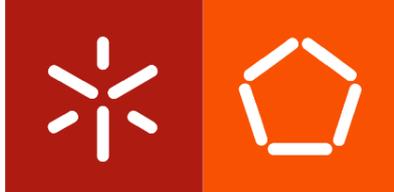


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

João Filipe Simões Pereira

**Desenvolvimento de um pão com
características nutracêuticas: diversificação
de leveduras utilizadas no seu fabrico
e análise sensorial**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

João Filipe Simões Pereira

**Desenvolvimento de um pão com
características nutracêuticas: diversificação
de leveduras utilizadas no seu fabrico
e análise sensorial**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professor Doutor José Maria Oliveira
Mestre Isabel Araújo

Agradecimentos

À minha orientadora da empresa, Isabel Araújo, por todo o apoio e disponibilidade, pelas ideias e conversas, e pela confiança nas minhas capacidades, ao longo de todo o projeto. Agradeço por todo o conhecimento transmitido, sabendo que, sem a sua ajuda, tudo teria sido muito mais difícil.

Ao meu professor orientador, José Maria Oliveira, por toda a ajuda, disponibilidade e dedicação manifestadas ao longo de todo o projeto, sempre procurando ajudar ao máximo. O meu sincero obrigado pela atitude franca e pelas conversas.

Ao Eduardo Coelho, pela presença constante, disponibilidade e ajuda no Laboratório de Fermentações do CEB, sendo que a partilha dos seus conhecimentos tornou o trabalho muito mais fácil.

Ao Tadeu Sousa, pelo companheirismo. Agradeço a disponibilidade total e o seu conhecimento e capacidade ímpar, sem o qual o fabrico do pão nunca poderia ter sido feito. Agradeço igualmente ao Sr. Carlos e a todos aqueles que, na Paniprado, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Ao Dr. Nuno Borges, pela disponibilidade e prontidão de resposta, e pela disponibilização de conteúdo.

À minha família, pelas condições fornecidas, apoio e carinho ao longo de todo este trabalho. Obrigado pela ajuda em todos os momentos.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram, principalmente à Ana, pelo carinho, disponibilidade incondicional e toda a ajuda, sem a qual não teria conseguido fazer o trabalho. Ao Júlio, obrigado por toda a ajuda e pelo apoio, assim como a todos aqueles que deram o seu contributo.

Resumo

Devido ao crescente aumento da percentagem da população mundial referente a indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, é pertinente a aposta no desenvolvimento de um produto que tenha como público-alvo a referida fração da população.

Neste sentido, foi levado a cabo um processo de desenvolvimento de um pão de forma, não doce, com características nutricionais adequadas à dieta, condição física e de saúde médias, e tratamento/prevenção de doenças com maior representação na população idosa mundial. Paralelamente, efetuaram-se também estudos relativos à aferição das consequências que duas estirpes de leveduras não comerciais têm, no pão desenvolvido, relativamente às suas características organolépticas. Compararam-se os resultados com os de uma estirpe comercial utilizada em produção industrial, sendo que para tal se procedeu à realização de provas sensoriais com grupos de provadores não treinados. De modo a obter as quantidades necessárias das duas leveduras não comerciais utilizadas, efetuou-se o crescimento em laboratório a partir de culturas iniciais.

Os resultados das provas sensoriais indicam que as leveduras não comerciais não podem ser consideradas preferíveis à levedura comercial, uma vez que não são conclusivos. Especificamente, considerou-se que as diferenças entre amostras, respetivamente, nas duas provas efetuadas, não foram significativas, o que faz com que a levedura comercial (de produção normalizada, baixo preço, regularizada relativamente a legislação) se mantenha como mais favorável, para o caso estudado. Relativamente ao produto final produzido, conseguiram-se alegações nutricionais favoráveis, parte do objetivo inicial, segundo a legislação em vigor, tais como: “Alto teor em fibra”, “Baixo teor de gordura saturada”, “Baixo teor de gordura” e “Fonte de proteína”. Não foi possível tirar conclusões quanto ao teor em sais minerais, nem alegações nutricionais relativas a estes compostos. Tais alegações só podem ser aplicadas em rótulo mediante análise nutricional do produto, e validação das mesmas, por uma entidade certificada.

Palavras-chave: leveduras; pão; 3.^a idade; análise sensorial; *S. cerevisiae*; nutrição; saúde.

Abstract

Due to the growing increase in the percentage of the world's population concerning individuals who are 65 years old, or older, the development of a product which has, as its consumer target, this population fraction, becomes pertinent.

In this project, the development of a bread loaf, non-sweet, with nutritional characteristics that are adequate to the diet, average physical and medical condition, and treatment/prevention of diseases that are most commonly present on the world's elderly population, is described. Also, some studies that are related to the assessment of the consequences which two strains of yeast, non-commercial, have, on the bread that is to be developed, regarding its organoleptic characteristics, relatively to a commercial strain, used in industrial production, were carried out. In order to get the necessary data, sensory evaluations were carried out, using groups of untrained tasters. Also, in order to obtain the necessary amounts of the two non-commercial yeast strains that were used, lab growth was performed, using starter cultures.

The results of the sensory evaluations are inconclusive, which indicates that the non-commercial strains can't be considered to be better than the commercial strain, for this purpose. Specifically, it was considered that the differences between samples, namely, in the two evaluations that were carried out, weren't significant, which makes the commercial strain (having a normalized production, low price, regularized regarding legislation) to still be the most favourable one. Regarding the final product, favourable nutritional allegations were achieved, which was part of the initial goal, according to the ruling legislation, such as: "High fibre content", "Low saturated fat content", "Low fat content" and "Protein source". It was not possible to draw any conclusion regarding minerals, neither about their content, nor about their related nutritional allegations. These allegations can only be applied if the product is analysed and validated by a certified entity.

