



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

INFLUÊNCIA DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS (α -AMILASE, XILANASE, GLUCOSE-OXIDASE E FOSFOLIPASE) NOS PARÂMETROS REOLÓGICOS DE FARINHAS DE TRIGO PANIFICÁVEIS

por

Sofia Amorim Ramalho

Setembro 2016



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

INFLUÊNCIA DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS (ALFA-AMILASE, XILANASE, GLUCOSE-OXIDASE E FOSFOLIPASE) NOS PARÂMETROS REOLÓGICOS DE FARINHAS DE TRIGO PANIFICÁVEIS

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Inovação

Local: Germen, Moagem de Cereais, S.A.

Orientação Germen: Engenheira Ema Dias

Tutoria ESB-UCP: Professora Doutora Manuela Pintado

Setembro 2016

RESUMO

A adição de enzimas à farinha para melhorar o seu desempenho e originar um pão com melhores características, tem mais de um século e é uma área em contínuo desenvolvimento. As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores para acelerar reações específicas, e, sendo produzidas por plantas, animais e microrganismos, são ingredientes naturais não tóxicos, posicionando-se como um interessante substituto dos aditivos químicos.

Este relatório faz um enquadramento ao tema e revê a literatura existente que suportou o estudo desenvolvido durante o estágio curricular no âmbito do Mestrado em Biotecnologia e Inovação. Neste estudo foi analisado o efeito de 4 enzimas (α -amílase, xilanase, glucose-oxidase e fosfolipase) em ensaios independentes, nos parâmetros reológicos de uma farinha estreme de trigo e nas características do pão, usando 3 concentrações diferentes para cada uma delas. A necessidade desta análise detalhada prende-se com o facto de que, na maior parte dos casos, são adicionadas à farinha um conjunto de enzimas e não apenas uma, sendo importante analisar o seu efeito individual, para eventualmente se poderem otimizar formulações de farinha para o fabrico de pão.

As enzimas têm a capacidade de provocar alterações diversas no pão, nomeadamente um aumento de volume, melhoria da cor da crosta e estrutura do miolo, maciez, reforço do sabor e adiamento dos processos de envelhecimento. Ainda que estes efeitos tenham sido verificados na prática, a causa e as reações envolvidas não estão ainda totalmente explicadas, uma vez que se tratam de reações bioquímicas acopladas complexas, que envolvem simultaneamente vários componentes dos ingredientes usados habitualmente para o fabrico de pão. Assim, tendo em conta os resultados obtidos, como trabalho futuro seria interessante vir a estudar o efeito da combinação das enzimas estudadas e valorizar as potenciais sinergias.

O trabalho realizado permitiu concluir quais os parâmetros que são mais afetados com a variação da concentração das enzimas tendo-se verificado que a variação da concentração da Amílase é a que vai afetar mais características reológicas da farinha; no que diz respeito ao volume do pão verificou-se que a enzima cuja variação da concentração mais afeta este parâmetro é a Xilanase, concluindo-se que um aumento da concentração desta enzima irá influenciar positivamente o volume do pão.

Palavras-chave: Farinha de trigo, pão, enzimas, α -amílase, glucose-oxidase, xilanase e fosfolipase.

ABSTRACT

The use of enzymes in baking processes – which are added to the flour in order to improve its performance and produce bread with better characteristics –, is more than a century old and it is an area of continuous development. Enzymes are proteins that act as catalysts to speed up specific reactions, without being themselves modified in the process. While being produced by plants, animals or microorganisms, they are natural ingredients which can be interesting replacers of chemical additives.

This work contextualizes the theme and reviews the existing literature supporting the study developed during the MSc in Biotechnology and Innovation curricular internship. In this study, the effect of 3 different concentrations of 4 enzymes (α -amylase, xylanase, glucose-oxidase and phospholipase) on the rheological parameters of the wheat flour and in bread characteristics, in independent assays will be analyzed. The need of this analysis is due to the fact that in most cases it is usually added to the flour a set of enzymes, rather than just one, being important to verify its individual effect to eventually be able to optimize flour formulations used for bread making.

Enzymes have the capacity to cause diverse modifications in bread, like an increase in its volume, improvement in the crust color and in the crumb structure, softness, flavor enhancement and a delay in the staling process. Even though these effects were seen in practice tests, the cause and the reactions behind these results are not yet completely explained, since they are complex and coupled biochemical reactions that imply simultaneously many components of the ingredients typically used in bread making. So, regarding the results of the study, as future work it would be interesting to analyze the effect of the combination of these enzymes and value this potential synergy.

The study concluded which parameters are most affected by varying the concentration of the enzymes. It was found that the variation of the concentration of amylase was the one that will affect more rheological characteristics of flour. With respect to the bread volume it was found that the enzyme which concentration variation most affects this parameter is xylanase, concluding that an increased concentration of this enzyme will positively influence the bread volume.

Key-words: Wheat flour, bread, enzymes, α -amylase, glucose-oxidase, xylanase, phospholipase.

AGRADECIMENTOS

A todos os que de alguma forma contribuíram para a concretização deste projeto, deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.

À Germen, a possibilidade de realização deste estágio e por me ter facultado todos os meios necessários para a sua execução.

À equipa da Germen, junto de quem trabalhei – Adelino, Ana Maria, Liliana e Sandra – pela disponibilidade e importantes ensinamentos para a realização da parte prática do estudo.

À Engenheira Ema Dias pelo seu auxílio e partilha de conhecimento e experiência durante todo o desenvolvimento do projeto, bem como ao Engenheiro Renato Vaz pela sua ajuda no tratamento dos dados.

À professora Dr^a Manuela Pintado pela sua orientação científica e ajuda prestada na realização deste relatório.

À professora Dr^a Ana Gomes, pelo suporte e acompanhamento ao longo de todo o curso de mestrado.

E, por fim, um agradecimento especial aos meus pais e irmão por estarem sempre presentes com o seu incentivo e apoio incondicional.

A todos estou profundamente grata pelo desenvolvimento pessoal e profissional que este projeto me proporcionou.

ÍNDICE

RESUMO	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMENTOS	7
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O pão.....	17
2.1.1 Enquadramento	17
2.1.2 Ingredientes	17
2.1.2.1 Farinha de trigo.....	17
2.1.2.1.1 Processo de moagem	18
2.1.2.1.2 Constituintes relevantes da farinha de trigo	19
2.1.2.1.2.1 Amido.....	19
2.1.2.1.2.2 Polissacarídeos não amiláceos	20
2.1.2.1.2.3 Proteínas	21
2.1.2.1.2.4 Lípidos	22
2.1.2.2 Água	24
2.1.2.3 Sal	24
2.1.2.4 Levedura.....	24
2.1.2.5 Outros ingredientes	25
2.1.3 Processo de fabrico	25
2.1.4 Parâmetros de qualidade	26
2.2 Enzimas em panificação	27
2.2.1 Enquadramento	27
2.2.2 Função	27
2.2.2.1 α -amílase	28
2.2.2.2 Glucose-oxidase	30
2.2.2.3 Xilanase	31
2.2.2.4 Lipase	32
3. OBJETIVOS DO TRABALHO	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Delineamento experimental.....	37
4.2 Ensaio prévios à resolução do trabalho prático	37
4.3 Materiais	38
4.3.1 Preparação das amostras	38
4.3.2 Ensaio de laboratório.....	38
4.3.3 Ensaio de padaria	39

4.4	Métodos	39
4.4.1	Ensaio de laboratório	39
4.4.1.1	Determinação da humidade	39
4.4.1.2	Ensaio Farinográfico	40
4.4.1.3	Ensaio Alveográfico	41
4.4.2	Ensaio de Padaria	42
4.4.2.1	Fabrico do pão	42
4.4.2.2	Determinação do volume específico	43
4.4.2.3	Outras determinações: cor da crosta e estrutura do miolo	43
4.4.2.4	Análise estatística	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Ensaio de laboratório	45
5.2	Ensaio de Padaria	49
5.2.1	Volume específico	49
5.2.2	Outras determinações: cor da crosta e estrutura do miolo	51
5.2.2.1	Cor da crosta	51
5.2.2.2	Estrutura do miolo	52
6.	CONCLUSÃO	53
7.	APÊNDICES	55
8.	REFERÊNCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Representação esquemática do planeamento geral do trabalho prático.	37
Figura 5.1 - Gráfico com os valores da tenacidade (P) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.	45
Figura 5.2 - Gráfico com os valores da extensibilidade (L) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.	46
Figura 5.3 - Gráfico com os valores da força (W) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.	46
Figura 5.4 - Gráfico com os valores do equilíbrio da curva (P/L) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.	47
Figura 5.5 - Gráficos com os valores de absorção de água obtidos pelo método farinográfico para cada uma das amostras.	47
Figura 5.6 - Gráfico com os valores de estabilidade obtidos pelo método farinográfico para cada uma das amostras.	48
Figura 5.7 - Gráfico com os valores de volume específico do pão obtidos para cada amostra.	49
Figura 5.8 - Pães elaborados com farinha aditivada com α -amílase.	50
Figura 5.9 - Pães elaborados com farinha aditivada com xilanase.	50
Figura 5.10 - Pães elaborados com farinha aditivada com glucose-oxidase.	50
Figura 5.11 - Pães elaborados com farinha aditivada com fosfolipase.	50
Figura 5.12 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com amílase.	51
Figura 5.13 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com xilanase.	51
Figura 5.14 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com glucose-oxidase.	52
Figura 5.15 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com fosfolipase.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Concentração das enzimas utilizadas na preparação de cada amostra de farinha.	38
Tabela 4.2 - Etapas do método alveográfico (Chopin, 2006).....	41
Tabela 5.1 - Coeficientes de correlação ensaios de laboratório.	48
Tabela 5.2 - Coeficientes de correlação ensaios de padaria.	51

1. INTRODUÇÃO

O trabalho que me proponho apresentar tem como tema “Influência de atividades enzimáticas (α -amilase, xilanase, glucose-oxidase e fosfolipase) nos parâmetros reológicos de farinhas de trigo panificáveis”. Insere-se no âmbito do estágio para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia e Inovação e decorreu na empresa Germen – Moagem de Cereais, S.A.

A Germen é uma das maiores empresas de moagem de cereais em Portugal, fundada em 1991 da fusão entre duas moageiras – Companhia Aveirense de Moagens e Sociedade Fomento Industrial –, estas com origem em estabelecimentos existentes já no séc. XIX. Está implementada em Matosinhos, no Norte do país, com 3 linhas de transformação de cereais completamente independentes sendo os seus principais produtos: farinha de trigo, farinha de centeio e farinha de arroz, farinha de trigo e arroz para alimentação infantil, farinhas compostas e sêmeas. A empresa possui um laboratório interno, acreditado segundo a norma NP EN ISO 17025, onde é feito o controlo de qualidade de matérias-primas e produtos finais, e tem o seu Sistema de Qualidade e Segurança Alimentar certificado segundo os referenciais ISO 9001:2008, ISO 22000:2005 e BRC Food Issue 7, para além de licença ambiental desde 2008.

Por forma a desenvolver o trabalho foi relevante realizar um levantamento, cientificamente suportado, da situação atual de inovação quanto à utilização de enzimas na melhoria de qualidade das farinhas, e consequentemente nas características do pão, tema que será desenvolvido ao longo deste trabalho.

O pão é dos alimentos mais comuns e tradicionais no mundo. A qualidade da farinha de trigo, ingrediente base no fabrico do pão, é influenciada quer por fatores inerentes ao próprio cereal, quer por fatores relacionados com o processo de armazenamento e moagem do grão em farinha.

A exigência cada vez maior por parte dos consumidores que procuram produtos naturais e de máxima qualidade, criou a necessidade na indústria de complementar a farinha com ingredientes que lhes permita atingir esses requisitos de qualidade.

Há anos que as enzimas são um ingrediente muito usado em panificação, tendo vindo a assumir uma importância crescente pelas restrições que têm surgido ao uso de aditivos químicos. Atualmente são usadas diversas preparações comerciais de enzimas como agentes melhoradores da farinha e do pão. Apesar de a sua atuação incluir processos ainda não totalmente explicados, sabe-se que as enzimas têm um papel determinante na obtenção de produtos de padaria com a qualidade desejada. Os efeitos com maior impacto no pão incluem: melhor sabor, maior volume, aumento do tempo de prateleira e uma aparência geral mais atrativa.

Através da aplicação do conhecimento científico podemos desenvolver melhorias nos processos de fabrico de pão, originando produtos de qualidade superior com maior retorno económico para os produtores. Assim, com este trabalho, pretende-se compreender qual o efeito individual de cada enzima selecionada para o estudo, quer na farinha, quer no pão, e estimar qual a concentração mais apropriada a utilizar, uma vez que uma quantidade excessiva de enzima pode não ter impacto esperado ou pode mesmo até ser contraproducente.

Uma vez que as enzimas podem ter efeitos sinérgicos, como trabalho futuro propõe-se estudar os efeitos dessa sinergia e perceber se pode haver vantagens ao combinar determinadas enzimas em detrimento de outras.

Este trabalho por outro lado permitiu-me adquirir competências e conhecimentos ao nível da investigação e desenvolvimento associados à produção de farinhas, farinhas corrigidas e farinhas compostas, enquadrada numa organização agroalimentar em crescimento.

Além do projeto de estudo realizei outras atividades de apoio ao trabalho desenvolvido na empresa, nomeadamente:

- Atualização de fichas técnicas de produto;
- Atualização dos dados relativos aos resultados do circuito interlaboratorial que a Germen promove.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da bibliografia aborda o papel das enzimas no fabrico do pão. Serão, no entanto, primeiramente desenvolvidos conceitos básicos para a compreensão do tema, fazendo-se um enquadramento geral no que diz respeito ao processo e ingredientes mais comumente usados.

Assim, este capítulo está dividido em 2 partes. Na primeira parte é discutida a importância e o papel do pão na sociedade atual, sendo igualmente feito um enquadramento histórico da sua evolução. Nesta secção apresenta-se ainda individualmente os ingredientes-base usados habitualmente no fabrico do pão, dando-se especial destaque para a farinha de trigo com uma descrição mais detalhada dos seus constituintes e a interferência de cada um no processo e nas características do pão. Na segunda parte, discute-se a utilização das enzimas como auxiliares na panificação, dando-se destaque às utilizadas na parte experimental do trabalho: α -amílase, glucose-oxidase, xilanase e fosfolipase.

2.1 O pão

2.1.1 Enquadramento

O desenvolvimento do processo de fabrico de pão foi um acontecimento importante para a humanidade, e após a mecanização agrícola no século XIX, com o aumento da qualidade e redução do preço, este tornou-se um alimento acessível a praticamente toda a população (Miguel *et al.*, 2013). A arte de fabrico de pão remonta a 4000 anos atrás, ainda que não na mesma forma que o conhecemos hoje, e tem sido um alimento popular de primeira necessidade há muito tempo (Gellynck *et al.*, 2009).

As técnicas de produção e os tipos de pão variam à volta do mundo (Dewettinck *et al.*, 2008), originando produtos com grandes diferenças que advêm das farinhas usadas localmente, dos métodos de produção e das próprias expectativas dos consumidores (Popper *et al.*, 2006). Os ingredientes base são: farinha de cereais, água, levedura ou outro agente levedante e sal, podendo ser adicionados outros ingredientes para melhorar o seu processamento ou originar novos produtos (Dewettinck *et al.*, 2008).

2.1.2 Ingredientes

2.1.2.1 Farinha de trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um cereal cultivado em todo o mundo e pertence à família das gramíneas *Poacea* (Martins *et al.*, 2012). Existem 30.000 variedades de trigo de 14 espécies em todo o mundo, no entanto apenas cerca de 1.000 têm significado comercial (Posner *et al.*, 2011). É uma planta cultivada durante o inverno e primavera, de ciclo anual. O grão de trigo, depois de processado, pode ser destinado ao consumo humano sob várias formas – pão, massa alimentícia, bolos ou biscoitos – podendo servir para ração animal se for de qualidade mais baixa. O trigo é a segunda maior cultura de cereais no mundo, atrás do milho, sendo os maiores produtores a UE, EUA, China, Índia, Rússia e Canadá (Martins *et al.*, 2012).

A predominância do trigo no mundo é devida principalmente à sua ampla distribuição e extensa utilização para produtos de padaria e pastelaria (Barak *et al.*, 2015).

Em traços gerais, o grão de trigo é constituído pelo farelo (13-17%), pelo gérmen ou embrião (2-3%) e pelo endosperma (81-84%) (Barak *et al.*, 2015). O endosperma divide-se em endosperma

amiláceo (70-80%) e a camada aleurona, que é constituída por apenas uma camada de células e é rica em proteína, contendo também gordura, enzimas e vitaminas; a camada aleurona é considerada como parte do farelo sendo a fonte de farinha o endosperma amiláceo (Belitz *et al.*, 2004).

O principal destino do trigo são as indústrias de moagens, pois este é o principal cereal usado para o fabrico de pão. A farinha é o produto final mais importante da moagem do trigo, usada para panificação e pastelaria, bem como para usos culinários caseiros (Prikhodko *et al.*, 2009).

De acordo com a Portaria nº 254/2003 de 19 de Março, farinha é o “produto resultante da moenda de grãos de um ou mais cereais, maduros, são, não germinados e isentos de impurezas, bem como da sua mistura”. As farinhas designam-se de farinhas corrigidas quando lhes são adicionados outros ingredientes, aditivos e auxiliares tecnológicos com o objetivo de garantir a sua estabilidade funcional e farinhas compostas, quando além destes são ainda adicionados outros aditivos permitidos para os produtos finais a cujo fabrico se destina a farinha (Portaria 254/2003).

Determinadas características da farinha de trigo – como a boa capacidade de absorção de água e o alto teor de proteínas que levará à formação de uma boa rede de glúten com boas propriedades viscoelásticas – são fundamentais para o desenvolvimento de uma massa com boa elasticidade, consistência e com boa capacidade de retenção de gás durante a fermentação, levando a um aumento do volume do pão, o que origina neste uma estrutura firme e uniforme (Martins *et al.*, 2012).

A qualidade da farinha de trigo é influenciada não só por fatores inerentes ao próprio trigo – composição genética e condições de crescimento da planta – mas também por aqueles que estão relacionados com o processo de armazenamento e moagem do cereal em farinha (Queji *et al.*, 2006) – estima-se que 25% da qualidade da farinha é determinada pela tecnologia da moagem, o ajuste do moinho e as condições ambientais do processo e 75% pela qualidade do trigo (Posner *et al.*, 2011).

2.1.2.1.1 Processo de moagem

Antes da receção, são testadas amostras em laboratório para determinar a qualidade, segurança e uso final do trigo, o que definirá também como este será armazenado e processado. Por forma a obter a melhor qualidade da farinha, frequentemente são misturadas diferentes qualidades de trigo (Prikhodko *et al.*, 2009).

Como já referido, o grão de trigo consiste em 3 partes principais: gérmen, farelo e endosperma. O processo de moagem visa separar o farelo e o gérmen, do endosperma amiláceo, para que este possa ser moído em farinha. Durante este processo a camada de aleurona rompe-se com o farelo o que contribui significativamente para a qualidade nutricional desta fração, pois é um componente rico em proteínas, minerais e vitaminas (Dewettinck *et al.*, 2008).

A transformação do grão em farinha envolve as seguintes etapas gerais:

1. Limpeza do grão, para remoção de impurezas;
2. Condicionamento, para tornar uniforme o conteúdo em humidade (Popper *et al.*, 2006)

de forma a fortalecer o farelo e facilitar uma fácil separação dos componentes do núcleo; o trigo é posteriormente armazenado segundo as suas características e depois eventualmente misturado para se obter o tipo específico de farinha que se pretende; e (Prikhodko *et al.*, 2009)

3. Moagem propriamente dita, que consiste essencialmente na separação do gérmen e farelo do endosperma, com a redução deste a farinha, envolvendo etapas de quebra, esmerilhamento e separação (Popper *et al.*, 2006).

2.1.2.1.2 Constituintes relevantes da farinha de trigo

2.1.2.1.2.1 Amido

O amido – principal forma de armazenamento de hidratos de carbono dos cereais – encontra-se apenas nas células do endosperma, variando no tamanho e forma dos grânulos dependendo do tipo de cereal (Belitz *et al.*, 2004), sendo o seu conteúdo na farinha de trigo variável (60-70%) consoante o grau de extração (Popper *et al.*, 2006).

O amido é composto por polímeros de glucose – amilose (molécula linear, de unidades de D-glucopiranosil em ligações α -1,4, com um grau de polimerização de 500-6000 resíduos de glucose, com uma pequena fração ligeiramente ramificada por ligações α -1,6) e amilopectina (polímero maior, com um grau de polimerização de 3×10^5 - 3×10^6 unidades de glucose, altamente ramificado, composto por cadeias de resíduos D-glucopiranosil em ligações α -1,4 os quais estão interligados por ligações α -1,6). O rácio entre amilose e amilopectina varia de amido para amido mas os valores típicos são 25-28% de amilose e 72-75% de amilopectina (Goesaert *et al.*, 2005), proporções estas que variam de acordo com as espécies e grau de maturação das plantas (Queji *et al.*, 2006).

A amilose e a amilopectina variam na sua dimensão consoante a fonte de amido, podendo conter no máximo 6.000 e 2.000.000 unidades de glucose, respetivamente, sendo a amilopectina considerada por isso uma das maiores moléculas presentes na natureza (Queji *et al.*, 2006).

A composição dos grânulos de amido divide-se geralmente numa parte amorfa central – constituída principalmente por cadeias de amilose e amilopectina (Wang *et al.*, 2015) associadas através de ligações por pontes de hidrogénio, estabilizadas internamente por ligações glicosídicas entre as moléculas de glucose (Queji *et al.*, 2006) – rodeada por uma parte semi-cristalina em anéis concêntricos que alternam com outros amorfos (Wang *et al.*, 2015).

Durante a moagem dos grãos para obtenção de farinha, uma fração significativa dos grânulos de amido (ca. 8%) pode ser danificada, afetando a sua estrutura e conseqüentemente as suas propriedades; o amido danificado torna-se assim mais suscetível à hidrólise enzimática, absorve mais água e perde propriedades de birrefringência (Goesaert *et al.*, 2005). A severidade da moagem e a dureza do grão de trigo influenciam a quantidade de amido danificado, e quanto maior a quantidade de amido danificado, maior será a absorção de água durante a amassadura e a degradação enzimática do amido (Borghet *et al.*, 2005).

