de uma população, contribui também para um estilo de vida mais saudável, além de ser uma opção alimentar segura para a população celíaca.

Futuramente, esta dissertação poderá contribuir para o seguimento do estudo de desenvolvimento de produto, análise de biodisponibilidade de nutrientes, melhoria tecnológica, e a sua comercialização.

## Referências Bibliográficas



- Alvelos, H.M.(2002), *Análise, Desenvolvimento e Teste de Métodos e Técnicas para Controlo Estatístico em Análise Sensorial*, Universidade do Porto, pp 1-50 e 81-94
- Anton, A., Artifield, S.(2008). *Hydrocolloids in gluten breads: a review*.Internacional Journal of Food Sciences and Nutrition.pp 11-23.
- Algatec : <http://algatec.eu/microalgas>. Acesso em Janeiro de 2018.
- APC. Associação Portuguesa de Celíacos (2018). Disponível em <http://www.celiacos.org.pt/>. Acesso em: 10 de Julho de 2018.
- Atwell, W. A.(2001). *Wheat Flour*. Eagen Press Handbook Series. American Association of Cereal Chemists, 1ed.
- Baking Quality AACC International Method 10-05.01., (2001), Guidelines for Measurement of Volume by rapseed Displacement, pp. 1-4.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Nunes, M. C., Franco, J. M., & Raymundo, A., (2008), *Microalgae biomass as a novel functional ingredient in mixed gel systems*. P. A. Williams, & G. O. Phillips.Gums and stabilizers for the food industry: Vol. 14, pp. 487–494. Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Barnes, H.A., Hutton, J.F., Walters, K. (1989). *An introduction to rheology. Rheology Series (NL). Vol. 3.* (Elsevier Science, Ed.). Amsterdam (NL).
- Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., Raymundo, A. (2013). *Comparison of microalgal biomass profiles as a novel functional ingredient for food products, Algal Research 2*, pp. 164–173
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., (2009), *Food Chemistry*. Springer,4 Ed,pp. 724.
- Bernaerts, T. M.M, et al., (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, vol.25, pp. 452–463
- Bourne, M. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Press.
- Castro, A., (2003), *A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos (Ciência e Técnica)* Lisboa. pp. 15-61.
- Carli, E. M. De, Trevisan, R. M., & Gardin, G. (2015). *Utilização de farinha de chia (Salvia*

- hispânica L.) na elaboração de pão sem glúten de goma e gordura. Universidade Federal De Santa Maria.*
- Carini, E., Scazzina, F., Curti, E., Fattori, F., Mazzeo, T., Vittadini, E., (2015), *Physicochemical, sensory properties and starch in vitro digestion of gluten-free breads*. Int J Food Sci Nutr, vol. 66, pp. 867–872.
- Catassi C., Fasano A., (2008), *Celiac disease. Gluten-free cereal products and beverages*, California: Elsevier, Academic Press, pp 6–8.
- Correia, P., Fonseca, M., Batista, L., Guiné, R., (2017), *Production of a new gluten-free bread and comparison with a regular wheat bread*. International Congress on Engineering. Universidade da Beira Interior.
- Coutteau, P. (n.d.). *MICRO-ALGAE* (pp. 7–48). Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center University of Gent, Belgium.
- Du Pont, (2018), Big gluten-free bread is a matter of timing. Disponível em: <http://www.danisco.com/food-beverages/bakery/gluten-free/videos/#c27412>. Acesso em: Junho de 2018.
- Duarte, J. (2018). *"Desenvolvimento de pão sem glúten enriquecido com Chlorella vulgaris"*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa
- EFSA. European Food Safety Authority (2015). *Safety of a change in specifications for the food additive hydroxypropyl methyl cellulose (E 464)*. EFSA Journal
- Elisena A. G. Seravalli e Eliana Paula Ribeiro. (2007). *Química de Alimentos*. Editora Blucher. 2ª Ed. 194 páginas.
- Enzing, A. C., Ploeg, M., & Barbosa, M. (2014). *Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe*. <https://doi.org/10.2791/3339>
- Estevão, E. (2014). *Introdução à análise sensorial*. Departamento de engenharia alimentar. Universidade do algarve.
- FAO: <http://www.fao.org/3/W3732E/w3732e07.htm>. Acesso em Junho de 2019.
- Fradique, M., Batista, AP., Nunes, MC., Gouveia, L., Bandarra, NM., Raymundo, A., (2010), *Incorporation of Chlorella vulgaris and Spirulina maxima biomass in pasta*