Keywords: yeast; bread; senior citizens; sensory analysis; *S. cerevisiae*; nutrition; health.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de Tabelas	xi
Índice de Figuras	xiii
1. Enquadramento Geral	1
1.1 Motivação e Objetivos	1
1.2 Empresas e Entidades Envolvidas	2
1.3 Organização da Dissertação	3
2. Considerações Teóricas	5
2.1 Pão	5
2.1.1 Resumo Histórico	5
2.1.2 Legislação em Vigor	6
2.1.3 Produção de Pão e Formulação de Receitas	7
2.2 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.2.1 História da Levedura na Produção de Pão	9
2.2.2 Influência em Aromas do Pão	11
2.2.3 Meios de Cultura e Condições Ideais de Crescimento	12
2.3 Saúde e Nutrição na 3. ^a Idade	13
3. Características Nutricionais do Produto a Desenvolver	17
4. Desenvolvimento do Produto	19
4.1 Produção das Leveduras L17 e I200	19
4.1.1 Primeira Produção (Levedura L17)	20
4.1.2 Segunda Produção (Levedura L17)	22
4.1.3 Terceira Produção (Levedura I200)	24
4.2 Formulações	26
4.2.1 Formulação 1 – Levedura comercial	29
4.2.2 Formulação 2 – Levedura Comercial	31
4.2.3 Formulação 3 – Levedura L17	34
4.2.4 Formulação 4 – Levedura I200	35
5. Avaliação Sensorial dos Produtos Desenvolvidos	37
5.1 Prova A – Comparação entre as leveduras L17 e comercial	37

5.2 Prova B – Comparação entre as leveduras I200 e comercial	40
6. Conclusões e Perspetivas de Trabalho	45
Referências Bibliográficas	47
Anexo A – Exemplo de Ficha técnica de fabrico utilizada na Paniprado.....	52
Anexo B1 – Protocolo-base	53
Anexo B2 – Protocolo utilizado no trabalho.....	54
Anexo C – Ficha de análise sensorial.....	55
Anexo D – Fichas nutricionais dos ingredientes utilizados	56

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Formulação 1 – Ingredientes (e respectivas quantidades, em massa, m) constituintes da receita-base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita	29
Tabela 2 – Formulação 1 – Informação Nutricional	30
Tabela 3 – Formulação 2 – Ingredientes (e respectivas quantidades, em massa, m) constituintes da receita-base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita	32
Tabela 4 – Formulação 2 – Informação Nutricional	33
Tabela 5 – Formulação 3 – Ingredientes (e respectivas quantidades, em massa, m) constituintes da receita base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita	34
Tabela 6 – Formulação 4 – Ingredientes (e respectivas quantidades, em massa, m) constituintes da receita base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita	35

Índice de Figuras

Figura 1 – Instalação do biorreator utilizado para a fase final do crescimento na 1. ^a Produção.	21
Figura 2 – Detalhe do sistema de arejamento.	23
Figura 3 – Instalação utilizada na fase final do crescimento na 2. ^a Produção.	23
Figura 4 – Instalação na segunda fase da Produção 3 (Início do crescimento).	25
Figura 5 – Instalação na segunda fase da Produção 3 (Final do crescimento).	26
Figura 6 – Produto final obtido com a Formulação 2.	33
Figura 7 – Produto final da aplicação da Formulação 4.	36
Figura 8 – Resultados da Componente Visual da prova A.	38
Figura 9 – Componente Olfativa da prova A.	39
Figura 10 – Resultados da Componente Gustativa da prova A.	40
Figura 11 – Resultados da Componente Visual da prova B.	41
Figura 12 – Resultados da Componente Olfativa da prova B.	42
Figura 13 – Resultados da Componente Gustativa da prova B.	43

1. Enquadramento Geral

1.1 Motivação e Objetivos

O projeto teve o seu início numa colaboração entre a empresa Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, e a empresa Paniprado – Panificadora do Prado, Lda. (como resposta ao pedido de um cliente), para desenvolver um pão de forma, não doce, que pudesse fazer parte de qualquer refeição ao longo do dia e tivesse características nutricionais adequadas ao público-alvo: a população na faixa etária de mais de 65 anos de idade. O interesse no desenvolvimento de tal produto assenta na sua evidente pertinência numa sociedade como a de hoje, devido às suas características demográficas.

A população, de modo geral, está cada vez mais envelhecida, tanto em Portugal como no Mundo. Analisem-se os números seguintes: em Portugal, entre 2009 e 2014, a fração da população em que a idade é igual ou superior a 65 anos aumentou de 18,3 % para 20,3 % (INE, 2015); em termos de população mundial, os resultados apontam para uma situação semelhante, sendo que o aumento da percentagem da fração populacional com mais de 60 anos, entre 2000 e 2015, foi de 29,2 % nas regiões mais desenvolvidas do globo, e de 60,3 % nas regiões menos desenvolvidas. As projeções indicam que, nas regiões mais desenvolvidas, o aumento percentual da fração populacional acima dos 60 anos de idade, entre 2015 e 2030, será de 25,6 %, enquanto nas regiões menos desenvolvidas estima-se que se encontre nos 70,6 %. Também relevante é a evolução dos valores referentes à faixa de população acima dos 80 anos, sendo que de 2000 a 2015 aumentou em 61,8 % nas regiões mais desenvolvidas, enquanto nas regiões menos desenvolvidas o valor foi de 92,1 %. A previsão para o período entre 2015 e 2030 é de um aumento de 44,1 % nas regiões mais desenvolvidas, e de 76,3 % nas regiões menos desenvolvidas do planeta (ONU, 2015).

Foi definido como objetivo a obtenção de um produto com as seguintes alegações nutricionais, segundo a legislação em vigor (Regulamento (CE) N° 1924/2006, Regulamento (CE) N° 1169/2011): “Fonte de Fibra”, “Baixo teor de Gordura” e “Baixo teor de Gordura Saturada”, devido a terem sido consideradas grandes mais-valias do ponto de vista da saúde do consumidor, assim como do ponto de vista de marketing e vendas. Estas alegações podem ser consideradas legais, e colocadas no rótulo, após análise nutricional por parte de uma entidade certificada para

o efeito. O produto também teria de ter características nutricionais vantajosas para o público-alvo, de modo a ter um impacto o mais positivo possível na sua saúde. Tais condições foram consideradas suficientes para a obtenção de um produto que correspondesse ao pedido do cliente.

De modo a obter um produto com as características nutricionais adequadas ao seu objetivo, é pertinente que haja a recolha de informações relativas a estatísticas demográficas mundiais relacionadas com o estado de saúde da população idosa (maiores de 65 anos), para melhor compreender não só os problemas de saúde que mais afetam esta faixa etária, mas também o papel que a nutrição tem na sua prevenção e/ou tratamento. Estas informações, juntamente com a legislação portuguesa em vigor, têm o papel de base bibliográfica para a elaboração das diferentes versões de receitas de pão, otimizadas no decorrer dos ensaios.

Efetuaram-se também testes de comparação entre duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* não comerciais e uma comercial, relativamente ao seu efeito no fabrico do pão desenvolvido neste trabalho. Os testes consistiram em provas sensoriais com provadores não especializados, sendo que tiveram como objetivo aferir quanto à viabilidade das leveduras não comerciais, relativamente à levedura comercial, para este processo.

1.2 Empresas e Entidades Envolvidas

As entidades que prestaram o apoio necessário para a realização do projeto foram as empresas Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, Lda., Paniprado – Panificadora do Prado, Lda., e o Centro de Engenharia Biológica – Universidade do Minho.