O processamento e subsequente armazenamento dos alimentos que contêm amido provocam mudanças que irão afetar as suas características nutricionais e de qualidade. As propriedades funcionais do amido são influenciadas por estas alterações que estão relacionadas com a captação de água, o inchamento do grânulo, formação de uma pasta viscoelástica durante o aquecimento, seguida, aquando do arrefecimento de uma reassociação das cadeias de amido dispersas, havendo a formação de um gel. Desta forma o amido tem implicações na humidade, viscosidade, textura, consistência, *mouth-feel* e tempo de prateleira do produto final (Wang *et al.*, 2015).

Devido ao grande número de grupos hidroxilo expostos, o amido tem uma boa capacidade de hidratação (Queji *et al.*, 2006) e assim, na presença de água, os grânulos incham sendo este processo reversível abaixo de uma determinada temperatura – temperatura de gelatinização (Goesaert *et al.*, 2005). Em água fria o grânulo absorve apenas 30% do seu peso em água devido à sua estrutura cristalina (Queji *et al.*, 2006); contudo, quando a suspensão de amido é aquecida acima desta temperatura, dá-se a destruição irreversível da estrutura molecular do grânulo (Goesaert *et al.*, 2005) ocorrendo a quebra das ligações por pontes de hidrogénio mais fracas entre a amilose e a amilopectina (Queji *et al.*, 2006), formando-se uma pasta – os cristais derretem e a sua estrutura colapsa, as duplas hélices desenrolam e quebram-se as ligações de hidrogénio, sendo estas mudanças acompanhadas pela perda da birrefringência, característica dos grânulos intactos (Wang *et al.*, 2015).

Com o arrefecimento, há uma nova reassociação – passagem de um estado amorfo para um estado mais ordenado ou cristalino – designando-se este processo de retrogradação. Inicialmente há uma rápida recristalização das moléculas de amilose – determina a dureza do gel e a viscosidade e digestibilidade dos alimentos processados – seguindo-se uma recristalização lenta das moléculas de amilopectina. Este processo de recristalização da amilopectina, que leva ao desenvolvimento a longo prazo da estrutura do gel, está relacionado com o envelhecimento do pão (Wang *et al.*, 2015).

Assim, o retardamento ou inibição da retrogradação do amido – influenciada pelo conteúdo em água, fonte de amido, condições de armazenamento – é um grande desafio para a indústria alimentar. Outros componentes dos alimentos, como lípidos, hidratos de carbono, sais, proteínas e péptidos, podem retardar este processo indesejado. O conteúdo em água tem um grande efeito na gelatinização e retrogradação durante o armazenamento dos alimentos, sendo a retrogradação influenciada pelo conteúdo em amilose (Wang *et al.*, 2015).

O amido absorve até cerca de 46% de água durante a preparação da massa, mas a sua função ainda não é clara: alguns autores sugerem que o amido atua na incorporação de água na matriz proteica da massa, enquanto outros indicam que a massa é uma rede contínua de amido e proteínas; estudos sugerem também que propriedades específicas da superfície do grânulo, assim como a presença de enzimas amilolíticas, podem influenciar o comportamento reológico das massas de farinha de trigo (Goesaert *et al.*, 2005).

2.1.2.1.2.2 Polissacarídeos não amiláceos

No endosperma, ainda que em quantidades menores, existem outros polissacarídeos além do amido que incluem arabinoxilanas, hemiceluloses, pentosanas, celulose, β -glucanas e glucofrutanas. O seu conteúdo é maior em farinhas com maior grau de extração uma vez que estes polissacarídeos se encontram em maiores quantidades na parte mais exterior do núcleo (Belitz *et al.*, 2004, Goesaert *et al.*, 2005). Do ponto de vista de promoção da saúde, estes componentes podem ser designados como fibras dietéticas (Goesaert *et al.*, 2005).

Os polissacarídeos não amiláceos mais abundantes são as pentosanas, classificadas como hemiceluloses, compostas principalmente por arabinoxilanas (co-polímeros dos monossacarídeos xilose e arabinose) (Dagdelen *et al.*, 2007) que podem ser divididas em 2 grupos – solúveis em água

(1/3) e insolúveis (2/3) (Popper *et al.*, 2006) – tendo uma estrutura composta por ligações β -1,4 entre resíduos de D-piranosil substituídos nas posições C(O)-3 e/ou C(O)-2 com α -L-arabinofuranosídeo, podendo estar acoplado ao C(O)-5 da arabinose ácido ferúlico através de uma ligação éster (Goesaert *et al.*, 2005).

A estrutura e aspeto das arabinoxilanas – que resulta em propriedades físico-químicas únicas – são determinantes para a funcionalidade do fabrico de pão, podendo o seu impacto ser modulado por enzimas designadas xilanases (Goesaert *et al.*, 2005). O importante papel destas moléculas em panificação relaciona-se com a sua capacidade de absorção de água e interação com o glúten (Butt *et al.*, 2008). Podem ligar quase 10 vezes o seu peso em água, sendo responsáveis por quase 30% da capacidade da farinha de trigo absorver água (Collins *et al.*, 2006). Ao reforçarem a capacidade de absorção de água da massa, melhoram o seu desenvolvimento e estabilidade; por outro lado, conferem viscosidade e ao contribuírem para a elasticidade das proteínas à sua volta, podem aumentar a permeabilidade ao gás; adicionalmente, aumentam o volume do pão, firmeza da còdea, reduzem a retrogradação e, consequentemente reforçam a estabilidade durante o armazenamento e o tempo de prateleira (Miguel *et al.*, 2013). Apesar de serem componentes minoritários da farinha (2-3% na farinha de trigo) (Dagdelen *et al.*, 2007, Zheng *et al.*, 2011), têm a capacidade de afetar as propriedades da massa e do produto final (Butt *et al.*, 2008). Assim, em perspetiva, as arabinoxilanas, com uma predominância de apenas 2-3% contribuem para 25% da absorção de água pela massa, enquanto o amido contribui para 40-45% ainda que corresponda a 80% dos componentes da farinha (Forman, 2004).

2.1.2.1.2.3 Proteínas

As proteínas do trigo estão divididas em 4 grupos de acordo com o processo de fracionamento de Osborne tendo em conta a sua solubilidade: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis numa solução salina) e prolaminas, dividindo-se estas em gliadinas (solúveis em soluções alcoólicas) e gluteninas (insolúveis em soluções alcoólicas) (Barak *et al.*, 2015). Há ainda uma fração significativa de proteínas que não se enquadram nesta divisão uma vez que são insolúveis em qualquer dos solventes (Goesaert *et al.*, 2005).

Do ponto de vista da sua funcionalidade, distinguem-se 2 grupos de proteínas: as que formam glúten e as que não formam (15-20%) (Goesaert *et al.*, 2005). As proteínas são o principal componente do glúten, contudo outros componentes menores, como lípidos ou pentosanas, podem estar ligados a este por ligações covalentes influenciando as suas propriedades. O glúten comercial contém igualmente amido e minerais que não é possível remover e é por esse facto que o glúten seco só contém 80% de proteína (Popper *et al.*, 2006).

As albuminas e globulinas, não estando envolvidas na formação de glúten, não têm implicação na capacidade panificável de um determinado trigo e a sua composição não varia entre as diferentes variedades (Barak *et al.*, 2015). As proteínas que formam glúten representam 80-85% das proteínas totais da farinha de trigo e encontram-se no endosperma do grão maduro, onde formam uma matriz contínua à volta dos grânulos de amido (Goesaert *et al.*, 2005). Estas são as prolaminas (conjunto de

gliadinas e gluteninas) e a sua qualidade e quantidade na farinha de trigo confere-lhe a capacidade de ser processada e utilizada em diversos produtos de panificação (Barak *et al.*, 2015). Estas macromoléculas são capazes de absorver água até três vezes o seu peso e sob condições de *stress* mecânico originarem uma rede viscoelástica responsável pela retenção de gás durante a fermentação e a consequente expansão do volume do pão (Marchetti *et al.*, 2012).

As gliadinas atuam como plastificantes (Borghet *et al.*, 2005) sendo responsáveis pela coesão e extensibilidade do glúten (Barak *et al.*, 2015), características reológicas importantes da massa (Borghet *et al.*, 2005), enquanto a sua força e estabilidade é atribuída às gluteninas (Barak *et al.*, 2015), sendo estas aparentemente responsáveis pela resistência da massa à extensão (Borghet *et al.*, 2005). As características da massa são assim controladas pelo rácio entre estes dois tipos de proteínas e a sua remoção leva à perda das propriedades viscoelásticas da massa (Barak *et al.*, 2015). Fatores genéticos (tipo de trigo) e condições ambientais afetam diretamente este rácio, tendo posteriores implicações no desempenho da farinha em panificação (Marchetti *et al.*, 2012). Outro fator que poderá afetar a qualidade da farinha é a qualidade da fração de gluteninas. Apesar das diferenças nas propriedades das gliadinas poderem afetar a qualidade da farinha, acredita-se que a diferença nas propriedades das gluteninas são mais importantes para explicar as diferenças de qualidade das proteínas do glúten no fabrico de pão. Ainda que não se tenha conhecimentos detalhados acerca da estrutura das gluteninas e da sua contribuição para a elasticidade, é assumido que a diferença na sua funcionalidade resulta de variações na sua composição, estrutura e tamanho dos polímeros destas proteínas (Goesaert *et al.*, 2005).

As gliadinas são moléculas maioritariamente monoméricas e podem ser classificadas em 4 tipos – α -, γ -, ω 5- e ω 1,2-gliadinas – com base na sua sequência e composição de aminoácidos e peso molecular. As gluteninas são poliméricas e consistem em subunidades com peso molecular elevado e subunidades com peso molecular baixo (Lutz *et al.*, 2012).

No que toca à determinação das propriedades das proteínas do glúten, as ligações dissulfureto são cruciais – ligam dois resíduos de cisteína, seja dentro da mesma proteína ou em proteínas diferentes (Lutz *et al.*, 2012).

As proteínas do glúten (insolúveis em água) (Borghet *et al.*, 2005) são hidratadas durante a formação da massa, e ocorre a formação de interações entre as gluteninas e as gliadinas (McCann *et al.*, 2012), havendo a formação de uma rede forte, coesa e viscoelástica o que permite à massa reter os gases originários da fermentação (Borghet *et al.*, 2005). Esta rede de glúten hidratada providencia uma estrutura que sustenta os grânulos de amido e aprisiona as bolhas de ar (McCann *et al.*, 2012).

2.1.2.1.2.4 Lípidos

A farinha de trigo contém aproximadamente 2-2,5% de lípidos que podem ser divididos em lípidos polares e apolares (Pareyt *et al.*, 2011) em quantidades similares (Borghet *et al.*, 2005), dependendo esta composição de características genéticas e ambientais mas também da moagem e do método de extração (Pareyt *et al.*, 2011). Os lípidos podem ser classificados em lípidos amiláceos –

polares – e lípidos não amiláceos livres e ligados, – polares e apolares – com base na sua solubilidade sob condições específicas de extração (Borghet *et al.*, 2005).

A maioria dos lípidos polares (mono e digalactosildiacylgliceróis, N-acil-fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina e lisofosfatidiletanolamina) está presente no endosperma amiláceo e corresponde a 70-75% dos lípidos totais da farinha de trigo. Os lípidos apolares (ácidos gordos livres, mono, di e triacylgliceróis) estão predominantemente presentes no gérmen e na camada aleurona (Pareyt *et al.*, 2011). O padrão de ácidos gordos dos lípidos da farinha consiste principalmente em ácido linoleico (C18:2) e quantidades mais baixas de ácido palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) (Goesaert *et al.*, 2005).

Ainda que presentes em quantidades baixas, a qualidade do pão é significativamente afetada pelos lípidos da farinha (Pareyt *et al.*, 2011) principalmente os da fração não amilácea (que se ligam ao glúten durante a amassadura), (Borghet *et al.*, 2005) uma vez que os lípidos amiláceos estão de tal forma ligados aos grânulos de amido que ficam indisponíveis para afetar o processo – até que ocorra gelatinização do amido (Goesaert *et al.*, 2005).

O volume do pão é particularmente influenciado pela composição, extração e conteúdo geral dos lípidos da farinha de trigo (Pareyt *et al.*, 2011). Verificou-se que os lípidos apolares provocam a redução do volume do pão, sendo que os lípidos polares podem igualmente ter o mesmo efeito prejudicial, ainda que em concentrações mais elevadas provoquem o contrário. Assim, o rácio entre lípidos polares e apolares e o conteúdo em galactolípidos dos lípidos não amiláceos livres, está fortemente correlacionado com o volume do pão (Goesaert *et al.*, 2005). Na etapa de amassadura, cerca de 70% do total de lípidos da farinha (a maioria lípidos livres polares e parte dos apolares) ficam ligados ou encurralados na rede de glúten havendo uma associação destes com as gliadinas e gluteninas. Estudos sugerem que há uma interação entre as gluteninas e os galactolípidos, enquanto os fosfolípidos se ligam às gliadinas (Pareyt *et al.*, 2011). Tal situação pode ter um impacto positivo na força da rede de glúten formada (Gerits *et al.*, 2014). Presumivelmente, esta funcionalidade dos lípidos está relacionada com o seu efeito na estabilidade das células de gás, sendo a influência positiva dos lípidos polares atribuída à sua capacidade de formar monocamadas de lípidos na interface gás/líquido das células de gás, levando a um aumento da retenção deste pela massa. Além disso, os lípidos polares podem também contribuir para as propriedades de manuseamento da massa (Goesaert *et al.*, 2005).

Os lípidos polares presentes na farinha (fosfo- e galactolípidos) afetam então a estabilidade das células de gás, tendo sobre estas um efeito positivo. Ainda que o glúten tenha sozinho a capacidade de estabilizar as células de gás durante a fermentação, os lípidos atuam com este de forma sinérgica. No entanto, foi demonstrado que os lípidos apolares, como os ácidos gordos livres, podem ter o efeito contrário e provocar uma redução do volume do pão ao desestabilizar as células de gás. É possível ultrapassar estes efeitos danosos pela adição de gordura à formulação do pão, sendo esta situação preferível a retirar a gordura à farinha. Geralmente uma farinha com um elevado nível de lípidos polares tem melhor qualidade para panificação, melhorando esta com a adição de gordura (Pareyt *et al.*, 2011).

2.1.2.2 Água

A farinha e a água são os ingredientes mais importantes no fabrico de pão, já que são os que mais afetam a textura e o miolo (Mondal *et al.*, 2008).

A água, quando adicionada à farinha, é absorvida; a farinha incha e liga-se à água, havendo a formação de uma massa quando é aplicada energia mecânica (Dagdelen *et al.*, 2007).

A maior parte das receitas de pão contêm entre 60-75% de água (Mondal *et al.*, 2008).

2.1.2.3 Sal

Em formulações de massa de pão, o sal (cloreto de sódio) é usado para melhorar a microestrutura, características físicas e propriedades sensoriais do produto final. A adição de sal – normalmente em concentrações abaixo de 2% (relativamente à quantidade de farinha usada) – pode alterar grandemente a extensão da gelatinização e retrogradação do amido durante o processamento e armazenamento (Goesaert *et al.*, 2005).

O efeito do sal nas propriedades reológicas da massa está geralmente relacionado com a influência que este tem nas proteínas do glúten. Em baixas concentrações, protege a carga das moléculas do glúten reduzindo desta forma a repulsão eletrostática entre as proteínas, permitindo que elas se associem e produzam uma rede mais forte. Em concentrações mais elevadas, o sal interage mais com as moléculas do solvente e o seu efeito nas proteínas do glúten é primeiramente determinado pelo tipo de iões presente (Tuhumurya *et al.*, 2014).

Aumento da tolerância da massa à mistura, extensão do tempo de desenvolvimento da massa e aumento da resistência, elasticidade e extensibilidade da massa são algumas alterações descritas por diversos estudos, sendo que parte do efeito de fortalecimento da massa se deve à diminuição da absorção de água pela farinha quando o sal está presente (McCann *et al.*, 2013).

2.1.2.4 Levedura

Comparado com outros alimentos comuns, o pão é diferente na medida em que é um produto fermentado, obtido pela fermentação dos açúcares da farinha de trigo originários do amido após sofrer ação de enzimas (Mondal *et al.*, 2008).

O agente de fermentação mais frequentemente usado no processo convencional de fabrico de pão é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, embora outras espécies possam também ser utilizadas (Miguel *et al.*, 2013).

Durante a fermentação o açúcar é convertido em humidade e CO₂. Devido ao aumento da temperatura, o gás expande-se, funcionando como agente de isolamento, prevenindo um aumento elevado de temperatura do miolo e a possibilidade de evaporação da água (Mondal *et al.*, 2008).

2.1.2.5 Outros ingredientes

Hoje em dia, existe a necessidade de adicionar outros ingredientes ao fabrico de pão de forma a ir ao encontro da procura crescente por parte do consumidor de mais qualidade, conveniência e maior tempo de prateleira dos produtos (Mondal *et al.*, 2008).

Usualmente são usados emulsionantes (substâncias que possuem simultaneamente propriedades hidrofóbicas (lipofílicas) e hidrofílicas) no fabrico do pão com vista a fortificar a massa e/ou tornar o miolo mais macio (Goesaert *et al.*, 2005). Um emulsionante eficaz é o E472e (ésteres mono e diacetiltartáricos de mono e diglicéridos de ácidos gordos) (Dagdelen *et al.*, 2007). Além de emulsionantes são adicionados outros ingredientes como enzimas, agentes antioxidantes ou redutores, glúten, hidrocolóides, sais minerais, aminoácidos e outras substâncias para otimizar a farinha ou para tornar a produção mais confiável (Dagdelen *et al.*, 2007).

O ácido ascórbico (E300) é visto como um agente protetor contra a perda de estabilidade das proteínas ao neutralizar a glutathione (agente redutor – “amaciador”) que ocorre naturalmente na farinha. No início da amassadura, o ácido ascórbico é oxidado a ácido desidroascórbico com a ajuda de enzimas da farinha – ascorbato oxidase e glutathione desidrogenase – e assim a glutathione é oxidada evitando o seu efeito amaciador (Dagdelen *et al.*, 2007). No entanto, o seu efeito deve-se principalmente ao facto de atuar como um agente antioxidante, provocando mudanças na estrutura espacial do glúten ao oxidar os grupos sulfidril dos resíduos de cisteína levando à formação de ligações disulfito intra e intermoleculares, o que confere mais força à massa e reduz a sua pegajosidade (Šimurina *et al.*, 2014).

2.1.3 Processo de fabrico

O processo de panificação já vem sendo praticado há bastante tempo, no entanto, apesar disso, este não foi ainda totalmente compreendido (Lagrain *et al.*, 2008) pois envolve diversas reações físicas e moleculares complexas e acopladas, que resultam numa série de alterações físicas, químicas e bioquímicas no produto final (Miguel *et al.*, 2013).

Da Portaria nº 52/2015 de 26 de fevereiro, pão é “o produto obtido da amassadura, fermentação e cozedura, em condições adequadas, das farinhas de trigo, centeio, tritcale ou milho, estemes ou em mistura, de acordo com os tipos legalmente estabelecidos, água potável e fermento ou levedura sendo ainda possível a utilização de sal e de outros ingredientes, incluindo aditivos, bem como auxiliares tecnológicos, nomeadamente enzimas, nas condições legalmente fixadas” (Portaria 52/2015).

Para o fabrico de pão, os ingredientes básicos utilizados são: farinha, água, agente de levedação (levedura ou químicos) e sal (Scanlon *et al.*, 2001). Na receita, a farinha é sempre 100% e o resto dos ingredientes são uma percentagem dessa quantidade por peso (Mondal *et al.*, 2008).

O pão consiste numa estrutura sólida espumosa, instável e elástica, que contém uma fase contínua – composta por uma rede elástica de moléculas de glúten reticuladas e polímeros de amido lixiviados, principalmente amilose, não complexada e complexada com lípidos polares – e uma fase descontínua – composta pelos grânulos de amido deformados, inchados, gelatinizados e aprisionados (Miguel *et al.*, 2013).

O processo genérico de fabrico de pão contempla 3 etapas: amassadura, fermentação (descanso e levedação em estufa) e cozimento (Miguel *et al.*, 2013).

Na fase da amassadura, as partículas de farinha são hidratadas e cortadas e o desenvolvimento da massa dá-se quando as proteínas do glúten formam uma rede coesa contínua, na qual se encontram dispersos os grânulos de amido (Miguel *et al.*, 2013). O desenvolvimento de uma melhor rede de glúten consegue-se geralmente com temperaturas entre 24,5-28°C, pois nestas condições são favorecidas as reações entre as proteínas do glúten e conseqüentemente o seu desenvolvimento acontece mais rapidamente (Borghet *et al.*, 2005).

Nesta etapa há também a incorporação de ar, um componente importante da massa. Nas operações subseqüentes não são geradas novas células de gás apesar da ação da levedura, logo os núcleos para o desenvolvimento de células de gás, que irão compor a fase de ar do miolo, devem ser geradas durante a mistura. O agente de fermentação gera gás que, devido a um gradiente de concentração, se difunde para os núcleos formados, levando à expansão das células de gás e à redução da densidade da massa. Na realidade esta visão simplista é complicada num processo de fabrico real, devido à natureza não independente do crescimento das células de gás e da ação do padeiro (moldagem), ação esta que visa otimizar a estrutura do miolo no produto final (Scanlon *et al.*, 2001).

O dióxido de carbono é gerado pela reação de fermentação e acumula-se nas células de gás existentes insuflando a matriz da massa; a maior parte desta insuflação acontece durante a levedação, ocorrendo a restante expansão durante a cozedura que leva à coalescência ou rutura das células de gás (Wang *et al.*, 2011).

Durante a fase de cozimento do pão, a rede de glúten transitória formada na massa, transforma-se numa rede contínua e permanente devido à reticulação que acontece a temperaturas elevadas; ocorre uma expansão das células de gás, de modo que o pão não é apenas uma rede contínua de glúten mas também de gás, razão pela qual o pão não colapsa quando o dióxido de carbono se perde durante a cozedura ou o posterior arrefecimento (Pareyt *et al.*, 2011).

A massa é transformada sob a influência do calor, num produto poroso, facilmente digerível e saboroso, sendo as mudanças mais aparentes a expansão do volume, formação da côdea, inativação da levedura e das atividades enzimáticas, reticulação das proteínas e gelatinização parcial do amido (Lagrain *et al.*, 2008).

Quer a amassadura (processo mecânico, alterações físicas), as reações químicas (incluindo reações de catalisação enzimática) ou o efeito térmico (tempo e temperatura de cozimento), têm influência na natureza e propriedades do produto final (Miguel *et al.*, 2013).