- products. Part 1: preparation and evaluation.* J Sci Food Agric, vol. 90, pp. 1656–64.
- Gary, J.A., Bemiller, J.N., (2003), *Bread Staling: Molecular Basis and Control.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol.2.
- Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., Raymundo, A., (2018), *Impact of Chlorella vulgaris on the rheology of wheat flour dough and bread texture.* Food Science and Technology, vol.89, pp. 466-474.
- George,A. (2007).*Safety assessment of hydroxypropylmethcellulose as a food ingredient.*Food and Chemical Toxicology.vol45, pp 2341-2351.
- Grundas, S., Dziki, D., Laskowski, J., & Mis, A. (2012). *Use of farinograph measurements for predicting extensograph traits of bread dough enriched with carob fibre and oat wholemeal, 108,* 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.007>
- Gulsum,M et al (2016).*Effect of quinoa flour on gluten-free bread batter rheology and bread quality.*Journal of Cereal Science,vol 69, pp174-181.
- Heller, L.(2009) *Commercial aspects of gluten-free products. In: Gallagher, E.Gluten-free Foods Science and Technology.* Wiley-Blackwell Publishing, Oxford., pp. 99-106.
- Horstmann, S. ; Lynch, K.e Arendt, E. (2017). *Starch Characteristics Linked to Gluten-free Products..School of Food Nutritional Science, University College Cork, Ireland.*
- INE. Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016. Ed 2017.
- ISO (1992) ISO 5492: Sensory analysis – Vocabulary, 1a Ed., International Organization for Standardization.
- ISO (2003) ISO 13299: Sensory analysis – Methodology – General Guidance for establishing a sensory profile, 1st Ed., International Organization for Standardization.
- ISO (2005) ISO 6658: Sensory analysis – Methodology – General Guidance, 2a Ed., International Organization for Standardization.
- Instruments, P. (2017). *micro-doughLAB 2800- Installation and Operation Manual.* (©2017 Perten Instruments of Australia Pty Limited & Perten, Eds.) (©2017 Pert).

- Mancebo, C. M., Miguel, M. A. S., Martinez, M. M., & Gomez, M., (2015), *Optimisation of rheological properties of gluten-free doughs with HPMC, psyllium and different levels of water*. Journal of Cereal Science, vol. 61, pp. 8 e 15.
- Mis, A., Grundas, A., Dziki, D., & Laskowski, J., (2012), *Use of farinograph measurements for predicting extensograph traits of bread dough enriched with carob fibre and oat wholemeal*. Journal of Food Engineering, vol. 108, pp. 1–12.
- Mohammed, I., Ahmed, A. R., & Senge, B., (2012), *Dough rheology and bread quality of wheat- chickpea flour blends*. Industrial Crops and Products, vol. 36, pp.196–202.
- Motta, C. (2015). *Pseudocereais como Ingredientes de Formulações Destinadas a uma Alimentação Especial*. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto.
- Nascimento, K.; Barbosa, M.; Takeiti, C., (2012), *Doença Celíaca: Sintomas, Diagnóstico e Tratamento Nutricional*. Revisão de literatura. Saúde em Revista.
- Ngemakwe, P.H., Roes-Hill, M.L., Jideani, V.A., (2014), *Advances in gluten-free bread technology*. Food Science and Technology International, vol. 21(4), pp. 256–276.
- Odaira, Chikayuki, Itoh, Ishibashi, (2011), *Clinical Evaluation of a Dental Color Analysis System: The Crystaleye Spectrophotometer?* Journal of Prosthodontic Research, vol. 55 , pp. 199-205. Japan Prosthodontic Society.
- Pérez, et al, (2013). Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food
- Pinheiro, R. (2016). *enriquecimento do pão sem glúten com farinha de leguminosas- Propriedades nutricionais, de textura e sensoriais*. Revista Tecnoalimentar. Ed 6. 2183-3338.
- Prata, J. C. (2016). *Avaliação da toxicidade do antibiótico doxiciclina isoladamente e na presença de microplásticos na microalga marinha Tetraselmis chuii*. Universidade do Porto - Instituto de Ciências Médicas Abel Salazar.
- Raymond N, et al. (2006). *The gluten-free diet: an update for health professionals*. Practical Gastroenterology 30:67-92
- Sciarini, L., Pérez, G., Lamballerie, M., et al.. (2012). *Incorporation of several additives into gluten free breads: Effect on dough properties and bread quality*. Food Bioprocess Technol. 5: 1724–1732.

- Schmidt, S.J., (2007). Water mobility in foods. In: Barbosa-Canovas, G.V., Schmidt, S.J., Labuza, T.P. (Eds.), *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA.
- Silva, A. *O Livro do Pão sem Glúten*. Manuscrito. 1ª ed. 2018. 200 páginas.
- Silva, J. (2014). *Desenvolvimento de Mixes de Panificação Isentos de Glúten a partir de subprodutos alimentares*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia.
- Sousa, I., (2001), *A Reologia dos Produtos Alimentares*. Reologia e suas Aplicações Industriais, pp. 131-157, Gomes de Castro, A., Covas, J.A., Diogo, A.C. Instituto Piaget, Lisboa.
- UE (1997). Regulamento (CE) No 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997 sobre novos alimentos e novos ingredientes alimentares.
- UE (1997a). Regulamento (CE) No 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997 sobre novos alimentos e novos ingredientes alimentares.
- UE (2015). Regulamento (CE) No 2283/2015 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Novembro de 2015 relativo a novos alimentos.
- X-Rite. (2007). *A Guide to Understanding Color Communication*. 26 páginas.
- Wang, K., Lu, F., Li, Z., Zhao, L., & Han, C. (2017). *Recent developments in gluten-free bread baking approaches : a review*, 37, 1–9.

## Anexos



## ANEXO I

### Ficha de Prova de Análise Sensorial

Código da amostra:

Assinale com um X a classificação que acha mais adequada para cada atributo.

#### Cor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

#### Aroma

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

#### Sabor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

#### Textura

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

#### Apreciação global

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

#### Intenção de compra

- Compraria de certeza
- Provavelmente compraria
- Não sei se compraria
- Provavelmente não compraria
- Não compraria de certeza

**Observações:**

### Análise comparativa das amostras

Ordene as amostras por ordem de preferência:

\_\_\_\_\_   
Gostei menos

\_\_\_\_\_   
Gostei mais

**Observações:**