A empresa Vinalia teve um papel de apoio tecnológico, sendo que a empresa Paniprado – Panificadora do Prado, Lda. foi o local onde se efetuou a implementação das várias formulações, na produção de pão. Quanto ao Centro de Engenharia Biológica – Universidade do Minho, forneceu condições (materiais e apoio) para que se pudesse proceder à produção das duas estirpes de levedura não comerciais, providenciadas pela empresa Vinalia, utilizadas no trabalho.

A empresa Paniprado – Panificadora do Prado, Lda. é sediada na Vila de Prado, concelho de Vila Verde, no distrito de Braga. Fundada em 1950, com o nome de Padaria S. Amaro, por Patrício Gomes Ferraz, tinha como principal produto a broa de milho. Três anos depois, em 1953, recebeu alvará do Instituto Nacional do Pão, sendo que tal documento conferia à empresa o direito de

fabricar “pão de superior qualidade, regueifa, e todos os produtos afins do pão”. Posteriormente, na década de 70, a empresa passou a designar-se por “Paniprado – Panificadora do Prado”, nome atual. Deu também início à produção de variados produtos, tais como o pão de forma, pães de hambúrguer e pão para cachorro. Na década de 80, é de salientar a aquisição de novas máquinas e a ampliação de instalações. Exporta neste momento para Espanha e França, tendo também desenvolvido nos últimos tempos pães rústicos, pois existe uma procura cada vez maior em pães artesanais e várias variedades de pão de forma. A empresa tem enfrentado os desafios que vão surgindo, tendo sempre como objetivo a qualidade, apostando na modernização das suas instalações, evoluindo constantemente o processo de fabrico dos seus produtos.

Numa perspetiva de inovação, a Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, Lda. iniciou publicamente a sua atividade em janeiro de 2006, como resultado de um *Spin-Off* Académico da Universidade do Minho. “Vinalia”, designação pela qual a empresa quer afirmar-se no mercado, é marca registada e um elemento importante da imagem corporativa utilizada no *website* da empresa (www.vinalia.com.pt). A ideia do negócio foi gradualmente integrada e depois consolidada pela promotora na sequência de um longo trabalho de investigação e também de contactos com o mercado (através de ações esporádicas, de aconselhamento técnico, de formação e afins). A inexistência de empresas de elevada qualificação técnica e com potencial de investigação num setor tão específico como o vitivinícola, foi o fator determinante para a criação da empresa. Atualmente, a empresa apresenta-se como um interlocutor pluridisciplinar com o sector empresarial vitivinícola, atuando em quatro vertentes: Consultoria; Formação; Investigação e Desenvolvimento; Representação e Comercialização de equipamentos enológicos.

1.3 Organização da Dissertação

O corpo da dissertação está dividido em quatro capítulos principais: Considerações Teóricas, Características Nutricionais do Produto, Desenvolvimento do Produto, e Provas e Análise Sensorial.

No capítulo relativo às Considerações Teóricas, são abordados temas pertinentes relativos ao pão, (introdução histórica, legislação, métodos e formulação de receitas), à espécie de levedura a que pertencem as estirpes utilizadas no trabalho, *S. cerevisiae* (introdução histórica, influência em aromas do pão, meios de cultura/condições ideais de crescimento), e também à saúde e nutrição na 3.^a idade (principais problemas de saúde e papel da nutrição na sua prevenção/tratamento).

Seguidamente, dedica-se um capítulo às Características Nutricionais do Produto desenvolvido, no qual se explicitam os objetivos relativos a esse tema, propostos tanto no início do projeto, como ao longo do mesmo. Tais objetivos baseiam-se nas conclusões retiradas após análise dos factos apresentados em Considerações Teóricas, capítulo que o precede, e são a base utilizada para o desenvolvimento efetivo do produto, descrito no capítulo que o sucede.

No capítulo relativo ao Desenvolvimento de Produto descreve-se detalhadamente todos os processos relativos às duas principais fases do mesmo, a produção de leveduras e a elaboração das diversas formulações. Em primeiro lugar, apresenta-se a descrição dos métodos utilizados, e linha de pensamento utilizada, nas diversas tentativas para crescimento das duas estirpes de levedura utilizadas. Seguidamente, é descrito todo o processo relativo ao desenvolvimento das formulações, nalgumas das quais se utilizaram as estirpes produzidas, baseado nos testes feitos e respetivos resultados.

Relativamente ao capítulo referente às Provas e Análise Sensorial, são descritos os métodos utilizados na realização das mesmas, assim como a análise dos resultados obtidos.

2. Considerações Teóricas

2.1 Pão

2.1.1 Resumo Histórico

O pão é um alimento cujas primeiras referências datam de cerca de 30 000 a.C., na Europa, sendo descrito como um alimento constituído por farinha de diferentes grãos, esmagados com pedras, cozinhada. Era, portanto, um pão não levedado (AFP, 2010). O cultivo de cereais com vista à produção de pão está documentado e presente desde o período neolítico, passando pelos períodos históricos das civilizações egípcia, grega e romana, até aos dias de hoje. O aparecimento das primeiras referências a pão levedado data de 2 000 a.C., no antigo Egito, que terá também sido utilizado como forma de pagamento a trabalhadores, aparecendo até em cenas do quotidiano, pintadas nas paredes de túmulos. O método utilizado para a sua produção baseava-se no uso de uma pequena porção de massa utilizada na última produção do pão, misturada com uma porção de massa fresca. A mistura era então deixada levedar durante algumas horas, sendo depois cozida. Esta massa era composta por uma mistura de farinha com alguns ingredientes, tais como água, gordura e sal, sendo que eram utilizados diferentes métodos para o seu arejamento. Tais ingredientes e métodos de arejamento variavam conforme o tipo de pão a produzir, sendo que o povo Egípcio produzia cerca de 50 variedades diferentes (BIRF, 2016).

Povos europeus, como os Gauleses e os Ibéricos, mantiveram o uso da técnica egípcia para fazer pão, levedando-o, tendo descoberto variadas formas de obter levedura. Desde o uso de vinho ou cerveja misturados com a farinha, a adição da espuma da cerveja à massa, ou até à simples exposição da mistura ao ar (promovendo a contaminação por leveduras, e levedação), é notória a evolução nos métodos de fabrico. No entanto, o mais popular continuaria a ser o uso de uma porção de massa levedada da fornada anterior (Tanahill, 1995).