2.1.4 Parâmetros de qualidade

As expectativas do consumidor são o fator decisivo para avaliar a qualidade do pão e descrever possíveis falhas, e variam largamente de região para região (Dagdelen *et al.*, 2007).

Na generalidade, a crosta não deve ser demasiado espessa e deve ser uniformemente castanha e não demasiado escura, sendo que muitos consumidores a preferem mais clara (Dagdelen *et al.*, 2007).

O miolo deve ser igualmente claro, suave e deve manter a humidade o maior tempo possível. Um miolo resultante de um bom rendimento da massa, tem mais tempo de prateleira, atributo de qualidade determinado pela velocidade de retrogradação do amido gelatinizado, sendo que a fermentação do miolo varia com o tipo de produto final. A estrutura do miolo deve ser igualmente elástica, o que significa que deve voltar à sua forma original quando apertado (Dagdelen *et al.*, 2007).

O aroma e sabor do pão de trigo é suposto ser suave mas característico de cada tipo, com uma definida mas não notória nota ao aroma da levedura, que faz parte do complexo *bouquet* aromático que não deve ser dominado por aromas ácidos ou salgados (Dagdelen *et al.*, 2007).

2.2 Enzimas em panificação

2.2.1 Enquadramento

A introdução de enzimas nos processos de fabrico no setor da panificação e pastelaria tem mais de um século (Stauffer, 1994) e contribuiu largamente para a evolução deste mercado, onde estas representam já um segmento industrial relevante, cujos principais *players* são a Novozymes (47% do mercado), a DuPont (21% do mercado) e a DSM (6% do mercado). Trata-se de um segmento em franca expansão, com uma procura cada vez maior, não só do setor alimentar como de outros (Miguel *et al.*, 2013).

Uma vez que estas moléculas possuem estatuto GRAS (Generally Recognised As Safe) e são inativadas no final do processo de panificação/pastelaria, são uma boa alternativa aos aditivos químicos, (Dagdelen *et al.*, 2007) pois permitem uma rotulagem mais “limpa” (Lallemand, 1996) indo de encontro à tendência generalizada de procura dos consumidores por produtos naturais.

Algumas enzimas estão presentes naturalmente no trigo e conseqüentemente na farinha, e estão envolvidas em reações decisivas para a qualidade do produto final; exemplos são as amílases, as proteinases, as lipases, a fitase, a glutatona desidrogenase, as polifenoloxidasas, entre outras (Belitz *et al.*, 2004).

Este estudo de revisão bibliográfica que suporta o trabalho prático a decorrer na Germen, incidiu sobre a adição à farinha de 4 enzimas – α -amílase, xilanase, glucose-oxidase e fosfolipase – como tal a revisão limitou-se apenas a estas enzimas e sua relevância na qualidade do produto final.

2.2.2 Função

Como discutido anteriormente, as proteínas do glúten influenciam grandemente a qualidade do trigo e esta, por sua vez, é afetada por diversos fatores como: diferenças nos cultivos, danos ambientais ou causados por insetos e condições genéticas ou de pós-colheita. Para contornar estas questões e melhorar a qualidade da farinha as enzimas (Tang *et al.*, 2014) têm sido escolhidas como aditivos ou reguladores naturais. Uma vez que as enzimas são consideradas não tóxicas (Bonet *et al.*, 2006), com efeitos similares aos produzidos por aditivos químicos, a sua utilização na indústria de panificação tem-

se tornado prática comum (Rosell *et al.*, 2001) e conhecer mais sobre as suas características pode ajudar ao seu uso mais eficaz por parte dos moleiros, fornecedores de ingredientes e padeiros (Lallemand, 1996).

De um modo geral a sua utilidade em panificação prende-se com a sua capacidade em influenciar o volume, sabor, aroma, maciez e estrutura da cãea e do miolo, podendo também aumentar o tempo de vida útil do produto final (Queji *et al.*, 2006). São normalmente usadas em quantidades pequenas e podem ser adicionadas individualmente ou em misturas, as quais podem atuar de forma sinérgica (Miguel *et al.*, 2013).

Enzimas são proteínas, produzidas por plantas, animais ou microrganismos, que têm como função acelerar uma reação química sem sofrerem qualquer modificação no decurso da mesma. Catalisam apenas uma reação sendo específicas para um determinado composto – a sua designação tem em conta o substrato e o tipo de reação que catalisam (Lallemand, 1996); deste modo podem ser usadas em pequenas quantidades, o que é também uma vantagem (Popper *et al.*, 2006). Uma molécula de enzima combina-se com uma molécula de substrato numa orientação fixa, formando um complexo enzima-substrato e baixando a energia necessária para a reação prosseguir. A natureza tridimensional deste complexo é tal que por exemplo a α -amílase hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 da amilopectina mas não as α -1,6, que correspondem às ramificações da molécula (Stauffer, 1994). O seu desempenho depende do tempo e condições como temperatura e pH uma vez que cada uma tem os seus intervalos específicos de atuação (Lallemand, 1996). Em geral, têm propriedades em comum com a maioria das proteínas: são solúveis em água mas não em solventes orgânicos, estão sujeitas a desnaturação (desdobramento) em condições extremas de temperatura ou pH – e, quando tal, perdem a sua capacidade catalisadora –, e são sujeitas a hidrólise por proteases, etc (Stauffer, 1994).

O pH afeta o estado de ionização das cadeias laterais de certos aminoácidos e para que a reação catalítica ocorra, o sítio ativo da enzima (a parte que interage diretamente com o substrato a alterar) tem de estar no estado de ionização adequado – tal acontece para um determinado intervalo de pH designado o pH ótimo da enzima, e quando é abaixo ou acima deste a atividade enzimática é menor. O pH da massa de pão é relativamente constante e a utilidade de determinada enzima irá depender em parte da correspondência entre o pH do meio e o pH ótimo da enzima (Stauffer, 1994).

A estabilidade térmica das enzimas é variável, algumas perdem a sua atividade catalítica a temperaturas baixas, enquanto outras podem resistir a temperaturas mais elevadas, pelo menos durante um curto período de tempo. Abaixo da temperatura de congelação as enzimas têm comportamentos diferentes, no entanto são poucas aquelas que são irreversivelmente destruídas (Belitz *et al.*, 2004).

2.2.2.1 α -amílase

A α -amílase ocorre naturalmente no trigo em concentrações variáveis, mas em geral abaixo das ótimas para o fabrico de pão (Lallemand, 1996), sendo as farinhas muitas vezes suplementadas com esta enzima. Há diferentes fontes de α -amílases diferindo na sua termoestabilidade: as α -amílases fúngicas são as mais termolábeis, seguindo-se as presentes nos cereais, e finalmente as α -amílases

bacterianas, que são as mais estáveis (Rosell *et al.*, 2001). A farinha de malte pode ser usada como suplemento, no entanto tem uma utilidade mais limitada, uma vez que também contém enzimas que degradam proteínas, tornando o glúten mais fraco (Popper *et al.*, 2006). Outras variações de perfil das α -amilases podem ocorrer nomeadamente no número de locais de ligação e localização das regiões catalíticas, determinando a especificidade do seu substrato, bem como o comprimento dos fragmentos resultantes da hidrólise e conseqüentemente o perfil em hidratos de carbono do produto final (Miguel *et al.*, 2013).

A sua função em panificação é ampla – aumento do volume do pão, melhoria do miolo, cõdea e desenvolvimento de sabor – sendo por isso das enzimas mais utilizadas neste setor. Foi igualmente demonstrado que estas enzimas interferem com o envelhecimento devido à sua capacidade de retardar a retrogradação do amido durante o armazenamento do pão, sendo esta função apenas atribuída às α -amilases bacterianas com uma estabilidade térmica intermédia (Rosell *et al.*, 2001).

Durante o cozimento do pão ocorre o processo explicado anteriormente de gelatinização do amido – à medida que a temperatura aumenta, este adquire solubilidade, aumentando a viscosidade da massa. Acontece que quando o amido é danificado na moagem há um aumento da absorção de água pela farinha o que torna a massa mais pegajosa, originando pães com menor volume e textura do miolo alterada. Isto ocorre devido ao rompimento de algumas ligações do tipo pontes de hidrogénio entre a amilose e a amilopectina e à formação de pontes de hidrogénio entre a água e os grupos hidroxilo (Queji *et al.*, 2006).

Em resposta à possibilidade de formação de amido danificado (as farinhas destinadas à panificação podem possuir uma percentagem entre 4-8%), a indústria suplementa a farinha de trigo com α -amilase de forma a melhorar a sua qualidade tecnológica (Queji *et al.*, 2006). A sua ação origina cadeias mais curtas de açúcares ao hidrolisar ligações glicosídicas α -1,4 (Rosell *et al.*, 2001), gerando produtos finais como os oligossacáridos com configuração α e comprimentos variáveis e dextrinas, que são oligossacáridos ramificados (Miguel *et al.*, 2013).

As α -amilases fúngicas ou maltogénicas são normalmente adicionadas inicialmente para aumentar os níveis de açúcares fermentescíveis, sendo as primeiras mais apropriadas para a uniformização da farinha por serem menos termoestáveis. O uso de α -amilases e β -amilases gera resultados diferentes, mas complementares – as primeiras degradam durante a fase de preparação da massa as partículas de amido danificado em dextrinas de peso molecular menor, enquanto as segundas convertem esses oligossacáridos em maltose que é usada pelas leveduras como açúcar fermentescível (Miguel *et al.*, 2013). Após a preparação da massa, a levedura começa então a fermentar os açúcares disponíveis em álcoois e dióxido de carbono, o que causa o crescimento da massa (Maarel *et al.*, 2002).

As enzimas atuam no amido danificado presente ou naquele que sofreu gelatinização, pois este encontra-se mais suscetível ao ataque enzimático (Rosell *et al.*, 2001), levando à alteração da absorção de água, o que tem influência na consistência e extensibilidade da massa; quando a ação ocorre durante o cozimento sobre o amido gelatinizado, ocorrem melhorias no volume e cor da cõdea e miolo, proporcionando igualmente maciez (Queji *et al.*, 2006). Blaszcak *et al.* (2004) obtiveram resultados concordantes com a adição de α -amilase: aumento do volume específico do pão, bem como a

porosidade, e uma diminuição na dureza e pegajosidade do miolo (Blaszczak *et al.*, 2004). Os polissacarídeos obtidos desta atividade hidrolítica são necessários à fermentação, mas também participam nas reações de Maillard que ocorrem durante a cozedura (Rosell *et al.*, 2001).

Após o cozimento, ocorrem no pão uma série de alterações que levam a uma deterioração de qualidade – aumento da firmeza, perda de crocância da côdea, diminuição do conteúdo em humidade do miolo e perda de sabor – designadas de envelhecimento. As α -amílases, além de gerarem açúcares fermentescíveis para a atuação da levedura, têm também um efeito anti-envelhecimento do pão (Maarel *et al.*, 2002). Blaszczak *et al.* (2004) reportou esse efeito distinguindo ainda a α -amílase fúngica da bacteriana, tendo esta última um efeito mais marcante na alteração das características que levam ao envelhecimento do pão, nomeadamente na matriz amido-proteína (Blaszczak *et al.*, 2004).

A atividade da α -amílase pode ser influenciada por ingredientes comumente usados em panificação como o sal. Segundo Rosell *et al.* (2001) as que provêm do cereal são menos inibidas do que as de origem bacteriana e fúngica; conseqüentemente nestes casos, esta inibição deve ser tida em conta por forma a ajustar a quantidade de enzima adicionada. Por exemplo no caso da α -amílase fúngica, apenas se verifica 20% da atividade da enzima em concentrações de 5 mM de sal (Rosell *et al.*, 2001).

2.2.2.2 Glucose-oxidase

A glucose-oxidase é uma oxi-redutase que pode ser obtida de fontes fúngicas, sendo a mais comum o fungo *Aspergillus niger* (Miguel *et al.*, 2013).

Na presença de oxigénio, esta enzima catalisa a oxidação da D-glucose a ácido D-glucónico, libertando-se peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que leva à formação de ligações disulfito na rede de glúten, o que conseqüentemente melhora a capacidade de manuseamento da massa e retenção de gás e conseqüentemente a qualidade do pão (Tang *et al.*, 2014). O mecanismo pelo qual a glucose-oxidase melhora a qualidade do pão não está, no entanto, ainda completamente esclarecido. Diversos autores indicam que as propriedades reológicas da massa se alteram devido à formação de ligações disulfito pela oxidação das unidades sulfidril livres das proteínas do glúten levadas a cabo pelo peróxido de hidrogénio e a gelificação das pentosanas solúveis em água (Bonet *et al.*, 2006, Primo-Martín *et al.*, 2005). Decamps *et al.* (2012) referiu a possibilidade do peróxido de hidrogénio formado provocar também reticulação entre arabinoxilanas (Decamps *et al.*, 2012). No entanto, existe ainda alguma controvérsia relativamente à gelificação e reticulação entre arabinoxilanas ter um efeito positivo ou negativo, podendo este efeito ser corrigido pela co-adição de enzimas que atuam sobre estes compostos como as xilanases. A combinação entre xilanases e glucose-oxidases é muito usada em panificação, não estando, contudo, completamente entendido este mecanismo de sinergia (Primo-Martín *et al.*, 2005).

Outros estudos confirmaram igualmente que o peróxido de hidrogénio é um dos compostos responsáveis pelas propriedades da massa. Outra situação verificada foi a reticulação das proteínas solúveis em água – albuminas e globulinas – envolvendo ligações disulfito e outras (Bonet *et al.*, 2006).

Verifica-se também um aumento do volume do pão, efeito atribuído igualmente ao peróxido de hidrogénio (Bonet *et al.*, 2006) e uma melhoria na estrutura do miolo (Decamps *et al.*, 2012).

Quando adicionada à farinha, a glucose-oxidase é referenciada como sendo responsável por uma massa menos extensível e mais resistente (Pescador-Piedra *et al.*, 2009), por exemplo pela experimentação efetuada por Dagdelen *et al.* (2007) que verificou que esta enzima provoca precisamente a diminuição da extensibilidade e origina uma massa mais firme e rígida (Dagdelen *et al.*, 2007).

A glucose-oxidase pode ser usada como substituto do bromato de potássio – agente oxidante tradicionalmente usado no fabrico de pão – já que este foi reconhecido como carcinogénico e proibido em diversos países (Miguel *et al.*, 2013).

2.2.2.3 Xilanase

As xilanases são glicosil-hidrolases que degradam material da parede celular das plantas (xilana) ao quebrarem aleatoriamente as suas ligações β -1,4. A sua atividade ocorre para pH=4,5-6,5 e temperatura entre 40-60 °C, variando consoante o tipo específico de xilanase (Butt *et al.*, 2008).

A xilana é um componente complexo e heterogéneo da parede celular o que resulta numa gama diversa de xilanases que variam nas suas propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade do substrato (Motta *et al.*, 2013). Como tal, para uma completa hidrólise da xilana é necessária uma ação sinérgica entre um conjunto de várias enzimas xilanolíticas (Butt *et al.*, 2008). As xilanases podem ser agrupadas em famílias de acordo com semelhanças na sua sequência de aminoácidos do seu local catalítico, sendo as principais famílias de glicosil-hidrolases a 10 e a 11, sendo as desta última as mais usadas nos processos de panificação (Zheng *et al.*, 2011).

As arabinoxilanas (os polissacarídeos não amiláceos mais abundantes na farinha de trigo) (Forman, 2004) consistem numa fração solúvel em água (20-25%) – influencia fortemente a viscosidade do meio aquoso (Collins *et al.*, 2006) – e numa fração insolúvel – tem grande capacidade de retenção de água e um efeito negativo na qualidade da massa, sendo prejudicial à formação dos filmes proteicos (glúten) (Collins *et al.*, 2006, Forman, 2004). A natureza da fração não solúvel deve-se às interações covalentes e não covalentes com as arabinoxilanas adjacentes, proteínas e/ou com moléculas de celulose (Collins *et al.*, 2006). Enquanto se mostrou que as arabinoxilanas insolúveis são prejudiciais para a qualidade do pão, as solúveis (sejam as naturalmente presentes ou as que são formadas por hidrólise a partir das arabinoxilanas insolúveis) têm um papel benéfico (Forman, 2004).

As xilanases, usadas pela primeira vez em processos de panificação na década de 70, são largamente adicionadas como aditivos na indústria, pois mostraram provocar um efeito de melhoria na massa – mais flexibilidade, maleabilidade e estabilidade – e na qualidade do pão – maior volume e melhor estrutura do miolo (Collins *et al.*, 2006).

Acredita-se que a redistribuição de água das arabinoxilanas da farinha para o amido e glúten é importante, no entanto o mecanismo exato do funcionamento das xilanases ainda não está completamente elucidado (Collins *et al.*, 2006).

As diferenças na especificação do substrato, padrões de ação, interações com inibidores e capacidades cinéticas de cada xilanase, levam a que nem todas sejam eficazes para panificação. Atualmente é aceite que as mais adequadas são aquelas que são ativas na fração insolúvel em água e pouco ativas na fração solúvel, solubilizando as arabinoxilanas insolúveis para as tornar arabinoxilanas solúveis de alto peso molecular e, conseqüentemente, levar a uma diminuição da retenção de água por estas, o que leva a um aumento da viscosidade. Com isto, a estabilidade da massa aumenta (devido ao aumento da viscosidade) além de serem removidas as arabinoxilanas insolúveis que interferem com a formação da rede de glúten. No produto final, esta massa mais estável e flexível, a qual é mais fácil de trabalhar e origina melhor *oven spring* (Collins *et al.*, 2006) (crescimento rápido da massa assim que esta é colocada no forno para cozer, devido à produção contínua de CO₂ pela levedura antes desta ser destruída pelo calor) (Miguel, 2013), maior volume e melhor estrutura de miolo (Collins *et al.*, 2006).

Para ir de encontro a uma atividade ótima das xilanasas é importante limitar a hidrólise: um excesso de hidrólise leva a que as arabinoxilanas solúveis percam a sua capacidade de ligação à água e o efeito é uma massa excessivamente pegajosa (Forman, 2004).

As xilanasas, têm assim um grande valor em panificação por se ter verificado que têm implicações no aumento do volume do pão, melhoria da estrutura do miolo e diminuição da viscosidade (Butt *et al.*, 2008).

Estas enzimas podem funcionar de forma sinérgica com as amílases (Forman, 2004), contribuindo principalmente para o aumento do volume e diminuição da dureza da crosta, tal como verificou Steffolani *et al.* (2012) (Steffolani *et al.*, 2012).

2.2.2.4 Lipase

As lipases são o terceiro grupo de enzimas mais comercializadas a seguir às peptidases e às carbo-hidrases (Gerits *et al.*, 2014). No entanto, o uso de lipases em panificação é muito mais recente quando comparada com o uso de outras enzimas (Goesaert *et al.*, 2001), como por exemplo as α -amílases (Miguel *et al.*, 2013). O seu uso pela indústria tem aumentado como resultado da sua versatilidade funcional e os seus potenciais efeitos benéficos em termos de processamento e qualidade do produto (Gerits *et al.*, 2014).

Estas enzimas hidrolisam as ligações éster dos triacilgliceróis, resultando em mono e diacilgliceróis e ácidos gordos livres; sendo que em particular lipases que removem preferencialmente ácidos gordos das posições 1 e 3 melhoram as propriedades reológicas da massa e conseqüentemente a qualidade do produto final e podem ser uma alternativa ao uso de emulsionantes químicos para o fortalecimento da massa. Os efeitos das lipases são: o aumento da força e estabilidade da massa, com aumento da maleabilidade desta e como há um aumento do volume do pão, origina-se uma melhor e mais uniforme estrutura do miolo, além deste ficar também mais macio; podem ter ainda um efeito anti-envelhecimento (Goesaert *et al.*, 2005).

As fosfolipases (A1, A2, C e D) pertencem ao grupo das lipases que compreendem também as triacilglicerol-lipases e galactolipases (Miguel *et al.*, 2013). Os fosfolípidos são componentes

minoritários da farinha de trigo e apenas os fosfolípidos da fração não-amilácea – fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, N-acil-lisofosfatidiletanolamina e N-acil-fosfatidiletanolamina – afetam a qualidade da massa. Durante a amassadura, o aumento de ligações entre lípidos não-amiláceos as quais estão relacionadas com o desenvolvimento da massa, é principalmente devido a interações específicas entre os lípidos e as proteínas da rede de glúten. As propriedades tecnológicas dos fosfolípidos durante a amassadura e fermentação podem dever-se à sua habilidade para modificar as propriedades físico-químicas de um filme líquido envolvendo bolhas de gás (Néron *et al.*, 2004).

A adição de uma fosfolipase à farinha provoca alterações nas propriedades físicas da massa – proporciona uma massa com um nível de elasticidade e extensibilidade adequado e diminui a sua viscosidade. No produto final obtém-se um aumento de volume e um grau de suavidade adequado, com um miolo elástico (Néron *et al.*, 2004).

Apesar da existência de lipases no grão de cereais, a sua atividade na farinha é geralmente baixa o suficiente para evitar a rancidez derivada da hidrólise dos lípidos presentes e das gorduras usadas nos processos de panificação e pastelaria (Miguel *et al.*, 2013), já que se encontram essencialmente no farelo e no gérmen. A farinha de trigo com um maior grau de extração é por isso mais suscetível à rancidez provocada pelas lipases endógenas do trigo, sendo esta favorecida pelas temperaturas elevadas e tempos longos de armazenamento (Gerits *et al.*, 2014).

Os vários estudos levados a cabo para perceber o efeito que os lípidos presentes no trigo desempenham nos processos de panificação, mostram que os lípidos polares são os mais favoráveis em detrimento da fração não polar (Néron *et al.*, 2004).

Gerits *et al.* (2014) verificaram que com a alteração da composição de lípidos endógenos aumenta o volume do pão, sendo que a extensão depende da especificidade lipases; o estudo revelou que a hidrólise dos galactolípidos e numa menor extensão dos fosfolípidos, afeta o volume do pão (Gerits *et al.*, 2014).

Durante a amassadura os lípidos interagem com as proteínas da massa, sendo que a maioria dos lípidos não amiláceos livres se ligam ao glúten; os que se encontram fortemente ligados aos grânulos de amido estão essencialmente indisponíveis até o amido estar gelatinizado. Na presença de lípidos a gliadina e pequenas quantidades de globulina, podem formar agregados, principalmente com galactolípidos, sendo as proteínas assim associadas, preferencialmente incorporadas na rede de glúten (Borghet *et al.*, 2005). Por outro lado, os ácidos gordos polinsaturados são oxidados por lipoxigenases do trigo resultando em hidroxiperóxidos e radicais livres, compostos que podem oxidar outros constituintes como proteínas e carotenoides, afetando as propriedades reológicas da farinha e a cor do miolo (Goesaert *et al.*, 2005).