Mais recentemente, na Idade Média, o fabrico do pão (e a forma como o alimento em si era considerado) sofreu uma transformação considerável. A criação de Confrarias/Corporações de padeiros no século XII demonstra a importância que passou a ser dada ao alimento. Foram decretados pesos, medidas, receitas e preços, que se tornariam a norma para a região ou cidade que estivesse sob a jurisdição de cada Confraria, de modo a normalizar a produção e o comércio do pão. Foram inventados e desenvolvidos diversos tipos de moinhos, utilizando as forças

hidráulica ou eólica para moer os grãos, que eram utilizados pelos moleiros (sendo que muitos padeiros também o eram, simultaneamente). Devido ao facto de a farinha branca ser de difícil obtenção, sendo necessária a peneira dos grãos moídos e uma comprovada pureza em termos da sua constituição, esta tornou-se símbolo de estatuto entre a nobreza, sendo até exibida em ostentação, em ocasiões sociais. Previsivelmente, os padeiros tentavam ludibriar a clientela misturando produtos como serrim, cascas de árvore, farelo (e até terra!) nas suas farinhas, de forma a aumentar o seu lucro. Neste aspeto, as Confrarias tiveram um papel fulcral, estabelecendo pesadas multas e castigos a quaisquer padeiros que adulterassem as farinhas dos seus pães (Alcock, Marchant, & Reuben, 2009).

Não obstante a evolução nos métodos de fabrico de pão, durante a Idade Média o pão não levedado continuava a ser o mais produzido. Este pão, denso e fino, era principalmente utilizado como “prato”, servindo de base para a refeição, sendo também comido no final. Os tipos de pão mais comuns eram feitos com farinha de cevada ou centeio, que era produzida de forma imperfeita, não sendo os grãos completamente moídos, e muitas vezes não peneirada, o que fazia com que tivessem uma característica cor escura. Este tipo de pão era consumido pela população comum, sendo que a nobreza consumia principalmente pão claro, produzido com farinha branca (Newman, 2013).

A utilização de leveduras no fabrico do pão só se tornou generalizada na altura do Renascimento, deixando o pão não levedado para segundo plano, enquanto o pão levedado se tornou a norma. O último grande marco na história do pão foi a sua produção de forma automatizada, que surgiu alguns séculos mais tarde, entre finais do século XIX e inícios do século XX, com o pós-revolução industrial. Como consequência, espalhou-se a liberalização na produção e consumo do pão, tornando-o muito mais barato, e fazendo com que o uso de farinha branca fosse facilitado, o que por sua vez teve como consequência que o pão se tornasse cada vez mais branco e menos adulterado (Alcock *et al.*, 2009).

2.1.2 Legislação em Vigor

Tal como aquando da criação das Confrarias/Corporações, em tempos medievais, é também necessário que haja regulamentação e controlo da produção e venda de pão nos tempos que correm. A legislação em vigor em Portugal, mais concretamente a Portaria n.º 52/2015 de 26 de

fevereiro, determina as características que os diferentes tipos de pão devem ter, assim como produtos relacionados com o pão, regulando também os aspetos relativos à sua comercialização. Neste documento, define-se “Pão” como “... o produto obtido por amassadura, fermentação e cozedura, em condições adequadas, das farinhas de trigo, centeio, triticales ou milho, estremes 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”.

Há também definições para “Pão fresco”, “Pão tradicional”, “Pão de longa duração”, “Pão artesanal”, “Pão biológico”, “Pão ralado”, “Produtos afins do pão ou padaria fina”, assim como definições para produtos intermédios ou em processo de fabrico: “Pão pré-cozido”, “Massa de pão congelada” e “Outras massas semielaboradas”. O pão desenvolvido no trabalho é o chamado “pão de forma” e tem características que lhe conferem um extenso prazo de validade. Tal facto coloca-o na categoria de “Pão de longa duração”, caracterizada principalmente por pão que é produzido com o principal objetivo de possuir um prazo alargado dentro do qual pode ser consumido. Relativamente aos tipos de pão, são considerados: “Pão de trigo”, “Pão de centeio”, “Pão integral”, “Pão de triticales”, “Pão de mistura”, “Pão de milho”, “Pão especial”, “Pão-de-leite” e “Pão tostado”, ou “tosta”. O tipo de pão desenvolvido no trabalho encontra-se inserido na categoria de “Pão de trigo” (Portaria n.º 52/2015).

A legislação portuguesa em vigor prevê também a regulação das características analíticas do pão, tais como teor de açúcares totais e teor de sal. Relativamente ao teor de açúcares, os intervalos percentuais (relativamente à matéria seca) de teor aceitável são de 0 % a 3 % para “Pão de trigo” e “Pão de milho” (ou “broa de milho”), sendo que o teor máximo de sal igual a 1,4 % em peso (Lei n.º 75/2009; Portaria n.º 52/2015).

2.1.3 Produção de Pão e Formulação de Receitas

Na atualidade, a produção de pão é feita de forma standardizada, estando definidas claramente quatro fases: junção dos ingredientes na amassadeira, descanso da massa à temperatura ambiente, levedação na estufa e cozedura em forno (dependendo do tipo/quantidade de pão a produzir, assim como do equipamento disponível, poderá ser alterado o procedimento de forma a adequar às condições de produção). Este subcapítulo baseia-se, principalmente, em informação

referente aos métodos utilizados na empresa Paniprado – Panificadora do Prado Lda.

Na fase de junção dos ingredientes, estes são colocados numa amassadeira automática (para grandes quantidades), sendo utilizados diferentes binómios de tempo/rotação das pás, consoante a natureza dos ingredientes da receita: são estes os diferentes estágios de amassadura. Num primeiro estágio, é criada a base da massa, misturando as farinhas e todos os componentes em pó, juntamente com a água. Seguidamente, vão-se adicionando os restantes ingredientes, criando um ou mais estágios de mistura com os binómios tempo/rotação das pás adequados. Estes ingredientes são adicionados de forma faseada, consoante a delicadeza dos próprios e o nível de desintegração desejado. Por exemplo, farinhas, água, fermentos e afins são adicionados em primeiro lugar devido ao facto de serem ingredientes que não sofrem nenhum tipo de desintegração; seguidamente, quaisquer tipos de grãos, sementes ou bagas, adicionados por ordem consoante a consistência e/ou nível de desintegração desejado. Se o objetivo é manter a forma do ingrediente e este tiver uma consistência mole, deverá ser adicionado nos momentos finais. Consoante a avaliação do operador, este pode decidir intervir e utilizar outros utensílios para facilitar o processo, em qualquer um dos estágios.

Estando a massa num estado de mistura homogénea, retira-se da amassadeira e coloca-se numa superfície lisa. Divide-se nas porções individuais de cada pão, recorrendo a uma balança, e coloca-se a descansar à temperatura ambiente (cerca de 22 °C) e destapada, durante cerca de 10 min. Este valor pode variar consoante a elasticidade e consistência da massa aquando do fim da mistura, sendo que quanto mais tempo durar a fase do descanso, mais compacta a massa fica.

Acabando o tempo de descanso da massa, trabalha-se cada porção até obter a forma desejada (seja esférica para pães individuais tipo *bijou*, ou esticada, formando uma linha reta, para pães de forma, por exemplo) e coloca-se em formas individuais ou tabuleiros, na estufa. Os tempos de residência situam-se entre 1 h e 1 h 30 min., dependendo da reação da massa – crescimento – sendo que em situações excecionais poderão até ser aumentados ainda mais, de modo a que atinjam o tamanho máximo. O teor de humidade do ar é mantido dentro do intervalo de 70 % a 80 %, sendo que o valor de temperatura se encontra entre os 35 °C e os 45 °C. A construção e características das estufas, assim como todos os processos que fazem parte do normal funcionamento da fábrica, são fatores que influenciam estes valores, a sua manutenção e potenciais variações.

Finalmente, retiram-se os pães da estufa e colocam-se imediatamente no forno, a uma

temperatura de 250 °C e durante cerca de 25 min. Mais uma vez, o tempo de residência pode variar, consoante a evolução dos pães durante esta fase. A construção e características do forno têm influência na homogeneidade (ou não) da cozedura dos pães, sendo que é um fator a ter em conta aquando do seu fabrico.

É de notar que a presença de operadores qualificados e com experiência, durante o processo, que saibam intervir quando necessário, manuseando a massa da melhor forma e tomando decisões quanto a tempos de residência nas diversas fases do processo, sabendo para isso avaliar o estado e evolução da massa, é fulcral, para a obtenção dos melhores resultados possíveis. Todos os valores de tempo, temperatura e percentagem de humidade do ar são definidos dentro das limitações e estado atual do equipamento usado (Paniprado, 2016).

Para a formulação das receitas de pão, é utilizado o método das “percentagens de padeiro”, como é conhecido. Baseia-se na atribuição de um valor em percentagem a cada ingrediente, em vez de quantidades fixas, relativo à massa da farinha utilizada em maior quantidade (que corresponde a 100 %). Logo, cria-se uma fórmula que pode ser aplicada a qualquer quantidade de produto final que se queira obter, apresentando as quantidades relativas de cada ingrediente da receita. Aquando da criação da fórmula, o cálculo da percentagem de cada ingrediente efetua-se dividindo a massa do ingrediente pela massa da farinha de referência, multiplicando tudo por 100. Note-se que a soma das percentagens de todos os ingredientes será sempre superior a 100 % (uma vez que a farinha corresponde a 100 %) não tendo esse valor qualquer significado como soma das percentagens de toda uma receita. Aquando da aplicação da fórmula, deve partir-se dos valores conhecidos, sejam eles, por exemplo, a massa de produto que se deseja obter, a massa de farinha que se quer utilizar, ou até a massa de qualquer um dos ingredientes que se tenha disponível. As restantes quantidades obtêm-se diretamente substituindo o(s) valor(es) conhecidos na fórmula (Figoni, 2010; Paniprado, 2016).

2.2 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 História da Levedura na Produção de Pão

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular, com forma globular, que faz parte do reino dos Fungos. Estima-se que tenha sido usada pela Humanidade desde o tempo da antiga civilização egípcia, há cerca de 6000 anos, para fazer pão e bebidas de cereais

fermentadas. Foi utilizada, no entanto, sem que na altura houvesse conhecimento da sua existência, nem das suas capacidades: tendo-se aproveitado o fenómeno da fermentação espontânea, descoberto por experimentação e observação. A descoberta de que a fermentação era um fenómeno real, e realizado por organismos, foi apenas feita em 1857 por Louis Pasteur, tendo começado nessa altura o seu estudo e aprofundamento do conhecimento acerca dos principais organismos (as leveduras) que a efetuam, a nível científico (de Alencar *et al.*, 2009).

Pode-se dividir as estirpes desta espécie em dois grupos principais: estirpes selvagens e laboratoriais, sendo que as estirpes laboratoriais são, muitas vezes, obtidas através de manipulação genética e cruzamento entre estirpes. Relativamente às estirpes selvagens, tal designação deve-se ao facto de terem sido descobertas e identificadas na natureza. A primeira vez em que a espécie foi isolada com sucesso ocorreu em 1938, como resultado do trabalho de Emil Mraek com figos podres (Mortimer & Johnston, 1986). Este foi o ponto decisivo na história do estudo desta espécie de levedura, tendo os maiores avanços sido feitos a partir deste momento. O organismo caracteriza-se por ser unicelular, tanto haploide como diploide (embora seja mais comum a forma diploide) e eucariota. Consegue sobreviver em condições aeróbias e anaeróbias, adaptando-se através da sua capacidade em alternar os processos de obtenção de energia: em condições de anaerobiose, as células recorrem ao processo da fermentação alcoólica, no qual utilizam açúcares do meio para converter em etanol, de forma generalizada; em condições de aerobiose, é efetuado o processo da respiração aeróbica, no qual o oxigénio já tem lugar, sendo os produtos finais, sobretudo, moléculas de CO₂ e de ATP. Este processo tem um rendimento muito superior ao alternativo (fermentação). Células que recorrem ao processo fermentativo para obtenção de energia têm também um crescimento/desenvolvimento mais lento, sendo que os subprodutos deste processo (de entre os quais, ácidos, entre outros) provocam uma maior redução do valor de pH do meio do que o processo de respiração aeróbia (Bekatorou, Psarianos, & Koutinas, 2006). Certas estirpes, tanto diploides como haploides, têm a característica de utilizarem um processo de reprodução assexual, denominado de gemulação, para se reproduzir. Consiste na divisão da célula em duas partes, sendo uma delas consideravelmente maior, e o posterior desenvolvimento da porção mais pequena até se tornar numa célula de tamanho idêntico à inicial. Estirpes diploides podem ainda efetuar outro processo de reprodução, a esporulação, no qual a célula produz quatro esporos haploides, que por sua vez podem também sofrer o processo de gemulação (de Alencar *et al.*, 2009).

Esta é a levedura mais utilizada na história da produção de pão, principalmente devido à sua grande capacidade de se adaptar às diferentes condições (composição do meio, temperatura, teor de humidade, tempo de ação) a que possa estar sujeita. No entanto, as aplicações tecnológicas desta espécie não se ficam por aqui, uma vez que, focando a área da produção alimentar, também é utilizada extensivamente na produção de bebidas fermentadas (tais como cervejas e vinhos, por exemplo). É também utilizada na produção industrial de etanol. Relativamente à escolha das estirpes mais adequadas à produção do pão, as características mais apetecíveis, genericamente falando, e que são fatores diferenciadores nesse processo de seleção, são: robustez das células, tamanho (quanto maior, melhor) e elevada capacidade de crescimento e desenvolvimento em situações limitantes, relativamente ao teor de carbono disponível (na forma de açúcares) no meio (Randez-Gil, Isaac, & Prieto, 2013).