A literatura encontrada, referente ao uso de lipases em panificação, é escassa e isso deve-se ao facto do interesse da sua aplicação nestes sistemas ser mais recente. Este crescente interesse prende-se por um lado por as lipases poderem substituir os emulsionantes por geração de emulsionantes *in situ* em consequência da hidrólise dos lípidos endógenos da farinha, e além disso, em receitas de pão, serem usadas em quantidades menores, o que em princípio poderá levar a uma redução de custos.

Além disso, contrariamente aos emulsionantes, as lipases sendo proteínas, são desnaturadas durante a cozedura, não estando presentes no produto final, logo pela legislação atualmente em vigor na EU não é necessário a sua declaração, obtendo-se uma rotulagem simplificada, normalmente preferida pelos consumidores e pelos produtores (Gerits *et al.*, 2014, Regulamento 1169/2011).

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

O trabalho desenvolvido teve como objetivos gerais o desenvolvimento de competências de inovação e desenvolvimento na área da produção de farinhas, farinhas corrigidas e farinhas compostas, conferindo conhecimentos ao nível das propriedades da farinha – determinação das características reológicas por meio de Alveógrafo de Chopin e determinação da absorção da água e das características reológicas por meio do Farinógrafo de Brabender – e do fabrico de pão numa padaria experimental.

Como objetivos específicos pretendeu-se determinar o efeito da aplicação de 4 tipos de enzimas numa farinha panificável nos parâmetros de qualidade alveográficos e farinográficos e no volume específico do pão.

Cada uma das enzimas foi adicionada em 3 concentrações diferentes, usadas pela empresa e definidas segundo informações de uso dos fornecedores, de forma a se perceber se diferenças entre estas concentrações levam a efeitos significativos do ponto de vista técnico nos parâmetros avaliados, ou seja, pretendeu-se verificar se a variação na concentração da enzima afeta o parâmetro em análise. Com isto, deverá ser possível à empresa otimizar técnica e financeiramente os cocktails de enzimas usadas em algumas farinhas compostas que comercializa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório interno e na padaria experimental da Germen Moagem de Cereais (Senhora da Hora, Matosinhos).

O estudo proposto teve como objetivo o estudo do efeito das enzimas nas propriedades reológicas de uma farinha panificável em laboratório, através da determinação de parâmetros alveográficos e farinográficos e em padaria experimental através da determinação do volume específico do pão. Foram utilizadas amostras com concentrações de enzima diferentes e avaliados os parâmetros em estudo, tendo em vista perceber como a variação da concentração das enzimas influencia a variação dos parâmetros reológicos da farinha e de qualidade do pão. Estas concentrações foram definidas tendo em conta informação disponibilizada pelos fornecedores de enzimas da Germen.

Neste capítulo descrevem-se os procedimentos usados no laboratório e na padaria para a obtenção dos dados pretendidos. Abaixo apresenta-se um esquema representativo do planeamento geral do trabalho prático.

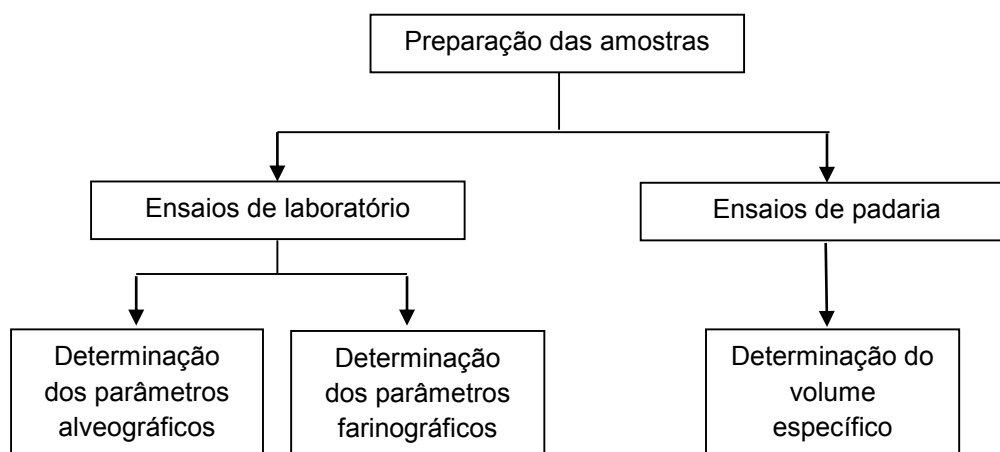


Figura 4.1 - Representação esquemática do planeamento geral do trabalho prático.

4.2 Ensaio prévios à resolução do trabalho prático

Antes de dar início ao estudo propriamente dito foi necessário validar os resultados dos ensaios de laboratório. Para isso, durante aproximadamente 1 mês, foram realizados ensaios paralelos àqueles realizados rotineiramente no laboratório. O estudo da reprodutibilidade baseou-se então na comparação dos resultados obtidos por mim com os de uma técnica do laboratório para a mesma amostra. Usou-se como critério o valor estatístico *z-score* determinado pela fórmula $z - score = \frac{X - \mu}{\sigma}$ onde X é o valor obtido, μ é a média e σ é o desvio padrão. Este deve estar entre -2 e 2 para o resultado se considerar válido (RELACRE, 1996); um valor positivo ou negativo indica o desvio relativamente à média.

No caso dos resultados dos ensaios alveográficos usou-se ainda um outro critério definido na antiga norma NP 3181 que estabelece coeficientes de variação para os valores de W (8%), P (8%) e G (5%) (NP 3181, 1986).

Os resultados destes ensaios encontram-se no Apêndice A. O valor de z-score obtido foi 0,71 e -0,71 encontrando-se este dentro do intervalo definido como válido. Para os resultados alveográficos os valores do coeficiente de variação encontram-se na sua maioria dentro dos limites, tendo-se considerado os resultados válidos (2/27 resultados não válidos para o valor de W; 4/27 resultados não válidos para o valor de P; 6/27 resultados não válidos para o valor de G).

4.3 Materiais

4.3.1 Preparação das amostras

A preparação das amostras consistiu na mistura de farinha estreme (farinha de trigo tipo 65) com as enzimas nas quantidades pretendidas (concentrações usadas descritas na tabela 4.1). A farinha foi pesada numa balança semi-analítica (Mettler Toledo, EUA) e as enzimas foram pesadas numa balança analítica (Mettler Toledo, EUA). Foram preparados 4 kg de amostra de forma a ter quantidade suficiente para a realização de todos os ensaios previstos. As misturas foram depois homogeneizadas num homogeneizador (Fuchs, Suíça).

Tabela 4.1 - Concentração das enzimas utilizadas na preparação de cada amostra de farinha.

ENZIMA	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ppm (mg/kg)
Amilase	AM05	5
	AM12	12
	AM20	20
Xilanase	XL25	25
	XL40	40
	XL65	65
Glucose-oxidase	GO04	4
	GO08	8
	GO14	14
Fosfolipase	FL08	8
	FL15	15
	FL30	30

4.3.2 Ensaios de laboratório

Para a resolução dos ensaios de laboratório foram utilizadas as amostras previamente preparadas. De cada amostra foi realizado um ensaio alveográfico e um ensaio farinográfico. Para os ensaios farinográficos foi usada água destilada e para os ensaios alveográficos foi usada uma solução de NaCl 2,5%. Foram realizados ensaios alveográficos e farinográficos à farinha sem adição de enzima sendo considerada esta a amostra controlo.

4.3.3 Ensaios de padaria

Para os ensaios de padaria foram utilizados os seguintes ingredientes: farinha estreme tipo 65 (Germen) e as amostras preparadas previamente com as diferentes concentrações das enzimas; sal (Benzina, Portugal), melhorante de panificação Germix (Germen; ingredientes: farinha de trigo, emulsionante E472e, antiaglomerante E170, agente de tratamento de farinha E300, enzimas e regulador de acidez E341(i)), levedura fresca (Lallemand, Canadá) e água.

4.4 Métodos

4.4.1 Ensaios de laboratório

Nos ensaios de laboratório foram usados os métodos farinográfico e alveográfico. Estes testes reológicos estudam o comportamento da massa e são realizados em equipamentos específicos, utilizando uma pequena quantidade de massa constituída por farinha e água ou solução salina no caso do ensaio alveográfico.

Durante o processo de formação da massa, os componentes da farinha deixam de atuar individualmente e modificam as suas propriedades mecânicas e plásticas. A massa apresenta-se como um material viscoelástico, combinando simultaneamente propriedades dos sólidos – elasticidade – e propriedades dos líquidos – viscosidade (Instituto de Ciência e Tecnologia d Alimentos - ICTA).

Foi realizado um ensaio de cada método por amostra e dois ensaios da amostra controlo (sem enzima), um no início do estudo e outro sensivelmente a meio para perceber se existiam alterações significativas ao longo do tempo durante o armazenamento, tendo-se considerado a média dos dois resultados.

Para ambos os métodos é necessária a determinação prévia da humidade das amostras.

4.4.1.1 Determinação da humidade

Humidade ou teor de água de cereais ou produtos cerealíferos é definido na norma NP 516:2000 como a “perda de massa, expressa em percentagem, sofrida pelo produto nas condições descritas” na referida norma (NP 516, 2000).

A humidade foi determinada segundo o método interno (M.I. Nº 01 – Cereais e produtos cerealíferos – determinação do teor de água pelo método rápido), que descreve um processo prático mais rápido do que o método de referência descrito na norma NP 516:2000 – Cereais e derivados – determinação do teor de água, método prático de referência (que tem como referência a norma internacional ISO 711 – *Cereal and cereal products – determination of moisture content, basic reference method*).

O procedimento resume-se à secagem de uma porção de amostra (4-4,800 g com aproximação de 0,001 g) a uma temperatura de 145 °C, utilizando uma balança de alcance máximo de 310 g, divisão 0,001 g/0,01 g e classe de exatidão II. A determinação do teor de água das amostras é realizado em duplicado e, se a diferença absoluta entre os dois resultados for superior ao limite de repetibilidade r , repete-se o resultado até que este requisito seja satisfeito. A repetibilidade r define-se como sendo a

diferença absoluta entre os resultados de duas determinações independentes, obtidas usando o mesmo método, sobre idêntico material a testar no mesmo laboratório, pelo mesmo operador e sobre equipamentos iguais e executados dentro de um curto intervalo de tempo e deve ser inferior a 0,20% (MI N°1). O conteúdo em humidade da farinha de trigo estipulado pela legislação em vigor é de 14,5% (Portaria nº 254/2003, 2003).

4.4.1.2 Ensaio Farinográfico

O ensaio farinográfico tem como objetivo a determinação da capacidade de absorção de água de farinhas e das características reológicas das respetivas massas obtidas. Este procedimento é registado pelo equipamento como resistência à amassadura e origina uma curva – diagrama força/tempo (Popper *et al.*, 2006).

O princípio de um ensaio farinográfico está relacionado com a mistura de água e farinha no recipiente do equipamento, formando-se uma massa que é depois desenvolvida e enfraquecida mecanicamente, levando à sua destruição por amassadura excessiva. Em termos práticos, a determinação da consistência (viscosidade) é importante para estabelecer a absorção de água de uma farinha, que significa a quantidade de água que tem de ser adicionada para se obter uma viscosidade de 500 UF (valor empírico que se pensa que garanta as melhores propriedades de processamento possíveis) (Popper *et al.*, 2006).

Absorção de água da farinha é definida como o “volume de água expresso em ml/100g de farinha a 14% (m/m) de humidade, necessário para produzir uma massa com o máximo de consistência de 500 UF, sob as condições operatórias especificadas nesta norma”. O procedimento consiste em medir e registar a consistência da massa durante a sua formação, desenvolvimento e enfraquecimento (NP 3653, 2000).

Para avaliar o comportamento da massa durante a amassadura foi então utilizado um farinógrafo (Brabender, Alemanha). Para isso, na amassadeira incorporou-se uma determinada quantidade de água e farinha e amassou-se a velocidade constante, registando-se a resistência que a massa oferece ao trabalho mecânico contínuo, em função do tempo.

Os parâmetros obtidos através deste ensaio foram:

1. Absorção de água (expressa em %): para uma amassadeira de 300 g é calculada através da fórmula $\frac{(\bar{V}_c + m - 300)}{3}$ onde \bar{V}_c é o volume de água adicionado (ml) para produzir uma curva com consistência máxima de 500 UF (tolerância de ± 20) e m é a massa (g) da toma para ensaio (dada pela tabela contida na norma NP 3653:2000 considerando o valor da humidade da farinha) tendo em conta a humidade da farinha (NP 3653, 2000).

2. Estabilidade (expressa em minutos): corresponde ao tempo entre o ponto onde o topo da curva intercepta primeiramente a linha de 500 UF e o ponto onde o topo da curva centra exatamente a linha dos 500 UF. Esta leitura pode ser feita na linha de 480 UF ou de 520 UF, através do traço de uma linha paralela à linha de 500 UF (NP 3653, 2000). A estabilidade fornece um indicativo da resistência

que a massa possui ao tratamento mecânico e ao tempo do processo fermentativo no fabrico de pão (Instituto de Ciência e Tecnologia d Alimentos - ICTA).

3. Tempo de desenvolvimento da massa – TDM (expresso em minutos): corresponde ao tempo decorrido desde o início da adição da água até ao ponto da curva, situado imediatamente antes dos primeiros sinais de decréscimo da consistência (NP 3653, 2000). Na prática, o tempo de desenvolvimento indica o tempo que o padeiro dispõe para determinar a quantidade da percentagem de absorção de água da farinha que esta a trabalhar, de modo a deixar a massa com a consistência ideal para o fabrico de pães (Instituto de Ciência e Tecnologia d Alimentos - ICTA).

4. Índice de tolerância à mistura – MTI (expresso em unidades farinográficas – UF): corresponde à diferença entre o topo da curva no pico e o topo da curva medido 5 minutos após o pico ser alcançado (Instituto de Ciência e Tecnologia d Alimentos - ICTA).

5. Amolecimento da massa – TMD: decréscimo da consistência da massa após 10 ou 20 minutos de mistura. Diferença entre a consistência ao tempo de desenvolvimento da massa (meio do diagrama no seu máximo) e a consistência (meio do diagrama) após 10 e 20 minutos (20 minutos é usado apenas para farinhas fortes com uma elevada estabilidade) da mistura em unidades farinográficas (Brabender, 1985). Este valor foi medido após 20 minutos de mistura para todos os ensaios.

4.4.1.3 Ensaio Alveográfico

O princípio do alveógrafo baseia-se no comportamento da massa, obtida da mistura de farinha e uma solução salina, avaliado durante a sua deformação. Um disco desta massa é submetido a uma corrente de ar constante, formando uma bolha que ao fim de uns segundos de acordo com a sua extensibilidade, rebenta; as mudanças na massa são medidas e registadas na forma de uma curva que se designa de alveograma (ISO 27971, 2008). O alveograma descreve o trabalho extensional da massa (W), entendido como a capacidade de retenção de gás. Numa interpretação mais profunda, a altura da curva (P) significa a resistência à extensão ou elasticidade e o comprimento (L) a extensibilidade; a resistência em função da extensibilidade (P/L) descreve as propriedades viscoelásticas da massa. A partir destes parâmetros é então possível determinar as características panificáveis de uma farinha de trigo (Popper *et al.*, 2006).

O procedimento completo encontra-se descrito na norma ISO 27971:2008 – *Cereals and cereal products — Common wheat (*Triticum aestivum* L.) — Determination of alveograph properties of dough at constant hydration from commercial or test flours and test milling methodology*, abaixo representado de uma forma simples.



Tabela 4.2 - Etapas do método alveográfico (Chopin, 2006).

O método envolve uma extensão biaxial da amostra de massa (água, sal e farinha) que, pela ação de pressão de ar, desenvolve-se na forma de uma bolha. Este método de expansão simula a deformação da amostra de massa quando sujeita à influência da produção de gás de origem biológica ou química.

Para assegurar a repetibilidade e a reprodutibilidade dos resultados, a amostra é dividida em 5 sub-amostras idênticas, para análises sucessivas, sendo que se uma das curvas é nitidamente diferente das outras, em particular verificando-se um rebentamento prematuro da bolha, não deve ser tida em consideração nos resultados finais (Chopin, 2006).

Utilizando-se um alveógrafo (Chopin, França) preparou-se uma massa de farinha e solução de cloreto de sódio (2,5%) da qual se obtiveram 5 peças em forma de disco. A quantidade de solução a adicionar corresponde ao valor direto da humidade da farinha usando a pipeta própria do equipamento, já com o devido ajuste à tabela fornecida pela norma ISO 27971:2008. Após um período de repouso numa câmara de fermentação, cada uma das peças foi insuflada de ar, formando-se uma bolha que estendeu a massa até à sua rutura. Os parâmetros obtidos através deste ensaio foram:

1. Tenacidade – P (expressa em mm): corresponde à pressão máxima no interior da bolha e está relacionada com a resistência à deformação (rigidez). O valor de P é igual à média das ordenadas máximas, multiplicada por um fator $K=1,1$ (ISO 27971, 2008).

2. Extensibilidade – L (expressa em mm): corresponde à longitude da curva representada no alveograma (Método interno M.I. Nº 5 – Cereais e produtos cerealíferos – moenda de trigo para determinação das propriedades alveográficas com base na ISO 27971:2008).

3. Índice de Insuflação – G: Este valor corresponde à média dos índices de insuflação do alveograma e está relacionado com as abcissas de rutura “L” ($G = 2,226\sqrt{L}$) (Chopin, 2006).

4. Força da farinha – W (expressa em 10^{-4} J): representa a energia necessária para a deformação da bolha até à sua rutura e é representada pela área da curva do alveograma (Método interno M.I. Nº 5 – Cereais e produtos cerealíferos – moenda de trigo para determinação das propriedades alveográficas com base na ISO 27971:2008).

5. Relação tenacidade/extensibilidade – P/L: Esta relação é convencionalmente aceite por retratar o equilíbrio das curvas (Chopin, 2006).

6. Índice de elasticidade – I_e (expressa em %): Este valor retrata a razão existente entre a pressão na bolha após terem sido aplicados 200 cm^3 de ar e a pressão máxima P. Este volume de ar corresponde a um comprimento “L” de 40 milímetros ou a um índice de insuflação “G” de 14,1. Expressa-se em mmH_2O e é sempre inferior a 100%. Assim temos que $I_e(\%) = \frac{P_{200}}{P}$ (Chopin, 2006).

4.4.2 Ensaio de Padaria

4.4.2.1 Fabrico do pão

A receita utilizada para o fabrico dos pães encontra-se descrita no Apêndice J, bem como todo o procedimento efetuado em cada ensaio. Para cada amostra (incluindo uma amostra controlo – sem adição de enzima) foram produzidos 4 pães. As amostras da mesma enzima foram produzidas no

mesmo dia bem como uma amostra controlo, com o intuito de reduzir a variabilidade do processo relacionada com questões ambientais como temperatura e humidade que afetam o processo, e desta forma poder fazer uma comparação mais fiável.

Foi utilizado 1 kg de farinha, obtendo-se uma massa de aproximadamente 1,6 kg.

Os ingredientes foram pesados numa balança semi-analítica (Mettler Toledo, EUA) e de seguida misturados numa amassadeira (Fernetto, Portugal). O programa de amassadura teve a duração total de 9 minutos sendo que os primeiros 2 foram a uma velocidade mais lenta para homogeneização dos ingredientes e absorção da água e os restantes 7 a uma velocidade mais rápida para o trabalho mecânico da massa. Inicialmente foram misturados os ingredientes secos com exceção da levedura, adicionando-se a água após 10 segundos; a levedura foi adicionada após 4 minutos do início do programa.

De forma a perceber qual a variação em termos de temperatura e humidade existente no processo foi controlada a temperatura final da massa, a temperatura e humidade ambiente, a temperatura da água e a temperatura da farinha, usando um termómetro (Thermocoax, França) e um higrómetro (Sufft, Alemanha), apresentando-se estes resultados no Apêndice H. Decorrido o tempo de amassadura a massa foi dividida manualmente em porções de 400 g utilizando uma balança semi-analítica (Mettler Toledo, EUA). Cada uma das porções foi moldada manualmente e usando um equipamento próprio para enrolar a massa (Fernetto, Portugal) de forma a obter-se o formato desejado para colocar nas formas (formas de bolo inglês). As formas foram de seguida colocadas em estufa (Ramalhos, Portugal) por 75 minutos, de forma a haver crescimento do volume da massa. Após o tempo de fermentação em estufa (Ramalhos, Portugal), as formas foram colocadas no forno de lar (Ramalhos, Portugal) programado para 210 °C durante 15 minutos. Por fim, os pães foram desenformados e deixados a arrefecer durante 1 hora à temperatura ambiente antes de ser determinado o seu volume. Este procedimento encontra-se resumido no Apêndice J.

4.4.2.2 Determinação do volume específico

O volume do pão foi determinado utilizando o método de deslocamento de sementes. Foi medido o volume dos 4 pães e determinada a média dos volumes. O volume específico foi determinado pela equação $Ve = \frac{V}{m}$,

onde $Ve = \text{volume específico (cm}^3/\text{g)}$

$V = \text{volume da amostra (cm}^3)$

$m = \text{massa da amostra (g)}$

4.4.2.3 Outras determinações: cor da crosta e estrutura do miolo

A cor da crosta e a estrutura do miolo foram observadas apenas do ponto de vista sensorial sem recorrer a nenhuma metodologia analítica.

4.4.2.4 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos realizou-se com o software StatPlus (Macintosh, EUA). A relação entre a variação da concentração de cada enzima e a variação entre os parâmetros estudados em laboratório e padaria foi obtida pela determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de laboratório

Os resultados obtidos nos ensaios de laboratório encontram-se no Apêndice C (método farinográfico) e D (método alveográfico). De todos os parâmetros analisados nos métodos reológicos serão apenas analisados os mais importantes para a determinação das características da farinha, nomeadamente a absorção de água e a estabilidade e a tenacidade (P), extensibilidade (L), equilíbrio da curva (P/L) e força (W), para o método farinográfico e alveográfico, respetivamente. Abaixo encontram-se os gráficos representando estes resultados.

Os gráficos pretendem dar uma representação mais direta das variações encontradas para cada um dos parâmetros, não sendo, no entanto, o objetivo do trabalho comparar estes valores isoladamente, nem entre enzimas, nem entre concentrações da mesma enzima. Estes dados foram posteriormente tratados tendo-se obtido os coeficientes de correlação entre a variável concentração e cada um dos parâmetros, tratamento esse sim que será alvo de análise com vista a serem tiradas as conclusões previstas.