2.2.2 Influência em Aromas do Pão

A fermentação alcoólica em leveduras caracteriza-se, sumariamente, pela síntese de monossacarídeos e produção de biomassa, etanol e CO₂. Não se pode descurar, no entanto, uma larga gama de subprodutos, tais como aldeídos, ácidos, cetonas, ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, etc., que têm um papel muito importante no aroma do produto final. Perceber a origem biológica destes compostos e respetiva influência no aroma do produto final é um passo muito importante para a compreensão mais aprofundada do efeito das leveduras e processos de fabrico do pão, que levará a um maior controlo desta característica. De forma geral, a qualidade odorífera de um pão depende de vários fatores, tais como o tipo de fermentação utilizado, a receita, adição de enzimas e/ou melhorantes, e até o processo de armazenamento (Heenan, Dufour, Hamid, Harvey, & Delahunty, 2009; Pico, Bernal, & Gómez, 2015). O trabalho de Pico *et al.* (2015) incide numa revisão e listagem de todos os compostos voláteis identificados no pão de trigo (326), até à data, sendo por isso um instrumento bibliográfico de indiscutível importância. De salientar que, ainda de acordo com o trabalho referido, pode concluir-se que a origem mais provável de 40 % dos compostos voláteis presentes no pão, de entre os examinados, é a fermentação (sendo que se encontram em maioria, neste aspeto). Tal conclusão contribui para o argumento da importância das leveduras e processos fermentativos no perfil final odorífero do pão.

Num estudo realizado por Birch *et al.* (2013), foram estudadas sete estirpes de *S. cerevisiae*, quanto à produção dos compostos voláteis previamente definidos, sendo que aqueles que são

considerados como “desejáveis” são os seguintes (sem ordem definida): 2-feniletanol, 3-metilbutanal, octanal, nonanal, decanal, benzaldeído, fenilacetaldéido, 2,3-butanodiona, 3-hidroxi-2-butanona, 6-metil-5-hepteno-2-ona, acetato de etilo e 2-pentilfurano. Os resultados das análises feitas aos produtos finais indicam que os compostos que estiveram presentes acima do limiar de percepção, em todas as amostras, foram os seguintes: 3-metilbutanal (com aroma maltado), octanal, nonanal e decanal (com aromas cítricos), fenilacetaldéido (aroma a mel) e 2,3-butanodiona (aroma amanteigado/a caramelo). Os autores concluíram que há diferenças significativas nos compostos odoríferos produzidos, consoante a estirpe de levedura, sendo estes parâmetros potencialmente muito importantes aquando da escolha do microrganismo a utilizar na produção do alimento. Foi também medido o tempo de fermentação, assim como o volume de produto final (tendo sido utilizadas as mesmas quantidades de ingredientes e de levedura, em peso). Sendo que na indústria se procura o menor tempo de fermentação possível, é uma característica decisiva na escolha da estirpe a utilizar (Birch, Petersen, Arneborg, & Hansen, 2013).

2.2.3 Meios de Cultura e Condições Ideais de Crescimento

A presença de açúcares no meio, a partir de um certo valor de concentração, fará a levedura proceder à fermentação, um processo anaeróbio, uma vez que despoleta o efeito de *Crabtree* (ocorrência de fermentação alcoólica em condições aeróbicas, devido à inibição pelo valor de concentração de açúcares demasiado elevado no meio). Portanto, a concentração de açúcares deve ser mantida a um nível que, por um lado, permita que nunca haja escassez de nutrientes, e por outro, que não seja elevada ao ponto de inibir a respiração aeróbia, que é a via metabólica desejada, quando o objetivo é o crescimento e reprodução da levedura. Dentro da mesma ordem de ideias, de modo a promover a respiração aeróbia, deve assegurar-se que se mantém o meio com um teor de oxigénio suficiente. Para tal, um fluxo de arejamento contínuo (e suficientemente alto) deve fazer parte da instalação do reator utilizado (Rodrigues, Ludovico, & Leão, 2006). As condições de temperatura e pH ideais diferirão consoante a espécie de levedura com que o trabalho se realiza. No entanto, de uma forma generalizada, pode afirmar-se que o valor ideal de pH para se obter o valor máximo de taxa de crescimento se encontra no intervalo que vai de 3,5 a 4. Especificamente, para *S. cerevisiae*, o intervalo de valores que trarão melhores resultados coincide com o referido. Relativamente aos valores ideais de temperatura, o intervalo de 20 °C a

30 °C pode ser considerado como aquele que permite a obtenção de, genericamente, melhores resultados (Arroyo-López, Orlic, Querol, & Barrio, 2009; Yalcin & Ozbas, 2008).

O meio ideal para que se atinjam os valores máximos de crescimento e desenvolvimento das células terá invariavelmente de conter monossacarídeos facilmente fermentáveis, tais como a frutose e a glucose. Tal facilita o processo metabólico da célula, permitindo que ocorra com maior rapidez, uma vez que elimina o passo intermédio da ação enzimática na quebra de ligações de açúcares mais complexos, de maneira a tornar disponíveis as pentoses e hexoses previamente mencionadas (Busti, Coccetti, Alberghina, 2010; Randez-Gil *et al.*, 2013).

2.3 Saúde e Nutrição na 3.^a Idade

A faixa etária da 3.^a idade é um dos grupos mais em destaque da sociedade relativamente à saúde e à necessidade de cuidados de saúde. Foi feita a determinação das doenças ou problemas de saúde mais comuns em indivíduos pertencentes ao público-alvo, sendo que o critério de seleção foi o seu possível tratamento/prevenção, ou atenuação de consequências negativas, por compostos presentes em alimentos. Concluiu-se que as doenças/problemas de saúde mais relevantes seriam os seguintes (Nutrition Up 65, 2015; ONU, 2015):

- Doenças de coração;
- Diabetes;
- Osteoporose;
- Obesidade;
- Sarcopenia.

Relativamente às doenças de coração, os principais fatores de risco são a pressão sanguínea elevada e o colesterol “mau” alto (LDL). Os alimentos mais indicados para se incluir na dieta de um indivíduo que tenha hipertensão são as frutas e legumes, de um modo geral, com o exemplo mais relevante dos citrinos, devido à quantidade elevada de vitamina C. A vitamina C tem um efeito antioxidante, que contribui para o relaxamento e a manutenção da elasticidade das paredes das artérias, sendo que este efeito contraria o problema indicado. A espécie vegetal *Stevia rebaudiana* também é indicada como tendo efeitos benéficos na diminuição da pressão sanguínea. O consumo de sal é um fator determinante na progressão do problema, sendo que a diminuição

da quantidade ingerida diariamente contribuirá para o controlo da doença; a substituição do sal, na alimentação, por ingredientes com sabor característico, tais como especiarias, sumo de limão, e ervas aromáticas, ajudará à transição para uma dieta mais saudável (Mohd-Radzman, Ismail, Adam, Jaapar, & Adam, 2013; Nutrition Up 65, 2015).

Relativamente ao nível de colesterol “mau” (LDL) demasiado alto, alimentos como soja, abacate, espinafres, gema do ovo, alho, e alimentos que contenham um elevado teor em fibras, são recomendados. Frutos secos, tais como nozes, avelãs e amêndoas, contêm variados compostos benéficos, dos quais se destacam o ómega 3, o magnésio, o cobre e a vitamina E (Sacks *et al.*, 2006). Os chás verde e preto são uma fonte de antioxidantes, que têm também ações positivas no combate aos níveis de LDL demasiado altos. As gorduras monoinsaturadas do abacate fazem aumentar o nível de HDL (colesterol “bom”) e diminuir o nível de LDL; o abacate possui também β -sitosterol, composto que contribui para a redução do fenómeno de absorção do colesterol LDL pelo organismo (Kreuter, Brennan, Scharff, 1997; Nutrition Up 65, 2015)

Relativamente aos diabetes, a planta *Stevia rebaudiana*, com um poder edulcorante muito superior ao do açúcar, deve ser usada em substituição deste, uma vez que não provoca problemas a diabéticos devido ao facto de não ter poder energético. Possui também um efeito redutor do nível de concentração de glucose no sangue, tendo tal efeito sido observado em testes feitos a pacientes com diabetes de tipo II (Mohd-Radzman *et al.*, 2013).

Os principais compostos que ajudam a combater os avanços da osteoporose são minerais como o cálcio, o fósforo e o magnésio, assim como a vitamina D. Esta tem um papel fundamental na manutenção da estrutura óssea, sendo que o papel principal dos minerais (cálcio, fósforo e magnésio) é o da fortificação da estrutura dos ossos, uma vez que são componentes, em considerável percentagem, deles constituintes. Alimentos ricos nos minerais mencionados são, por exemplo, o leite e derivados (iogurte, queijo, etc.), os brócolos, os espinafres, o marisco e as algas marinhas; alimentos ricos em vitamina D são, por exemplo, o salmão, o atum e o sumo de laranja (Nutrition Up 65, 2015).

A redução ao máximo da ingestão de gorduras animais, e a sua substituição na dieta por gorduras vegetais, é a melhor forma de combater a obesidade ao nível da alimentação. Do mesmo modo, também se deve diminuir o consumo de qualquer tipo de gordura, tendo em consideração os rótulos dos produtos alimentares que se consomem, e escolhendo alimentos com um teor calórico mais baixo (Nutrition Up 65, 2015). A obesidade em idosos é um problema com grande

representação na população, devido à diminuição da intensidade e regularidade da atividade física, e surge comumente relacionada com a sarcopenia, sendo que esta se caracteriza pela diminuição da massa muscular relacionada com o processo natural do envelhecimento. É um problema que, mais tarde ou mais cedo, afeta todos os indivíduos pertencentes à 3.^a idade, à medida que envelhecem. Foi documentado o aumento generalizado de massa adiposa adjacente aos músculos, sendo que tal aumenta o risco do aparecimento de efeitos inflamatórios, afetando também o seu desempenho no movimento corporal. Uma forma de combater este problema, nutricionalmente, é garantir que a dieta do indivíduo é a mais variada possível, limitando a ingestão calórica e promovendo o consumo de alimentos frescos, verduras e frutas (Nutrition Up 65, 2015; Prado, Wells, Smith, Stephan, & Siervo, 2012).

3. Características Nutricionais do Produto a Desenvolver

O produto terá de ter características nutricionais adequadas a indivíduos que se encontrem na faixa etária das pessoas com idade igual ou superior a 65 anos, comumente designados por idosos, ou pertencentes à terceira idade. Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos (tanto no momento inicial, como também ao longo do processo de criação e desenvolvimento do produto):

– Terá de conseguir, pelo menos, as seguintes alegações nutricionais, à luz da legislação em vigor: “Fonte de Fibra”, “Fonte de Proteína”, “Baixo teor de Gordura” e “Baixo teor de Gordura Saturada”. A evolução destas alegações para o passo seguinte, em termos positivos (aumento do teor em fibra e do teor em proteína, diminuição dos teores de gordura), é também um objetivo que se tentará atingir, dentro dos possíveis. Estas alegações são, respetivamente, “Alto teor em Fibra”, “Alto teor em Proteína”, “Sem Gordura” e “Sem Gordura Saturada” (Reg. CE N.º 1924/2006).

– Não poderá ter adição de açúcares ou qualquer ingrediente que influencie a doçura do sabor ao ponto de comprometer o objetivo inicial de obter um produto que não seja doce, de modo a poder ser incorporado em qualquer refeição, ou consumido por si só.

– Conseguir alegações nutricionais relativas a nutrientes ou minerais. Relativamente a um mineral, podem ser “Fonte de (mineral)” e “Alto teor de (mineral)”. Relativamente aos nutrientes, “Contém (nutriente)” e “Teor de (nutriente) Reforçado” (Reg. EU N.º 1169/2011).

– Conseguir alegações nutricionais em rótulo do maior número possível de entre os seguintes minerais: ferro, cálcio, zinco e magnésio. Tal justifica-se devido à sua importância na saúde geral, e combate de doenças, da faixa etária a que pertence o público-alvo.

As formulações foram efetuadas de maneira a conseguir o melhor balanço entre os objetivos e os produtos disponíveis, assim como as limitações ditadas pela natureza do produto final em si. O facto de o pão ser um alimento cozinhado a altas temperaturas põe de parte a tentativa da inclusão de níveis consideráveis de quaisquer vitaminas como parte dos objetivos nutricionais do produto, uma vez que estes compostos são destruídos com excessiva temperatura, que é ultrapassada na cozedura do pão (Briggs, 2014). Finalmente, o preço dos ingredientes e sua disponibilidade em stock são também aspetos a ter em conta.

Devido a estas circunstâncias, foram postos de parte os alimentos cujo interesse provinha do seu teor em vitaminas (tais como as frutas), assim como os alimentos que trariam problemas em termos logísticos (não havendo em stock, ou sendo demasiado caros). Quaisquer alimentos cujo sabor tivesse uma presença demasiado forte no produto final, à quantidade mínima a que tivesse de estar presente para ter relevância nutricional, também foram excluídos.