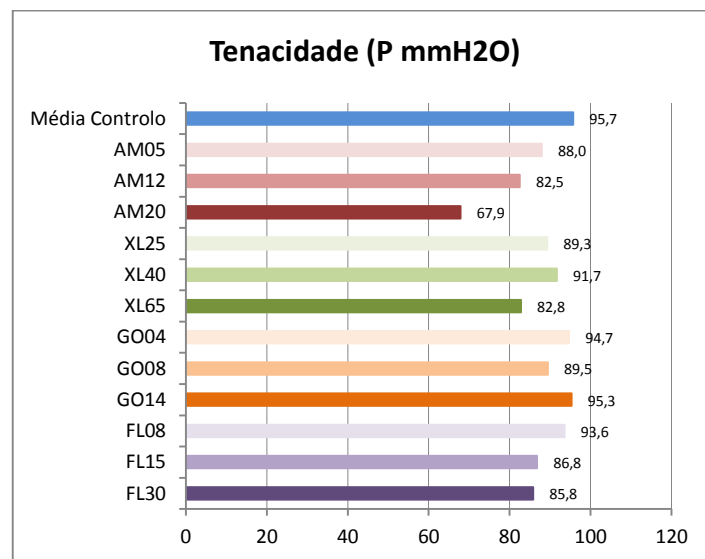


Figura 5.1 - Gráfico com os valores da tenacidade (P) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.

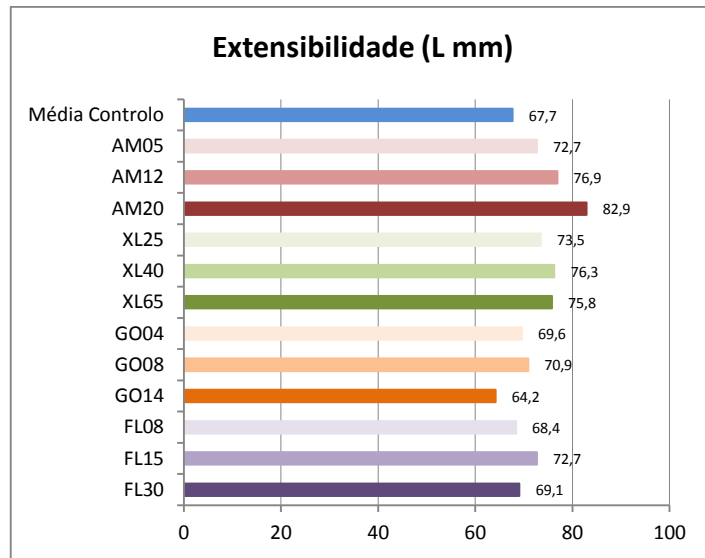


Figura 5.2 - Gráfico com os valores da extensibilidade (L) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.

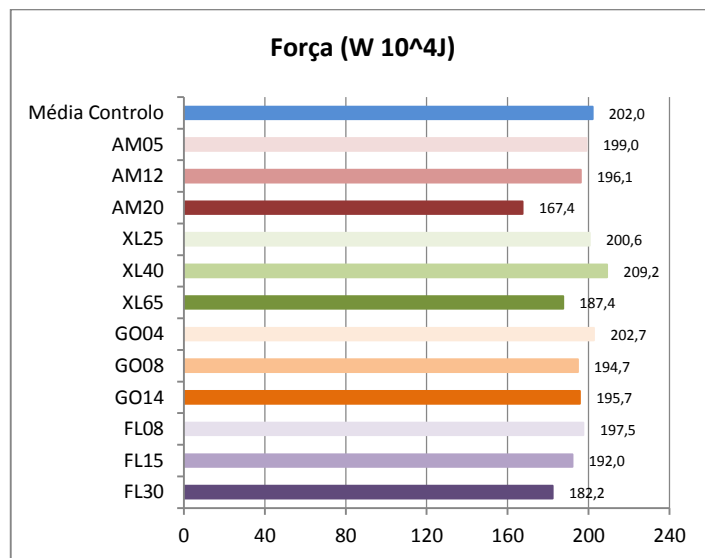


Figura 5.3 - Gráfico com os valores da força (W) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.

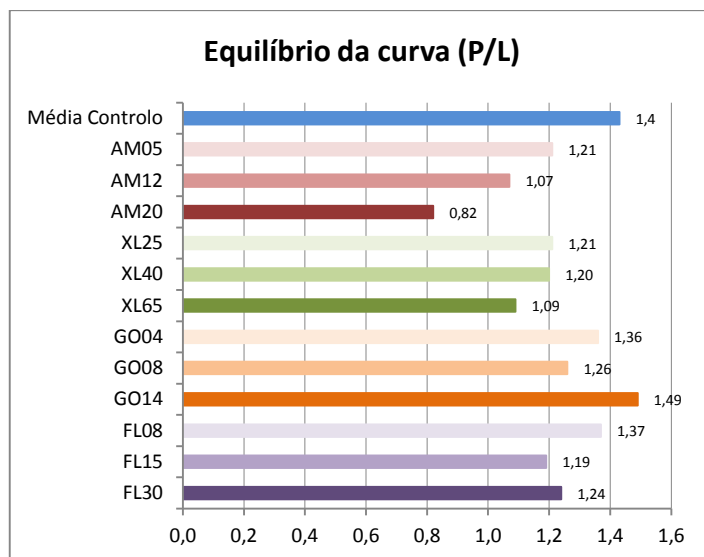


Figura 5.4 - Gráfico com os valores do equilíbrio da curva (P/L) obtidos pelo método alveográfico para cada uma das amostras.

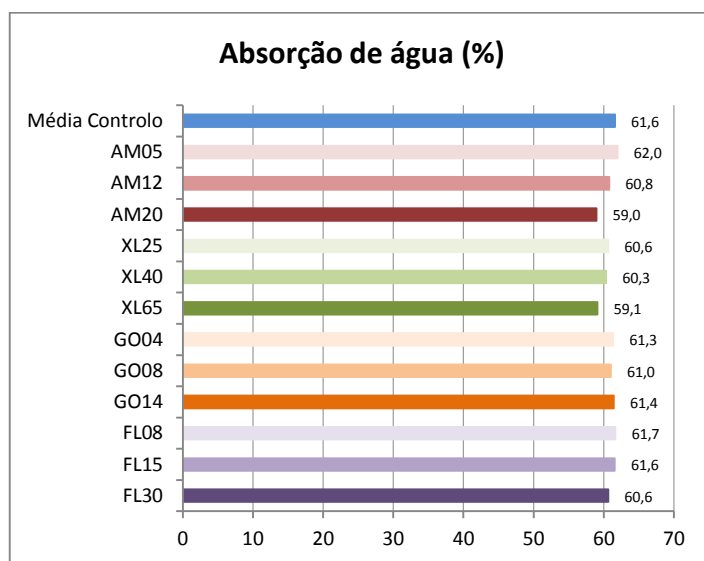


Figura 5.5 - Gráficos com os valores de absorção de água obtidos pelo método farinográfico para cada uma das amostras.

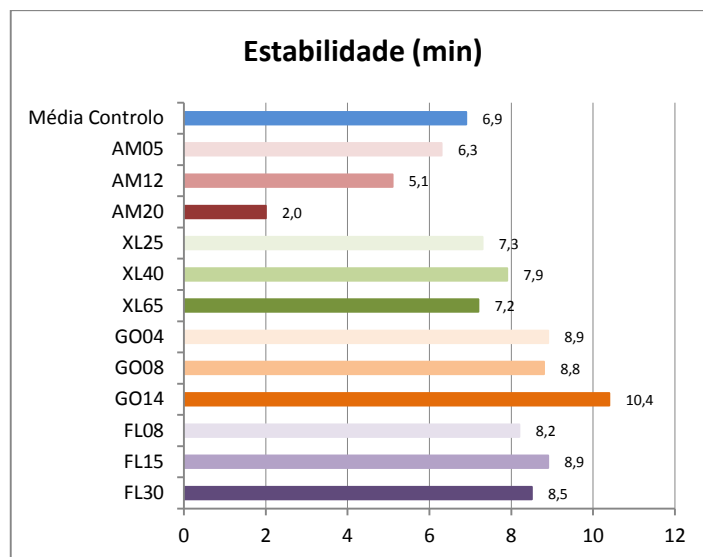


Figura 5.6 - Gráfico com os valores de estabilidade obtidos pelo método farinográfico para cada uma das amostras.

Como referido atrás, o objetivo do trabalho não era relacionar diretamente cada uma das concentrações com os parâmetros reológicos, mas sim perceber apenas se a sua variação afeta mais ou afeta menos o parâmetro em análise e como tal não foram realizadas réplicas dos ensaios. Para isso, foram determinadas as retas de regressão apresentadas no Apêndice E através das quais se consegue ter uma perceção da relação existente entre as variáveis. Para analisar com mais rigor essa relação foram calculados os coeficientes de correlação que se apresentam na tabela abaixo.

Tabela 5.1 - Coeficientes de correlação ensaios de laboratório.

Enzima	Tenacidade (P)	Extensibilidade (L)	Força (W)	Equilíbrio da curva (P/L)	Absorção de água	Estabilidade
Amilase	-0,99	1,00	-0,90	-0,99	-0,92	-0,97
Xilanase	-0,91	0,88	-0,55	-0,96	-0,99	0,42
Glu-oxidase	-0,19	-0,50	-0,80	0,21	-0,33	-0,94
Lípase	-0,91	0,34	-1,00	-0,77	-0,89	0,71

Da análise dos coeficientes de correlação obtidos pode-se então aferir acerca da relação entre a variação da concentração da enzima e a variação do parâmetro em causa.

Considerando-se significativo um coeficiente de correlação acima de 0,90 verifica-se que a variação na concentração da amilase é a que tem influência sobre mais parâmetros. Todos os parâmetros têm uma correlação negativa com a concentração à exceção da extensibilidade que tem uma correlação positiva, ou seja, quando a concentração aumenta a extensibilidade também aumenta. Por outro lado, a variação na concentração de lípase afeta menos os parâmetros analisados, tendo-se

obtido um coeficiente de correlação (negativo) superior a 0,90 apenas para o parâmetro estabilidade. A variação na concentração da lipase tem influência sobre a tenacidade e a força, apresentando um coeficiente de correlação negativo. A variação na concentração da xilanase tem influência sobre a tenacidade, sobre a relação entre tenacidade e extensibilidade (equilíbrio da curva) e sobre a absorção de água, apresentando um coeficiente de correlação negativo.

Por sua vez, a glucose-oxidase é a enzima que apresenta valores de correlação mais baixos, com exceção do parâmetro estabilidade. Tal indica que o valor da sua concentração tem uma menor influência sobre os parâmetros analisados.

Tendo em conta que a empresa usa a mistura destas enzimas nos cocktails que adiciona às farinhas compostas, estes resultados podem ser extremamente úteis para avaliar quais as otimizações a fazer se se pretender manipular determinada característica da farinha. Por exemplo, uma determinada farinha aditivada com um determinado cocktail tem de absorção de água x ; se a empresa pretender aumentar este valor sabe que provavelmente diminuindo a concentração de xilanase terá mais sucesso do que se alterar a concentração de qualquer uma das outras enzimas, uma vez que o coeficiente de correlação entre a concentração de xilanase e o parâmetro absorção de água é -0,99.

5.2 Ensaios de Padaria

5.2.1 Volume específico

Os resultados obtidos nos ensaios de padaria encontram-se no Apêndice D e no gráfico abaixo onde estão representadas as barras de erro (desvio padrão) para as 4 réplicas. As figuras 5.8 a 5.11 dão outra perceção dos resultados obtidos. Verifica-se que tendencialmente o volume do pão aumenta quando comparamos o “pão controlo”, com os pães elaborados com farinha adicionada de cada uma das enzimas. No entanto, para se poder avaliar rigorosamente qual o aumento do volume do pão com a adição das enzimas teria de se ter feito várias réplicas do ensaio. O objetivo do trabalho não era tirar conclusões relativamente à melhor concentração a usar, mas, tal como nos ensaios de laboratório, pretendia-se apenas perceber a extensão da variação no volume do pão com a variação da concentração da enzima.

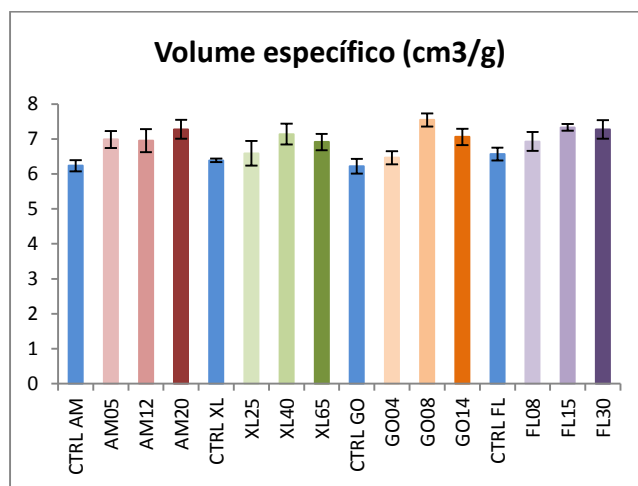


Figura 5.7 - Gráfico com os valores de volume específico do pão obtidos para cada amostra.

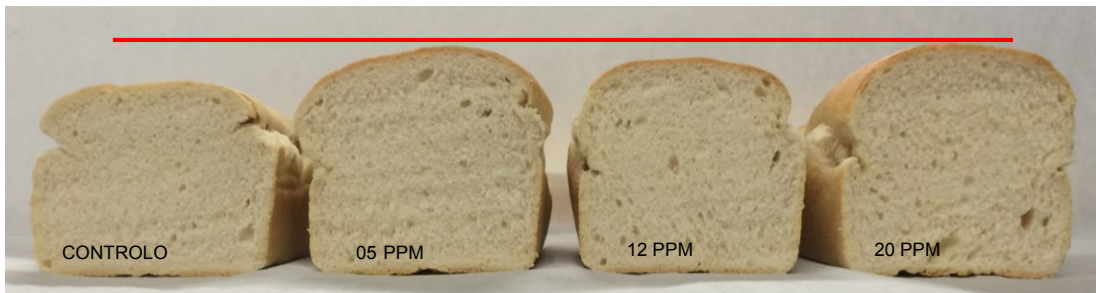


Figura 5.8 - Pães elaborados com farinha aditivada com α -amílase.

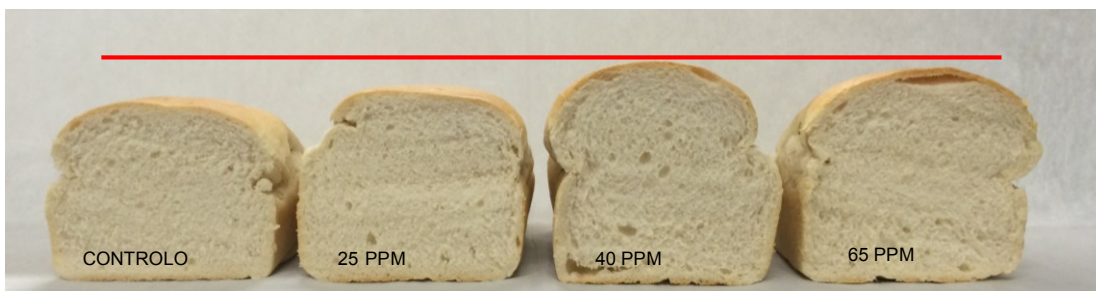


Figura 5.9 - Pães elaborados com farinha aditivada com xilanase.

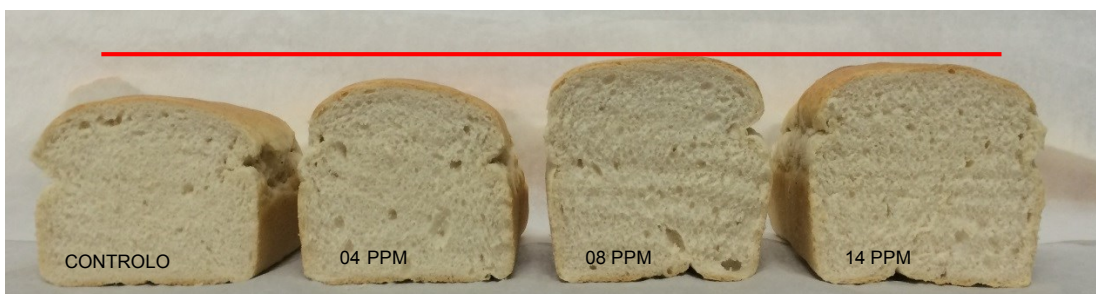


Figura 5.10 - Pães elaborados com farinha aditivada com glucose-oxidase.

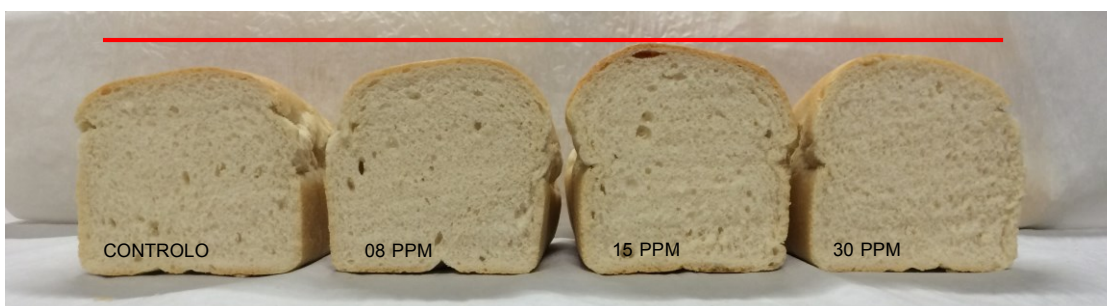


Figura 5.11 - Pães elaborados com farinha aditivada com fosfolipase.

Dos resultados obtidos calcularam-se os coeficientes de correlação apresentados abaixo. Para este cálculo não foram considerados os resultados do volume do “pão controle” uma vez que os coeficientes de correlação obtidos dessa forma eram extremamente baixos.

Tabela 5.2 - Coeficientes de correlação ensaios de padaria.

Enzima	Volume (cm ³ /g)
Amilase	0,68
Xilanase	0,99
Glu-oxidase	0,13
Lípase	-0,81

Da análise dos coeficientes de correlação obtidos pode-se aferir acerca da relação entre a variação da concentração da enzima e a variação do volume do pão; ou seja, quanto maior o coeficiente de correlação mais influência a alteração da concentração terá no volume do pão.

Considerando-se significativo um coeficiente de correlação acima de 0,90 verifica-se que a variação da concentração de xilanase é o que irá influenciar mais o volume do pão seguindo-se a concentração da lípase e da amilase. Uma alteração na concentração da glucose-oxidase praticamente não irá afetar o volume uma vez que o coeficiente de correlação é muito baixo. À exceção da lípase, todas as enzimas correlacionam-se positivamente com o volume o que quer dizer que o aumento da concentração leva ao aumento do volume do pão.

5.2.2 Outras determinações: cor da crosta e estrutura do miolo

5.2.2.1 Cor da crosta

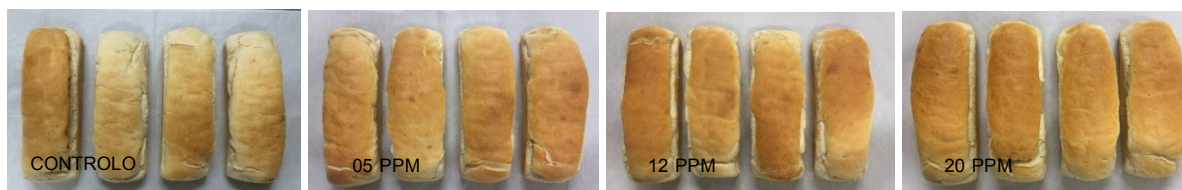


Figura 5.12 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com amilase.

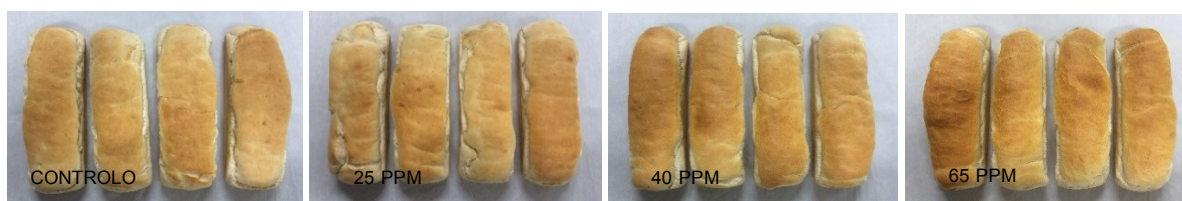


Figura 5.13 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com xilanase.

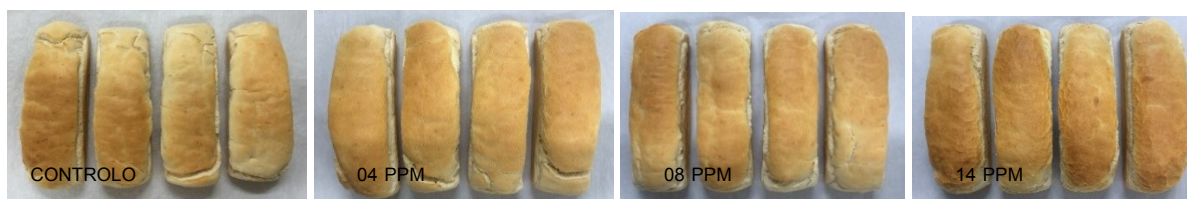


Figura 5.14 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com glucose-oxidase.

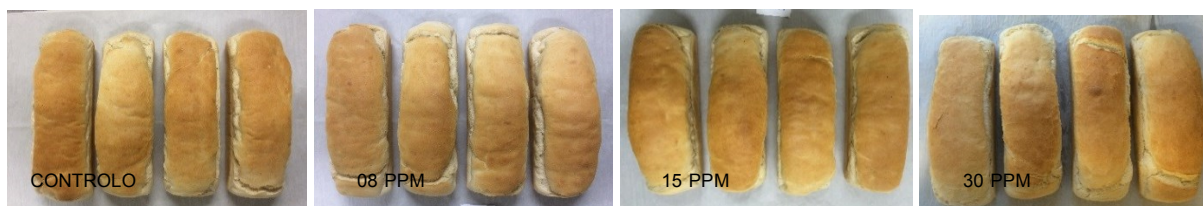


Figura 5.15 - Aspeto dos pães elaborados com farinha aditivada com fosfolipase.

Pela análise visual das fotografias dos pães nas figuras 5.12 a 5.15 pode verificar-se que a enzima que se nota ter um maior efeito na cor da crosta é a amilase. Este resultado era expectável uma vez que tal como desenvolvido na revisão bibliográfica sabe-se que a amilase ao hidrolisar a amilose e amilopectina do amido origina açúcares menores que vão participar posteriormente nas reações de Maillard e assim contribuir para o “acastanhamento” da crosta do pão. Seria importante no futuro utilizar um método analítico para poder avaliar com maior rigor as alterações na cor da crosta observadas.

5.2.2.2 Estrutura do miolo

Pela análise das figuras 5.8 a 5.11 apresentadas na secção 5.2.1 verifica-se que de modo geral, comparativamente com o pão controlo, há um aumento do tamanho dos alvéolos para todas as enzimas. Esta avaliação visual é, no entanto, bastante subjetiva, sendo necessária a utilização de métodos analíticos se se pretender tirar conclusões mais rigorosas.

6. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível verificar na prática a influência de algumas enzimas nos parâmetros reológicos da farinha e no volume do pão.

Foram estudadas algumas enzimas usadas pela Germen nos cocktails que fabrica para a produção de farinhas compostas, com vista a que a empresa possa otimizá-los quer do ponto de vista técnico quer do ponto de vista financeiro. Para isso foram realizados ensaios em laboratório e em padaria experimental tendo-se obtido resultados para cada um dos parâmetros em estudo para cada uma das concentrações para as diferentes enzimas. O objetivo principal do trabalho prático foi cumprido uma vez que os resultados permitiram tirar conclusões acerca da correlação existente entre a concentração das enzimas e os parâmetros reológicos e de padaria.

Verificou-se que das 4 enzimas estudadas, a variação da concentração da amilase é a que vai afetar mais características da farinha; um aumento da concentração desta enzima afeta negativamente, ou seja, leva à diminuição dos parâmetros considerados de maior interesse, nomeadamente a tenacidade, a extensibilidade, a relação entre a tenacidade e a extensibilidade, a absorção de água e a estabilidade. No que diz respeito ao volume do pão verificou-se que a enzima cuja variação da concentração mais afeta este parâmetro é a xilanase, concluindo-se que um aumento da concentração desta enzima irá influenciar positivamente o volume do pão.

De acordo com os interesses da empresa, esta deverá usar estes resultados para poder otimizar os seus cocktails e alterar a sua composição de forma a ir de encontro ao que pretende obter como produto final. Uma vez que não foi facultada a composição dos cocktails usados, não é possível especificar mais ao que na prática deve corresponder esta alteração.

Foi igualmente avaliada a alteração ao nível da cor da crosta e da estrutura do miolo. Esta avaliação foi apenas visual carecendo da utilização de um método analítico que permita tirar conclusões mais rigorosas acerca destas variações, que se sugere planear como trabalho futuro a desenvolver. Como é sabido, as enzimas possuem efeitos sinérgicos e o estudo do efeito dessa sinergia pode ser também tema de próximos trabalhos neste âmbito.

No que diz respeito ao estágio no global, este trabalho na Germen permitiu-me contactar com uma realidade industrial nova e adquirir conhecimentos específicos em produção de farinhas, farinhas corrigidas e farinhas compostas, e suas propriedades – ensaios reológicos em laboratório para determinação das características reológicas por meio de um Alveógrafo de Chopin e determinação da absorção de água e das características reológicas por meio de um Farinógrafo de Brabender – e no fabrico de pão numa padaria experimental, trazendo um grande contributo à minha formação na área da investigação alimentar.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados da validação dos ensaios de laboratório – método farinográfico

Técnico	Amostra Farinha Nº	H. (%)	vol (ml)	Abs (%)	Media	Desvp	Est (min)	Media	Desvp	TDM (min)	Media	Desvp	MTI (UF)	Media	Desvp	TMD (UF)	Media	Desvp
Técnico 1	1	13,7	175	58	58	0,00	1,6	1,8	0,28	0,9	0,8	0,14	70	60	14,14	130	125	7,07
Sofia			176	58			2			0,7			50			120		
Técnico 1	2	14,05	175	58,43	58,595	0,23	4,2	3,95	0,35	1,3	1,15	0,21	40	35	7,07	100	95	7,07
Sofia			176	58,76			3,7			1			30			90		
Técnico 2	3	13,85	180	60	60,1	0,14	7,5	7,5	0,00	1	1	0,00	40	30	14,14	120	120	0,00
Sofia			181	60,2			7,5			1			20			120		
Técnico 2	4	14	178	59,33	59,315	0,02	8	8,15	0,21	1	2,35	1,91	30	25	7,07	100	95	7,07
Sofia			178	59,3			8,3			3,7			20			90		
Técnico 2	5	14,05	178	59,43	59,43	0,00	8	7,65	0,49	1	1,1	0,14	30	35	7,07	120	105	21,21
Sofia			178	59,43			7,3			1,2			40			90		
Técnico 2	6	14,05	192	64	64,165	0,23	9,5	8,45	1,48	4	4	0,00	40	40	0,00	70	75	7,07
Sofia			193	64,33			7,4			4			40			80		
Técnico 2	7	13,7	180	59,9	59,9	0,00	4	3,9	0,14	0,5	0,65	0,21	50	45	7,07	120	120	0,00
Sofia			181	59,9			3,8			0,8			40			120		
Técnico 2	8	13,9	177	58,9	58,73	0,24	8	8,25	0,35	1	1	0,00	30	30	0,00	110	110	0,00
Sofia			176	58,56			8,5			1			30			110		
Técnico 2	9	13,75	179	59,43	59,765	0,47	6,5	6,8	0,42	1	1,7	0,99	40	25	21,21	110	105	7,07
Sofia			181	60,1			7,1			2,4			10			100		
Técnico 2	10	13,8	181	60,1	60,1	0,00	5,5	6,35	1,20	1	1,3	0,42	40	40	0,00	120	120	0,00
Sofia			181	60,1			7,2			1,6			40			120		
Técnico 2	11	13,8	180	59,77	59,77	0,00	5	4,8	0,28	1	0,85	0,21	50	55	7,07	120	125	7,07
Sofia			180	59,77			4,6			0,7			60			130		
Técnico 2	12	13,5	180	59,43	59,6	0,24	6,5	6,6	0,14	0,5	0,85	0,49	50	40	14,14	150	145	7,07
Sofia			181	59,77			6,7			1,2			30			140		
Técnico 2	13	14	180	60	60	0,00	8	7,55	0,64	4	4,1	0,14	20	20	0,00	110	105	7,07
Sofia			180	60			7,1			4,2			20			100		
Técnico 2	14	13,95	180	60	60	0,00	5,5	5,25	0,35	1	1,3	0,42	40	40	0,00	100	100	0,00
Sofia			180	60			5			1,6			40			100		
Técnico 2	15	13,7	181	60,1	60,265	0,23	7	6,65	0,49	1	1,15	0,21	40	35	7,07	140	140	0,00
Sofia			182	60,43			6,3			1,3			30			140		
Técnico 1	16	13,8	180	59,77	59,77	0,00	8,2	7,95	0,35	5,4	5,8	0,57	20	20	0,00	90	95	7,07
Sofia			180	59,77			7,7			6,2			20			100		
Técnico 1	17	13,65	179	59,33	59,83	0,71	4,4	5,45	1,48	0,8	1,35	0,78	40	35	7,07	150	140	14,14
Sofia			182	60,33			6,5			1,9			30			130		
Técnico 2	18	14,4	178	59,8	59,8	0,00	5,5	4,55	1,34	1	1	0,00	50	62,5	17,68	130	135	7,07
Sofia			178	59,8			3,6			1			75			140		
Técnico 2	19	13,9	180	59,9	59,9	0,00	4	4,8	1,13	0,5	1,05	0,78	40	35	7,07	140	140	0,00
Sofia			180	59,9			5,6			1,6			30			140		
Técnico 2	20	14	180	60	60,165	0,23	8,5	8	0,71	4	5	1,41	50	35	21,21	100	100	0,00
Sofia			181	60,33			7,5			6			20			100		
Técnico 2	21	14,5	192	64	64	0,00	9	8,5	0,71	5	4,5	0,71	45	37,5	10,61	70	75	7,07
Sofia			192	64			8			4			30			80		
Técnico 2	22	13,85	180	59,9	59,9	0,00	7,5	7,55	0,07	3,5	4,25	1,06	50	35	21,21	100	95	7,07
Sofia			180	59,9			7,6			5			20			90		
Técnico 2	23	13,95	180	60	60	0,00	8	7,95	0,07	4	4,35	0,49	20	20	0,00	120	105	21,21
Sofia			180	60			7,9			4,7			20			90		
Técnico 2	24	13,45	182	60,1	60,1	0,00	2	2,75	1,06	0,5	0,95	0,64	60	50	14,14	160	145	21,21
Sofia			182	60,1			3,5			1,4			40			130		

APÊNDICE B – Resultados da validação dos ensaios de laboratório – método alveográfico

Técnico	Amostra Farinha N°	H (%)	P (mmH2O)	Media	Desvp	L (mm)	Media	Desvp	G	Media	Desvp	W (10 ⁻⁴ J)	Media	Desvp	P/L	Media	Desvp	le (%)	Media	Desvp	p (mm)	Media	Desvp
Técnico 2	1	13,8	86,8	88	1,70	70,3	69,4	1,34	18,7	18,6	0,21	190,4	191	0,28	1,24	1,27	0,04	41,8	41,4	0,64	24,4	24,6	0,21
Sofia			89,2			68,4			18,4			190,8			1,30			40,9			24,7		
Técnico 2	2	14,05	87,5	86	2,12	81,6	78,9	3,89	20,1	19,8	0,49	231,0	222	13,36	1,07	1,09	0,03	48,6	48,3	0,42	28,3	28,3	0,07
Sofia			84,5			76,1			19,4			212,1			1,11			48,0			28,2		
Técnico 1	3	14,15	101,2	105	5,23	103,4	98,6	6,79	22,6	22,1	0,71	315,9	315	1,98	0,98	1,07	0,13	50,2	49,7	0,78	29,2	30,5	1,77
Sofia			108,6			93,8			21,6			313,1			1,16			49,1			31,7		
Técnico 1	4	14,4	102,5	103	0,64	110,7	103	10,61	23,4	22,6	1,13	352,7	339	19,73	0,93	1,01	0,11	53,2	53,5	0,35	32,0	33,5	2,12
Sofia			103,4			95,7			21,8			324,8			1,08			53,7			35,0		
Técnico 3	5	14,05	87,1	90,9	5,30	81,3	79,2	2,97	20,1	19,8	0,42	216,8	224	10,75	1,07	1,15	0,11	44,8	45,4	0,78	24,8	26,9	2,90
Sofia			94,6			77,1			19,5			232			1,23			45,9			28,9		
Técnico 1	6	14,1	96,4	101	6,86	107,1	100	9,62	23	22,3	1,06	306,4	304	3,61	0,9	1,02	0,16	50,1	49,1	1,41	27	28,9	2,62
Sofia			106,1			93,5			21,5			301,3			1,13			48,1			30,7		
Técnico 1	7	14,15	101,8	104	3,18	105,6	107	2,19	22,9	23,1	0,21	325,3	328	4,31	0,96	0,97	0,01	51,1	49,8	1,91	29,3	28,6	0,99
Sofia			106,3			108,7			23,2			331,4			0,98			48,4			27,9		
Técnico 1	8	13,85	98,9	100	2,05	104,1	101	4,88	22,7	22,3	0,57	303,2	304	0,99	0,95	1	0,07	48,9	49,4	0,71	27,2	28,8	2,19
Sofia			101,8			97,2			21,9			304,6			1,05			49,9			30,3		
Técnico 3	9	13,65	95,8	99,6	5,37	99,8	97,7	2,97	22,2	22	0,28	275,3	285	13,44	0,96	1,02	0,08	46,8	47,3	0,71	24,3	26,1	2,47
Sofia			103,4			95,6			21,8			294,3			1,08			47,8			27,8		
Técnico 3	10	14	91,7	90	2,47	78,1	76,9	1,70	19,7	19,6	0,21	222,3	216	9,62	1,18	1,18	0,01	44,6	44,4	0,28	26,1	25,8	0,42
Sofia			88,2			75,7			19,4			208,7			1,17			44,2			25,5		
Técnico 3	11	13,85	104,9	106	1,34	88,9	92,2	4,60	21	21,4	0,49	293,5	300	9,76	1,18	1,15	0,04	49,4	49,0	0,64	31,3	30,3	1,41
Sofia			106,8			95,4			21,7			307,3			1,12			48,5			29,3		
Técnico 1	12	13,85	89,9	92	2,90	73,7	71,1	3,75	19,1	18,8	0,49	201,7	202	0,07	1,22	1,3	0,11	41,6	41,4	0,35	23,6	24,7	1,48
Sofia			94			68,4			18,4			201,6			1,37			41,1			25,7		
Técnico 1	13	13,65	107,7	108	0,71	92	94,8	3,89	21,4	21,7	0,42	310	312	3,32	1,17	1,14	0,04	50,1	49,2	1,34	31,6	30,5	1,63
Sofia			108,7			97,5			22			314,7			1,11			48,2			29,3		
Técnico 1	14	14,65	87,6	89,3	2,33	70,3	68,4	2,69	18,7	18,4	0,42	194,8	194	0,71	1,25	1,31	0,08	42,7	42,3	0,57	25,5	26,2	0,99
Sofia			90,9			66,5			18,1			193,8			1,37			41,9			26,9		
Técnico 1	15	14,3	101	99	2,83	106,8	104	4,03	23	22,7	0,42	326,3	315	15,98	0,95	0,96	0,01	51,5	51,4	0,14	28,8	29,1	0,42
Sofia			97			101,1			22,4			303,7			0,96			51,3			29,4		
Técnico 2	26	13,9	87,5	87,7	0,21	73,8	73,9	0,07	19,1	19,1	0,00	195,4	197	2,55	1,18	1,19	0,01	41,3	41,7	0,57	23	23,5	0,64
Sofia			87,8			73,9			19,1			199			1,19			42,1			23,9		
Técnico 1	17	14,4	88,3	88	0,42	74,2	66,2	11,38	19,2	18,1	1,56	206,8	191	21,78	1,19	1,35	0,23	44,0	43,6	0,64	25,7	27,5	2,55
Sofia			87,7			58,1			17			176			1,51			43,1			29,3		
Técnico 1	18	14,1	88,1	92,6	6,29	71	68,6	3,46	18,8	18,5	0,49	195	200	7,50	1,24	1,36	0,16	41,9	41,8	0,21	24,4	26,1	2,40
Sofia			97			66,1			18,1			205,6			1,47			41,6			27,8		
Técnico 1	19	14,25	97,4	98	0,85	103,5	103	0,78	22,6	22,6	0,07	293,5	294	1,06	0,94	0,95	0,01	48,5	48,3	0,28	25,1	25,7	0,85
Sofia			98,6			102,4			22,5			295			0,96			48,1			26,3		
Técnico 1	20	13,85	82	84,2	3,11	82,8	80	4,03	20,3	19,9	0,57	200	202	2,90	0,99	1,06	0,09	43,0	43,3	0,35	21,5	22,6	1,56
Sofia			86,4			77,1			19,5			204,1			1,12			43,5			23,7		
Técnico 1	21	14,35	99	101	2,19	114,2	108	9,19	23,8	23,1	0,99	332	322	14,00	0,87	0,94	0,10	51,0	50,4	0,85	27,5	28,4	1,27
Sofia			102,1			101,2			22,4			312,2			1,01			49,8			29,3		
Técnico 1	22	13,95	91,6	93,8	3,11	84,8	84,5	0,49	20,5	20,5	0,07	232,1	238	8,49	1,08	1,11	0,04	44,5	44,8	0,42	24,5	25,4	1,20
Sofia			96			84,1			20,4			244,1			1,14			45,1			26,2		
Técnico 1	23	14,55	102,3	102	0,99	96,1	104	11,31	21,8	22,7	1,27	303,7	316	17,18	1,07	0,99	0,12	50,1	50,0	0,21	30	28,8	1,77
Sofia			100,9			112,1			23,6			328			0,9			49,8			27,5		
Técnico 1	24	13,65	92,8	96,2	4,81	70,6	65,8	6,86	18,7	18,1	0,92	203,3	203	0,99	1,31	1,48	0,23	50,1	50,0	0,21	30	28,8	1,77
Sofia			99,6			60,9			17,4			201,9			1,64			49,8			27,5		
Técnico 1	25	13,5	94	99,5	7,78	74,2	68,6	7,92	19,2	18,5	1,06	219,4	218	1,70	1,27	1,47	0,28	44,0	42,9	1,63	27,1	29,4	3,18
Sofia			105			63			17,7			217			1,67			41,7			31,6		
Técnico 1	26	13,65	92,7	93,2	0,64	79,3	82,9	5,09	19,8	20,3	0,64	234,9	240	7,50	1,17	1,13	0,06	46,9	46,4	0,78	28,7	27,6	1,56
Sofia			93,6			86,5			20,7			245,5			1,08			45,8			26,5		
Técnico 1	27	13,9	99,9	102	3,39	105,8	106	0,57	22,9	23	0,07	322,8	324	2,19	0,94	0,96	0,03	51,7	50,5	1,77	29,1	28,7	0,64
Sofia			104,7			106,6			23			325,9			0,98			49,2			28		

APÊNDICE C – Resultados dos ensaios de laboratório – método farinográfico

		Humidade (%)			Qtd (g)	Volume (ml)	Absorção de Água (%)	Estabilidade (min)	Tempo de Desenvolvimento da Massa (min)	Índice de Tolerância à Mistura (UF)	Amolecimento da Massa (UF)
		H1	H2	Média							
Controlo 1		13,5	13,5	13,5	298,3	188	62,1	6,8	5	50	90
Controlo 2		13,5	13,4	13,5	298,3	185	61,1	7,0	2	30	80
AMILASE	AM05	13,4	13,3	13,4	297,9	188	62,0	6,3	2,3	20	100
	AM12	13,4	13,5	13,5	298,3	184	60,8	5,1	3,2	50	120
	AM20	13,1	13,0	13,1	296,9	180	59,0	2,0	1,8	70	160
XILANASE	XL25	13,5	13,3	13,4	297,9	184	60,6	7,3	2,3	30	80
	XL40	13,7	13,6	13,7	299,0	182	60,3	7,9	2	10	80
	XL65	13,4	13,2	13,3	297,3	180	59,1	7,2	2,4	30	90
GLU-OX	GO04	13,6	13,8	13,7	299,0	185	61,3	8,9	2,3	20	60
	GO08	13,6	13,8	13,7	299,0	184	61,0	8,8	2,5	40	70
	GO14	13,8	13,7	13,8	299,3	185	61,4	10,4	2,5	10	60
LIPASE	FL08	13,6	13,7	13,7	299,0	186	61,7	8,2	2,5	20	90
	FL15	13,4	13,6	13,5	298,7	186	61,6	8,9	1,2	10	60
	FL30	13,3	13,4	13,4	297,9	184	60,6	8,5	1,6	20	60
Média Controlo				13,5		186,5	61,6	6,9	3,5	40,0	85,0
Desvp Controlo				0,0			0,7	0,1	2,1	14,1	7,1

APÊNDICE D – Resultados dos ensaios de laboratório – método alveográfico

		Humidade (%)			Qty (g)	Tenacidade P (mmH2O)	Extensibilidade L (mm)	Índice de Insuflação G (mm)	Força de Panificação W (10 ⁴ J)	Equilíbrio da curva P/L	Índice de Estabilidade Ie (%)	Pressão medida no momento de rutura da bolha p (mm)
		H1	H2	Média								
Controlo 1		13,5	13,5	13,5	298,3	101,5	62,8	17,6	203,5	1,62	39,4	28,1
Controlo 2		13,5	13,4	13,5	298,3	89,9	72,6	19,0	200,4	1,24	41,7	24,2
AMILASE	AM05	13,4	13,3	13,4	297,9	88,0	72,7	19,0	199,0	1,21	42,4	24,4
	AM12	13,4	13,5	13,5	298,3	82,5	76,9	19,5	196,1	1,07	43,7	23,4
	AM20	13,1	13,0	13,1	296,9	67,9	82,9	20,3	167,4	0,82	43,5	18,7
XILANASE	XL25	13,5	13,3	13,4	297,9	89,3	73,5	19,1	200,6	1,21	41,8	23,8
	XL40	13,7	13,6	13,7	299,0	91,7	76,3	19,4	209,2	1,20	41,4	23,2
	XL65	13,4	13,2	13,3	297,3	82,8	75,8	19,4	187,4	1,09	41,1	21,2
GLU-OX	GO04	13,6	13,8	13,7	299,0	94,7	69,6	18,6	202,7	1,36	40,4	25,0
	GO08	13,6	13,8	13,7	299,0	89,5	70,9	18,7	194,7	1,26	40,8	24,0
	GO14	13,8	13,7	13,8	299,3	95,3	64,2	17,8	195,7	1,49	40,4	27,1
LIPASE	FL08	13,6	13,7	13,7	299,0	93,6	68,4	18,4	197,5	1,37	40,1	24,9
	FL15	13,4	13,6	13,5	298,7	86,8	72,7	19,0	192,0	1,19	38	22,8
	FL30	13,3	13,4	13,4	297,9	85,8	69,1	18,5	182,2	1,24	37,2	23,0
Média Controlo				13,5		95,7	67,7	18,3	202,0	1,4	40,6	26,2
Desvp Controlo				0,0		8,2	6,9	1,0	2,2	0,3	1,6	2,8

APÊNDICE E – Retas de regressão dos resultados obtidos nos ensaios alveográfico e farinográfico para os parâmetros mais importantes na caracterização de uma farinha

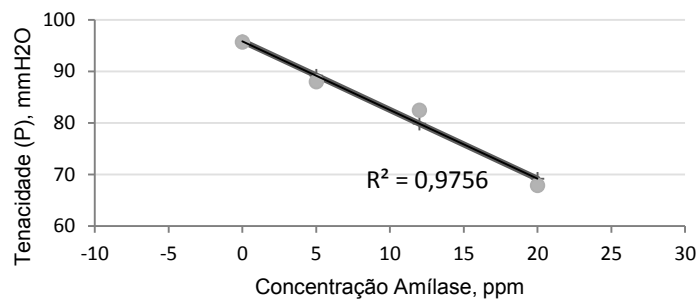


Figura 1 – Reta de regressão Tenacidade (P) vs Concentração da enzima amilase.

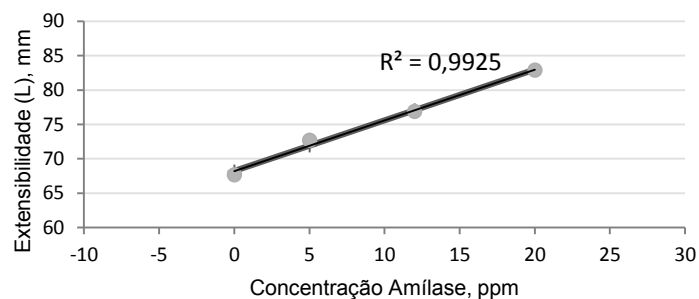


Figura 2 – Reta de regressão Extensibilidade (L) vs Concentração da enzima amilase.

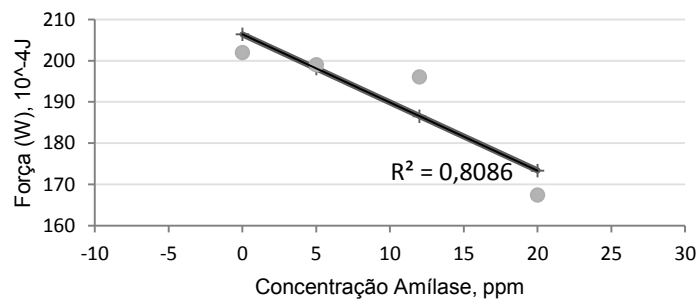


Figura 3 – Reta de regressão Força (W) vs Concentração da enzima amilase.

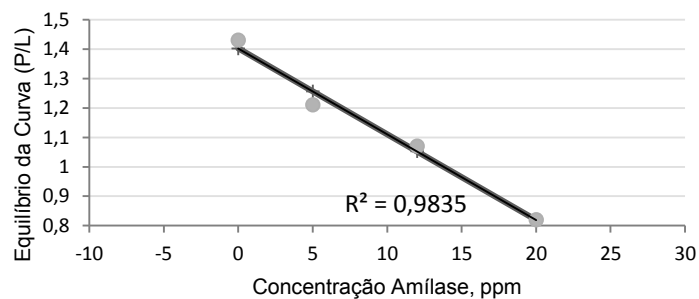


Figura 4 – Reta de regressão Equilíbrio da Curva (P/L) vs Concentração da enzima amilase.

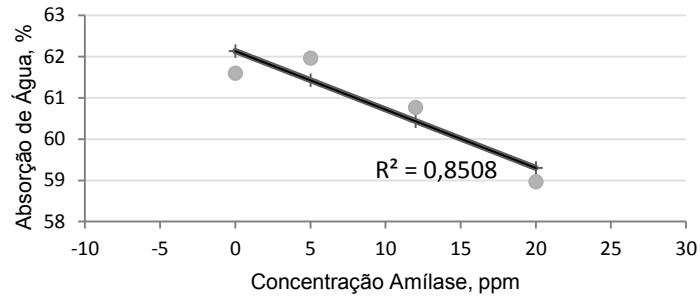


Figura 5 – Reta de regressão Absorção de Água vs Concentração da enzima amilase.

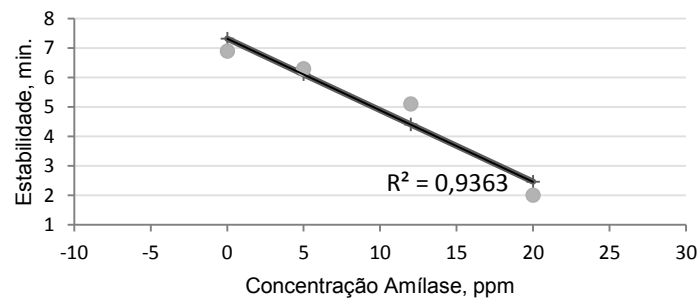


Figura 6 – Reta de regressão Estabilidade vs Concentração da enzima amilase.

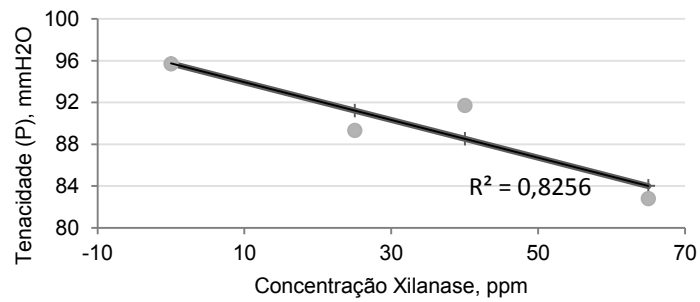


Figura 7 – Reta de regressão Tenacidade vs Concentração da enzima xilanase.

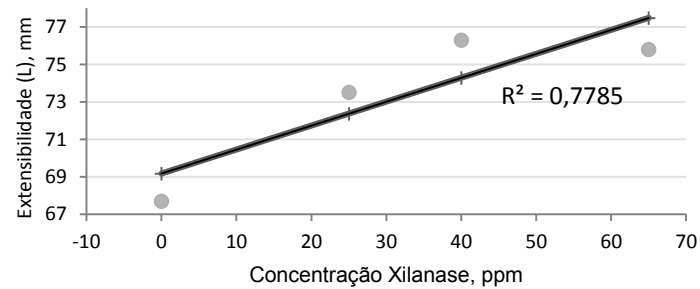


Figura 8 – Reta de regressão Extensibilidade vs Concentração da enzima xilanase.

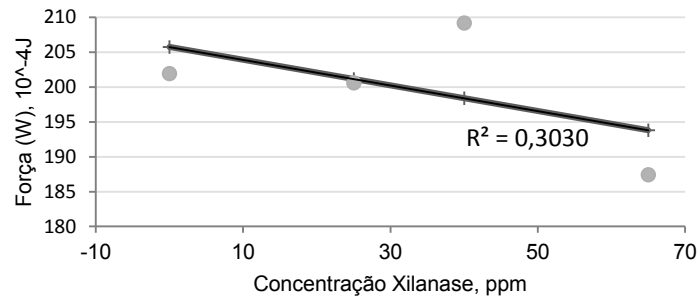


Figura 9 – Reta de regressão Força vs Concentração da enzima xilanase.

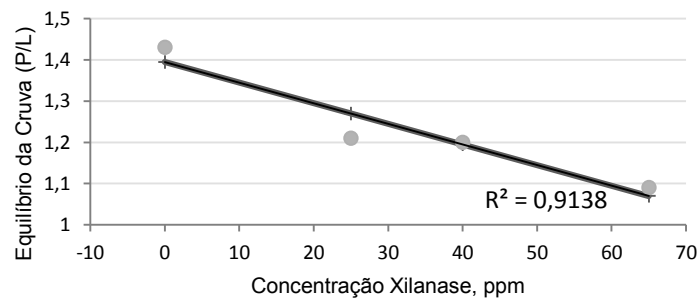


Figura 10 – Reta de regressão Equilíbrio da Curva vs Concentração da enzima xilanase.

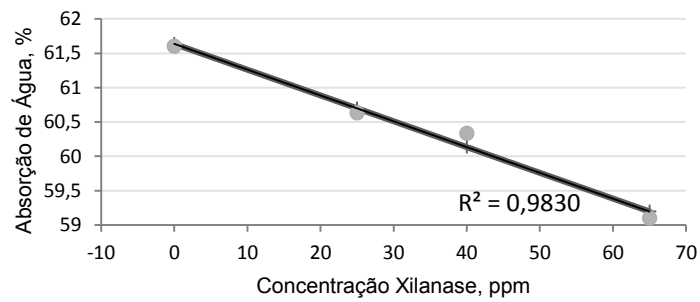


Figura 11 – Reta de regressão Absorção de Água vs Concentração da enzima xilanase.

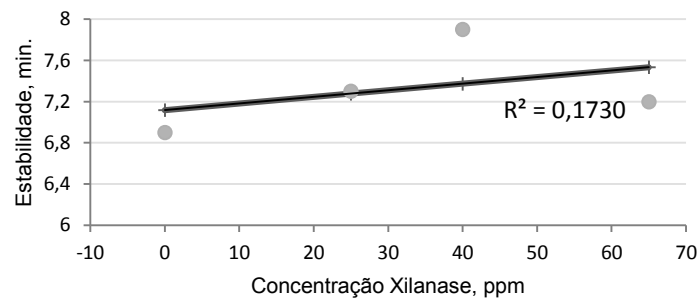


Figura 12 – Reta de regressão Estabilidade vs Concentração da enzima xilanase.

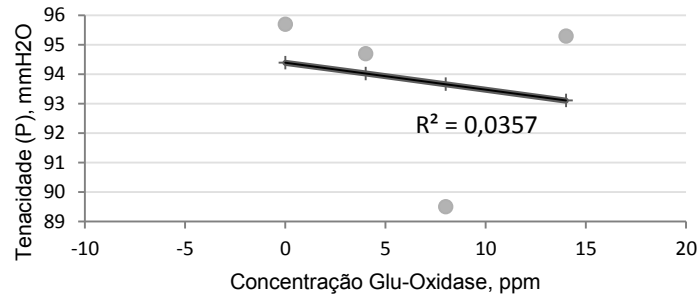


Figura 13 – Reta de regressão Tenacidade vs Concentração da enzima glucose-oxidase.

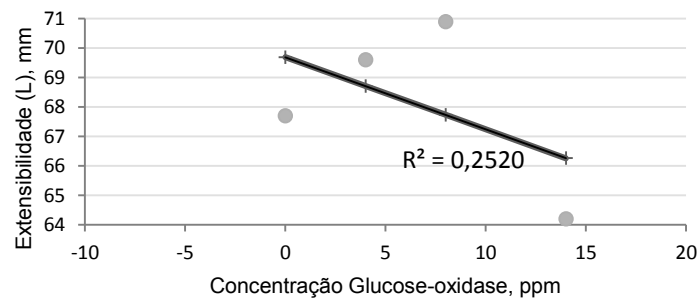


Figura 14 – Reta de regressão Extensibilidade vs Concentração da enzima glucose-oxidase.

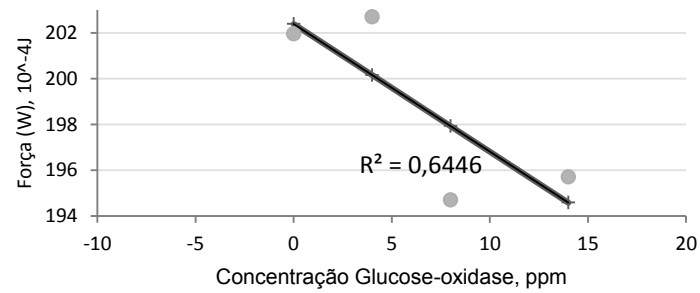


Figura 15 – Reta de regressão Força vs Concentração da enzima glucose-oxidase.

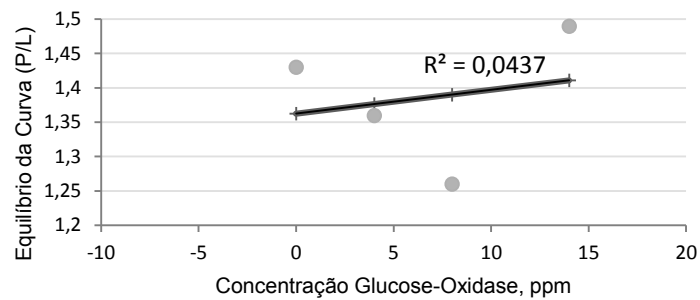


Figura 16 – Reta de regressão Equilíbrio da Curva vs Concentração da enzima glucose-oxidase.

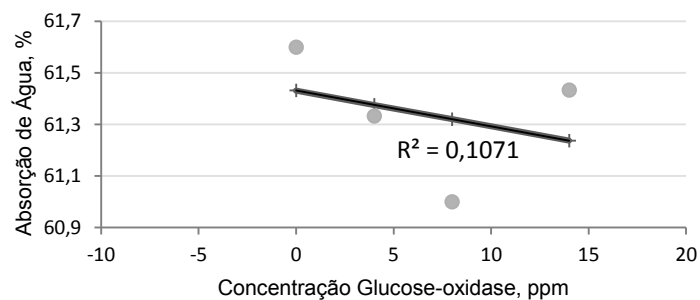


Figura 17 – Reta de regressão Absorção de Água vs Concentração da enzima glucose-oxidase.

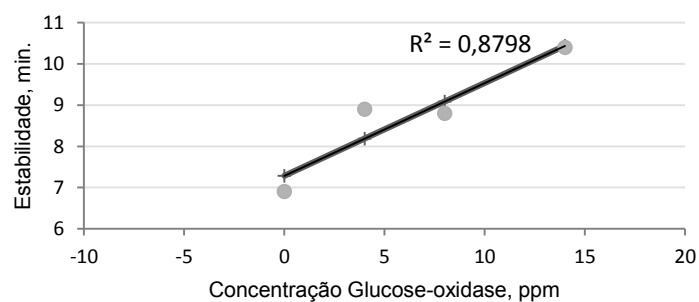


Figura 18 – Reta de regressão Estabilidade vs Concentração da enzima glucose-oxidase.

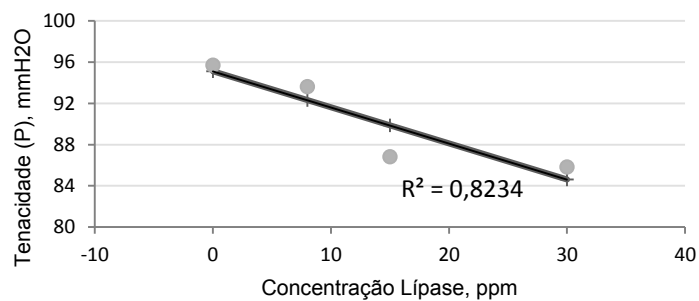


Figura 19 – Reta de regressão Tenacidade vs Concentração da enzima lipase.

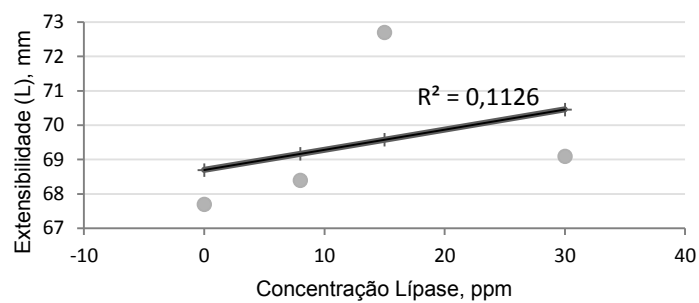


Figura 20 – Reta de regressão Extensibilidade vs Concentração da enzima lipase.

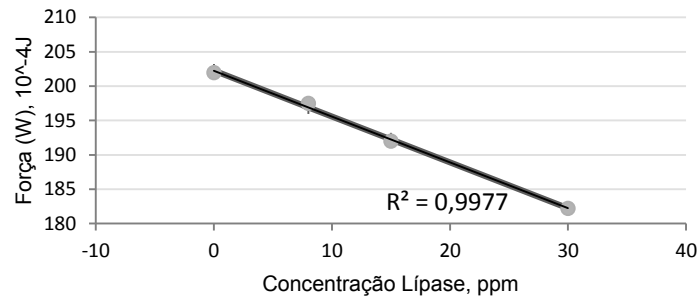


Figura 21 – Reta de regressão Força vs Concentração da enzima lípase.

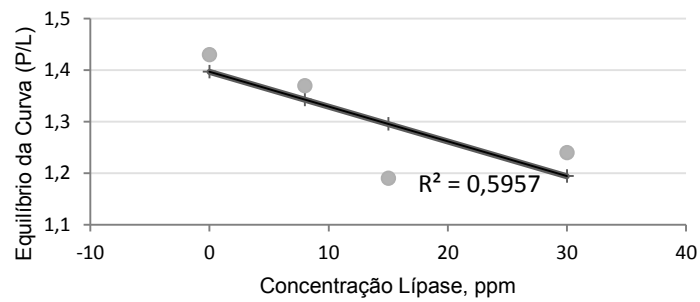


Figura 22 – Reta de regressão Equilíbrio da Curva vs Concentração da enzima lípase.

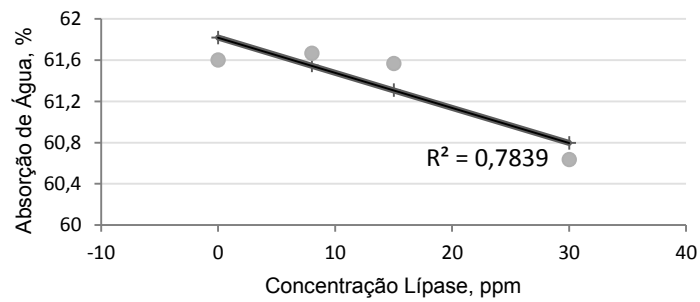


Figura 23 – Reta de regressão Absorção de Água vs Concentração da enzima lípase.

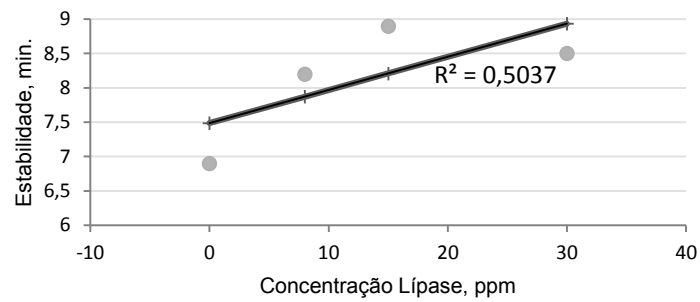
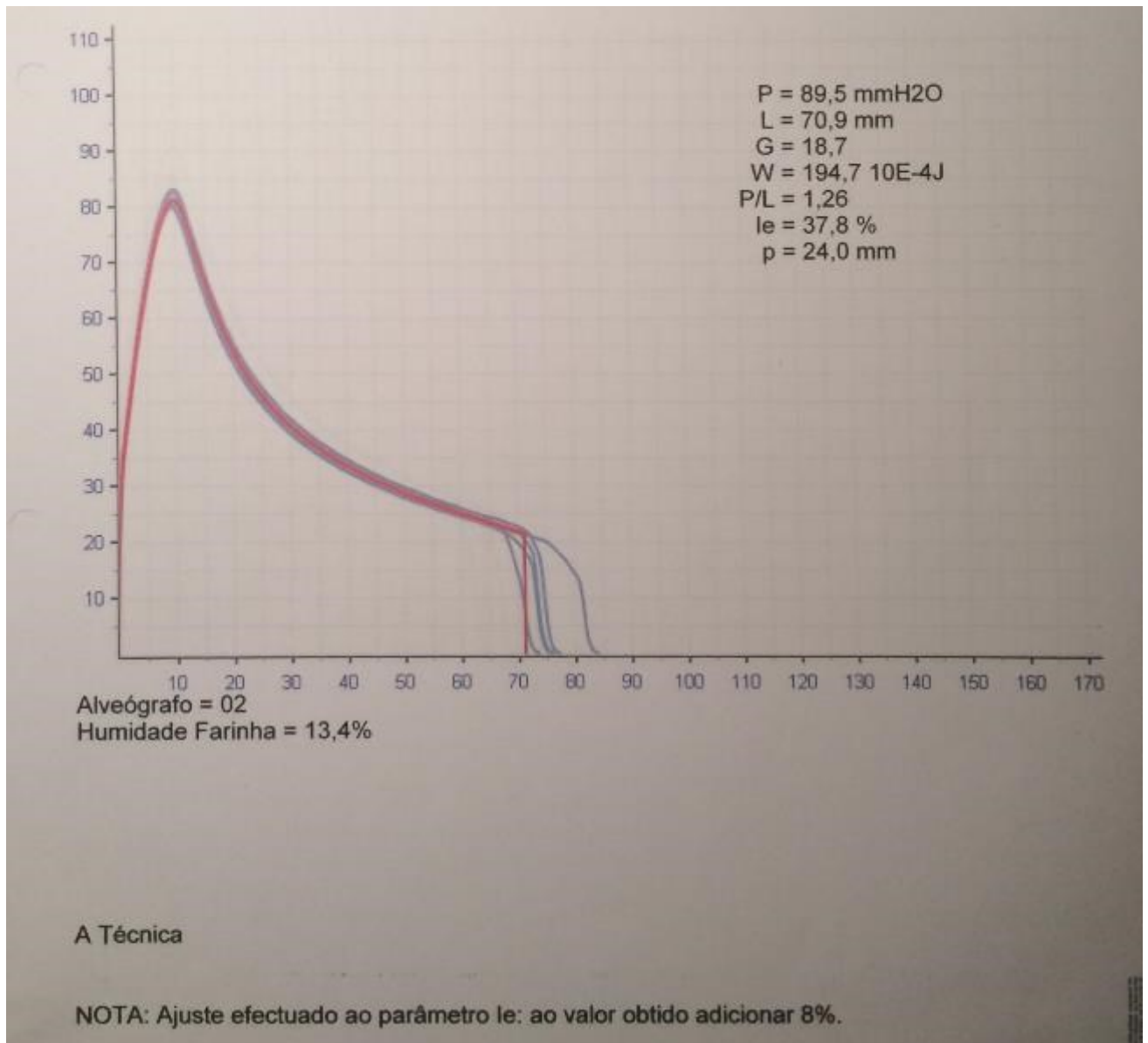
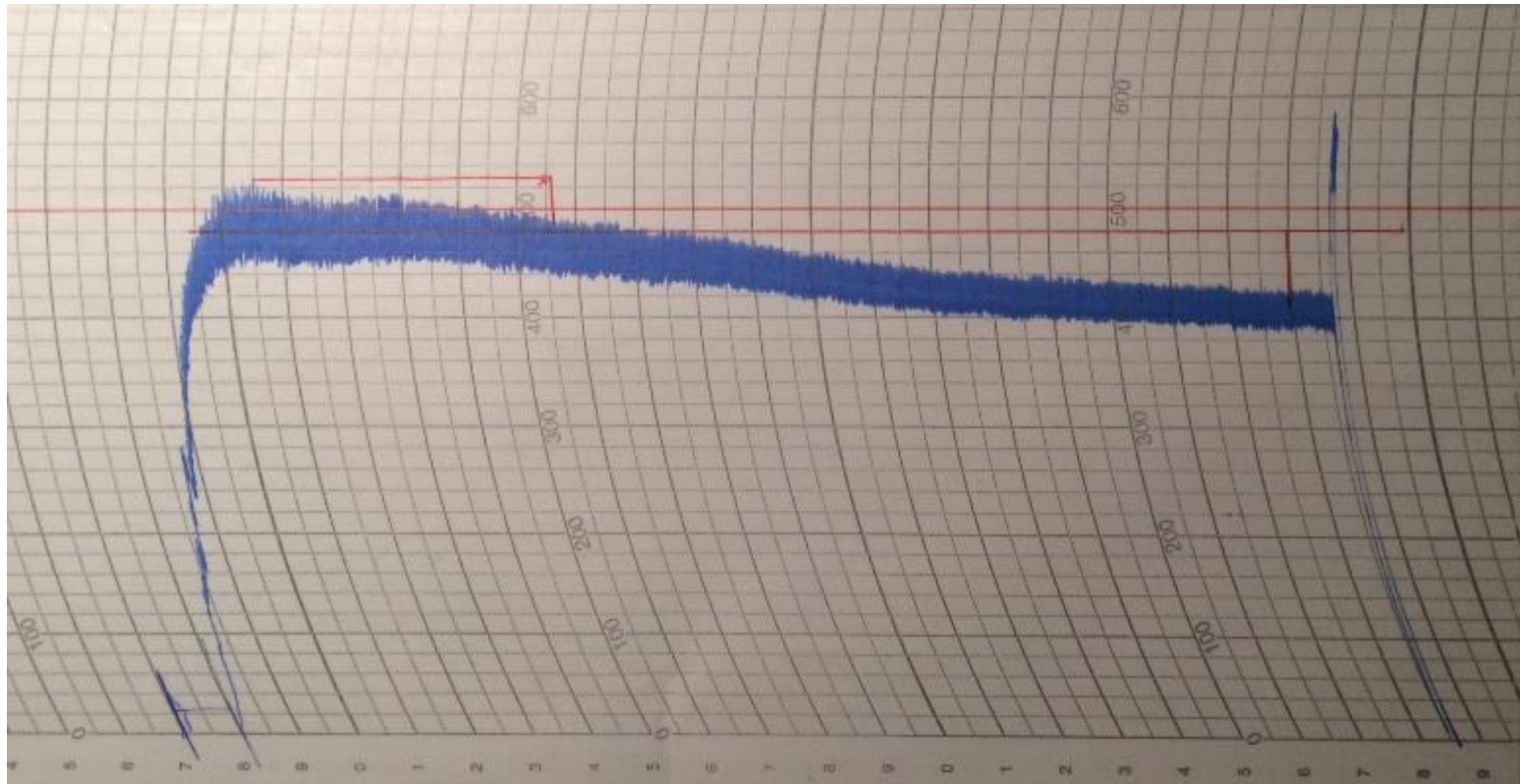


Figura 24 – Reta de regressão Estabilidade vs Concentração da enzima lípase.

APÊNDICE F – Exemplo de um alveograma (amostra GO08)



APÊNDICE G – Exemplo de um farinograma (amostra GO08)



APÊNDICE H – Resultados dos ensaios de padaria

	Temperatura (°C)					Humid. Ambiente (%)	Volume Específico													
	ambiente	farinha	água	massa final	à saída da estufa		Peso (g)	Volume (cm3)	Vespec. (cm3/g)	Peso (g)	Volume (cm3)	Vespec. (cm3/g)	Peso (g)	Volume (cm3)	Vespec. (cm3/g)	Peso (g)	Volume (cm3)	Vespec. (cm3/g)	Média	desvp
CTRL AM	18	16	6	19	25	68	354	2280	6,44	362	2250	6,22	358	2230	6,23	360	2180	6,06	6,24	0,16
AMILASE	AM05	19	17	7	22	60	354	2590	7,32	354	2450	6,92	356	2400	6,74	356	2480	6,97	6,99	0,24
	AM12	21	18	7	22	55	360	2600	7,22	356	2550	7,16	360	2340	6,50	354	2450	6,92	6,95	0,33
	AM20	20	18	6	23	26	358	2560	7,15	356	2490	6,99	352	2680	7,61	354	2600	7,34	7,28	0,27
CTRL XL	16	15	6	20	24	79	358	2300	6,42	358	2280	6,37	356	2250	6,32	358	2300	6,42	6,38	0,05
XILANASE	XL25	18	16	6	21	24	356	2490	6,99	356	2250	6,32	354	2400	6,78	356	2230	6,26	6,59	0,36
	XL40	18	18	6	23	25	352	2580	7,33	352	2620	7,44	354	2410	6,81	354	2470	6,98	7,14	0,30
	XL65	19	18	6	22	25	354	2550	7,20	358	2490	6,96	358	2450	6,84	358	2380	6,65	6,91	0,23
CTRL GO	17	15	7	19	25	59	364	2290	6,29	364	2150	5,91	362	2290	6,33	360	2290	6,36	6,22	0,21
GLU-OX	GO04	18	16	7	20	25	360	2250	6,25	358	2320	6,48	358	2400	6,70	358	2300	6,42	6,46	0,19
	GO08	19	17	7	22	26	350	2690	7,69	354	2640	7,46	354	2730	7,71	354	2590	7,32	7,54	0,19
	GO14	19	17	7	23	25	362	2520	6,96	358	2630	7,35	360	2450	6,81	358	2550	7,12	7,06	0,23
CTRL FL	16	16	5	20	26	62	362	2330	6,44	358	2400	6,70	356	2400	6,74	360	2300	6,39	6,57	0,18
LIPASE	FL08	17	18	6	20	26	356	2480	6,97	354	2400	6,78	350	2550	7,29	352	2350	6,68	6,93	0,27
	FL15	16	17	6	22	26	354	2620	7,40	354	2550	7,20	354	2590	7,32	354	2620	7,40	7,33	0,09
	FL30	18	18	6	20	28	358	2550	7,12	358	2550	7,12	354	2540	7,18	352	2700	7,67	7,27	0,27

APÊNDICE I – Retas de regressão dos resultados obtidos nos ensaios de padaria

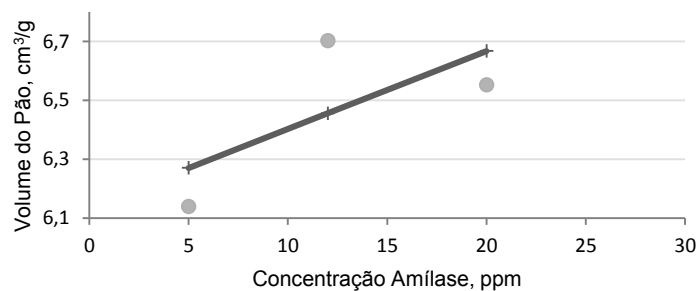


Figura 25 – Reta de regressão Volume do Pão vs Concentração da enzima amilase.

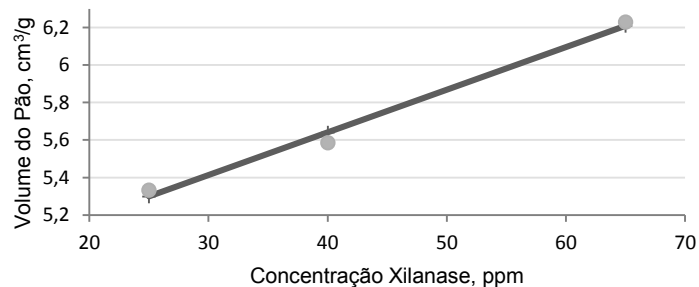


Figura 26 – Reta de regressão Volume do Pão vs Concentração da enzima xilanase.

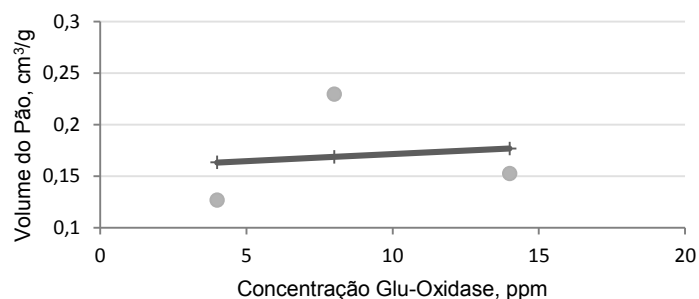


Figura 26 – Reta de regressão Volume do Pão vs Concentração da enzima glucose-oxidase.

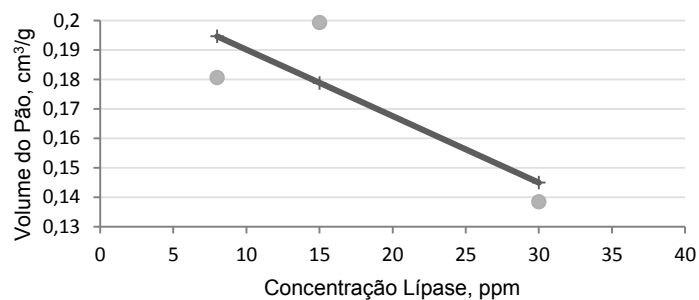


Figura 28 – Reta de regressão Volume do Pão vs Concentração da enzima lipase.

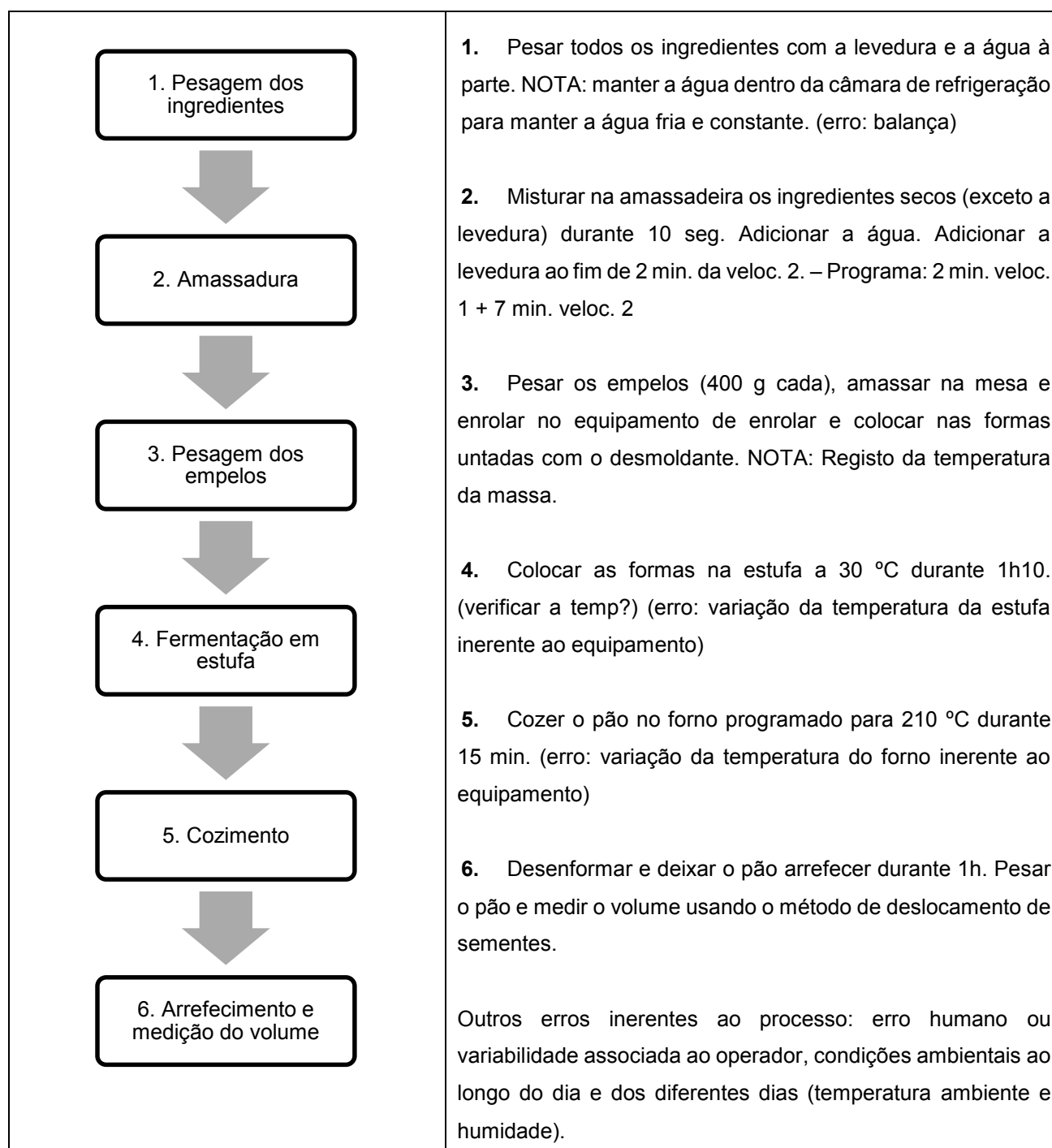
APÊNDICE J – Protocolo definido para os ensaios de padaria

Ingredientes / Receita

Para 1 kg de farinha:

Farinha	100%
Água	60%
Levedura fresca (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	3%
Sal	1,5%
Melhorante (Germix)	1%

Fluxograma do procedimento, descrição das etapas e identificação dos erros associados:



8. REFERÊNCIAS

- Barak, S., Mudgil, D. & Khatkar, B. S. 2015. Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3):357-368.
- Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. 2004. Food Chemistry, 3rd revised Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp. 1070.
- Blaszczak, W., Sadowska, J., Rosell, C. M. & Fornal J. 2004. Structural changes in the wheat dough and bread with the addition of alpha-amylases. *Eur Food Res Technol*, 219:348–354.
- Bonet, A., Rosell, C. M., Caballero, P. A., Gómez, M., Pérez-Munuera, I. & Lluch, M. A. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 99:408-415.
- Borghet, A. V., Goesaert, H., Veraverbeke, W. S., Delcour, J. A. 2005. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41:221-237.
- Brabender. 1985. Manual de Instruções. OHG Duisburg, Alemanha.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z. & Sultan, M. T. 2008. Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *Food Technol. Biotechnol.*, 46(1)22-31.
- Chopin, Groupe Tripette et Renaud. 2006. Manual de Instruções. Villeneuve-la-Garenne Cedex, França.
- Collins, T., Hoyoux, A., Dutron, A., Georis, J., Genot, B., Dauvrin, T., Arnaut, F., Gerday, C. & Feller, G. 2006. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. *Journal of Cereal Science*, 43:79-84.
- Dagdelen, A. F. & Gocmen, D. 2007. Effects of glucose-oxidase, hemicellulase and ascorbic acid on dough and bread quality. *Journal of Food Quality*, 30:1009-1022.
- Decamps, K., Joye, I. J., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. 2012. Glucose and pyranose oxidase improve bread dough stability. *Journal of Cereal Science*, 55:380-384.
- Dewettinck, K., Bockstaele, F. V., Kuhne, B., Walle, B. V., Courtens, T. M. & Gellynck, X. 2008. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science* 48:243-257.
- Forman, T. 2004. Enzymes used in bread baking: an application update. *AIB International Technical Bulletin*, 26(10).
- Gellynck, X., Kuhne, B., Bockstaele, F. V., Walle, D. V. & Dewettinck, K. 2009. Consumer perception of bread quality. *Appetite*, 53:16–23.
- Gerits, L. R., Pareyt, B., Decamps, K. & Delcour, J. A. 2014. Lipases and their Functionality in the Production of Wheat-Based Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13:978-989.
- Gerits, L. R., Pareyt, B. & Delcour, J. A. 2014. A lipase based approach for studying the role of wheat lipids in bread making. *Food Chemistry* 156:190–196.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K. & Delcour, J. A. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16:12-30.

- Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA). "Avaliação da Qualidade Tecnológica/Industrial da Farinha de Trigo". Disponível: <http://www.ufrgs.br/napead/repositorio/objetos/avaliacao-farinha-trigo/index.php> [data da consulta: 19/11/15].
- ISO 27971 (2008). ISO. Cereals and cereal products -- Common wheat (*Triticum aestivum* L.) -- Determination of alveograph properties of dough at constant hydration from commercial or test flours and test milling methodology. International Standardization Organization (ISO), Suíça.
- Lagrain, B., Leman, P., Goesaert, H. & Delcour, J. A. 2008. Impact of thermostable amylases during bread making on wheat bread crumb structure and texture. *Food Research International*, 41:819-827.
- Lallemand, Inc. 1996. A Guide to Baking Enzymes. *Lallemand Baking Update*, 1(14).
- Lutz, E., Wieser, E. & Koehler, P. 2012. Identification of Disulfide Bonds in Wheat Gluten Proteins by Means of Mass Spectrometry/Electron Transfer Dissociation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:3708-3716.
- Maarel, M. J. E. C., Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H. & Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94:137-155.
- Marchetti, L., Cardós, M., Campaña, L. & Ferrero, C. 2012. Effect of glutens of different quality on dough characteristics and breadmaking performance. *LWT - Food Science and Technology*, 46:224-231.
- Martins, J. N., Oliveira, E. N. A. & Santos, D. C. 2012. Estudo da absorção de água em misturas de farinhas de trigo de diferentes marcas comerciais. *Revista Verde*, 7(4)201-206.
- McCann, T. H. & Day, L. 2013. Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 57:444-452.
- Miguel, A. S. M., Martins-Meyer, T. S., Figueiredo, E. V. C., Lobo, B. W. P. & Dellamora-Ortiz, G. M. 2013. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. In: Food Industry (Innocenzo Muzzalupo), InTech, pp. 287-321.
- Mondal, A. & Datta, A. K. 2008. Bread baking – A review. *Journal of Food Engineering*, 86:465-474.
- Motta, F. L., Andrade, C. C. P. & Santana, M. H. A. 2013. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In: Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization (Anuj K. Chandel e Silvio Silvério da Silva), InTech, pp. 251-275.
- Néron, S., Amrani, F., Potus, J. & Nicolas, J. 2004. Separation and quantification by high-performance liquid chromatography with light scattering detection of the main wheat flour phospholipids during dough mixing in the presence of phospholipase. *Journal of Chromatography A*, 1047:77-83.
- NP 3181 (1986). IPQ. Derivados de cereais. Farinhas de trigo mole. Características físicas das massas. Determinação das características reológicas por meio do alveógrafo de Chopin. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Lisboa.
- NP 3653 (2000). IPQ. Derivados de cereais. Farinhas de trigo mole. Características físicas das massas. Determinação da absorção de água e das características reológicas por meio do farinógrafo. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Lisboa.
- NP 516 (2000). IPQ. Cereais e derivados. Determinação do teor de água. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Lisboa.

- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A. & Delcour, J. A. 2011. Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*, 54:266-279.
- Pescador-Piedra, J.C., Garrido-Castro, A., Chanona-Pérez, J., Farrera-Rebollo, R., Gutiérrez-López, G. & Calderón-Domínguez, G. 2009. Effect of the addition of mixtures of glucose oxidase, peroxidase and xylanase on rheological and breadmaking properties of wheat flour. *International Journal of Food Properties*, 12: 748-765.
- Popper, L., Schäfer, W. & Freund, W. 2006. Future of Flour: A Compendium of Flour Improvement. Agrimedia, Germany, pp. 419.
- Portaria nº 52/2015 de 26 de fevereiro de 2015 que fixa as características a que devem obedecer os diferentes tipos de pão e de produtos afins do pão ou de padaria fina, e regula aspetos da sua comercialização. *Diário da República I Série N° 40*, p. 1202-1204.
- Portaria nº 254/2003 de 19 de março de 2003 que define as características e estabelece as regras de rotulagem, acondicionamento, transporte, armazenagem e comercialização das farinhas destinadas a fins industriais e a usos culinários, bem como das sêmolas destinadas ao fabrico de massas alimentícias e a usos culinários. *Diário da República I Série-B N° 66*, p. 1861.
- Posner, E. S. & Hibbs, A. N. 2011. Wheat Flour Milling, 2nd Edition. American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota, pp. 489.
- Prikhodko, D. & Rybchynsky, R. 2009. Agribusiness Handbook: Wheat Flour. Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 51.
- Primo-Martín, C., Wang, M., Lichtendonk, W. J., Plijter, J. J. & Hamer, R. J. 2005. An explanation for the combined effect of xylanase–glucose oxidase in dough systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:1186–1196.
- Queji, M. F. D., Schemin, M. H. C. & Trindade, J. L. F. 2006. Propriedades reológicas da massa de farinha de trigo adicionada de alfa-amilase. *Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.*, 12(2):21-29.
- RELACRE (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal). 1996. Validação de Resultados em Laboratórios Químicos, 1^a Edição. RELACRE, Lisboa, pp. 47.
- Regulamento (EU) nº 1169/2011 de 25 de outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) nº 1924/2006 e (CE) n. o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) nº 608/2004 da Comissão. *Jornal Oficial da União Europeia*, pp. 18-63.
- Rosell, C. M., Haros, M., Escrivá, C. & Barber, C. B. 2001. Experimental Approach to Optimize the Use of α -Amylases in Breadmaking. *J. Agric. Food Chem.*, 49(6):2973-2977.
- Scanlon, M. G. & Zghal, M. C. 2001. Bread properties and crumb structure. *Food Research International*, 34:841-864.
- Šimurina, O. D., Popov, S. D., Filipčev, B. V., Dodić, J. M., Bodroža-Solarov, M., Demin, M. & Nježić, Z. B. 2014. Modelling the effects of transglutminase and L-ascorbic acid on substandard quality wheat flour by response surface methodology. Modelling the effects of transglutminase. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* [online], 20(4):471-480. Available: www.ache.org.rs/CICEQ [Novembro 13, 2015].

- Stauffer, C. 1994. Enzymes used in bakery products: I Fundamentals of enzymes. *AIB International Technical Bulletin*, 16(4)
- Steffolani, M. E., Ribotta, P. D., Pérez, G. T. & León, A. E. 2012. Combinations of glucose oxidase, α -amylase and xylanase affect dough properties and bread quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 47:525-534.
- Tang, L., Yang, R., Hua, X., Yu, C., Zhang, W. & Zhao, W. 2014. Preparation of immobilized glucose oxidase and its application in improving breadmaking quality of commercial wheat flour. *Food Chemistry*, 161:1-7.
- Tuhumurya, H. C. D., Small, D. M. & Daya L. 2014. The effect of sodium chloride on gluten network formation and rheology. *Journal of Cereal Science*, 60:229-237.
- Wang, S., Austin, P. & Bell, S. 2011. It's a maze: The pore structure of bread crumbs. *Journal of Cereal Science*, 54:203-210.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q. & Wang, S. 2015. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4:568-585.
- Zheng, H., Guo, B., Chen, X., Fan, S. & Zhang, Y. 2011. Improvement of the quality of wheat bread by addition of glycoside hydrolase family 10 xylanases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90:509-515.