4. Desenvolvimento do Produto

Neste capítulo serão descritos os métodos utilizados para o desenvolvimento do produto ao longo do trabalho, nas suas distintas fases, em primeiro lugar, sendo cada um seguido da apresentação e análise dos resultados obtidos.

Em primeiro lugar, será descrito o processo de desenvolvimento e crescimento das estirpes de levedura não comerciais L17 e I200 para obtenção das quantidades requeridas nas formulações utilizadas (referenciadas no subcapítulo 4.2), sendo, respetivamente, iguais a 250 g, de modo a poderem ser utilizadas em testes de produção do pão. Este processo foi efetuado no CEB – Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, mais especificamente no Laboratório de Fermentações. Foram utilizados reagentes e materiais do Laboratório, sendo que também foi feito o uso de aparelhos partilhados com outros Laboratórios, dentro do CEB.

Será explicitado o processo de construção e desenvolvimento de cada uma das formulações, assim como o processo evolutivo desde a primeira tentativa até à formulação final. Todas as experiências e testes relacionados com a produção foram realizados na Paniprado, com utilização de meios e maquinaria da empresa, assim como o apoio pessoal. As tabelas de informação nutricional relativa a cada uma das formulações não fazem apenas referência a nutrientes que possam ser apresentados no rótulo do produto final, sendo apenas uma representação em destaque dos principais constituintes do produto final.

4.1 Produção das Leveduras L17 e I200

Esta fase do trabalho foi realizada no Laboratório de Fermentações, no CEB. O protocolo utilizado foi fornecido pela empresa Vinalia, sendo um método interno da empresa (Anexo B1), tendo sido modificado numa fase posterior (Anexo B2). O objetivo final desta fase do trabalho foi a produção de, respetivamente, 250 g de cada uma das leveduras mencionadas, para uso na produção de pão.

Seguem-se as características identificativas dos ingredientes utilizados para a produção do meio de cultura em todas as diferentes fases de produção (excetuando alterações devidamente assinaladas):

Extrato de levedura – Oxoid LP0021 (pó);

Sulfato de Magnésio Heptahidratado – Panreac 131404.1210 (pH 5-8.2 solução a 5 %);

Fosfato de Amónio dibásico – Sigma-Aldrich A5764 (Batch #073K3619);

Glucose – AMRESCO 0188 (D-Glucose anidra).

Foi efetuada uma adequação do protocolo inicial (Anexo B1) às condições disponíveis no ambiente de trabalho, desde logo, sendo as alterações as seguintes:

- O meio inicial em que cada uma das leveduras se encontrava não foi identificado;
- O inóculo inicial foi de 200 μ L, introduzido no meio do erlenmeyer utilizado em primeiro lugar (de volume igual a 500 mL), em todas as Produções de levedura;
- O biorreator utilizado não foi o referido no protocolo;
- Não houve controlo e manutenção do valor de pH em nenhuma das tentativas de produção;
- O acerto de pH inicial, quando feito, foi conseguido com o uso de uma solução de HCl;
- Não foi utilizado nenhum composto com ação antiespuma;
- No final de cada fase de produção, as leveduras foram recolhidas por centrifugação do meio, e utilizadas nesse mesmo dia na produção de pão (ver subcapítulos 4.1.3 e 4.1.4 – Formulações).

Todo o material usado para crescimento de levedura e interação com meio estéril foi esterilizado a uma temperatura de 110 °C durante 20 min.

4.1.1 Primeira Produção (Levedura L17)

Para a primeira fase de produção, foi utilizado o método descrito no protocolo fornecido pela empresa Vinalia (Anexo B1), com as alterações apresentadas na introdução ao subcapítulo 4.1.

Foi utilizado um biorreator, com um volume de 5 L, com camisa de aquecimento, sistema de arejamento e sistema de agitação, todos estes com controlo automático. Nesta fase, não se efetuou o ajuste do pH inicial. Foi, no entanto, registado o seu valor, igual a 7,5.

Na Figura 1 está apresentada a instalação utilizada na fase final do crescimento, na 1.^a Produção.



Figura 1 – Instalação do biorreator utilizado para a fase final do crescimento na 1.ª Produção.

Após todo o processo, foi notada a presença de limalha de ferro no meio. Procedeu-se, então, à sua centrifugação, sendo que depois se recolheu toda a levedura obtida, numa mistura com a já referida limalha de ferro e algum teor em água. O peso total final foi de 75 g (limalha, água e levedura).

Segundo as concentrações finais de levedura obtidas num projeto no qual se utilizou o mesmo protocolo que serviu de referência a esta fase do trabalho, seria de esperar que se obtivessem concentrações de, pelo menos, cerca de quatro vezes superiores, sendo que tal quantidade seria suficiente para ultrapassar os 250 g de levedura necessários para a produção de pão, consoante a formulação desenvolvida. Devido à quantidade final de levedura obtida (abaixo do esperado, como referido), procedeu-se a alterações no protocolo inicial e criação de um protocolo alternativo (Anexo B2) para ser utilizado na tentativa de produção seguinte.

Após análise da instalação utilizada, concluiu-se que a limalha de ferro era proveniente do rotor do agitador, que se encontrava defeituoso. Tal facto levou a que se rejeitasse o biorreator utilizado e se utilizasse outro tipo de instalação para o efeito, numa futura produção. Especulou-se também que a limalha de ferro tivesse tido um papel inibidor no crescimento e proliferação da levedura.

O produto final desta primeira produção foi descartado, uma vez que não se conseguiu separar completamente a limalha de ferro da restante mistura (leveduras, água).

4.1.2 Segunda Produção (Levedura L17)

O objetivo final de produção de levedura, em termos de quantidade obtida, foi, mais uma vez, o valor da formulação (referido na introdução do subcapítulo 4.1): 250 g.

Nesta fase de produção foram efetuadas as seguintes mudanças, relativamente à fase de produção anterior:

- Utilização do protocolo referenciado em 4.1.1, presente em anexo (Anexo B2);
- O reagente “sulfato de magnésio hepta-hidratado” utilizado foi o da marca Merck (comercial).

As alterações efetuadas ao protocolo referenciado em 4.1.1, e utilizado na 1.^a Produção, basearam-se na adequação às condições de trabalho disponíveis (aparelhos, instalações e reagentes) e nas recomendações da pessoa responsável pelo acompanhamento desta fase do projeto, no local. A adequação do pH ao valor de 4,5 deveu-se ao facto de este valor, contando com uma descida prevista teoricamente do valor do pH do meio até ao final do processo de crescimento de cerca de 1 unidade (o que colocaria o valor de pH em 3,5), ser o mais adequado teoricamente à proliferação e desenvolvimento da *S.cerevisiae* (Randez-Gil *et al.*, 2013). Relativamente à necessidade de utilizar um biorreator diferente do utilizado na 1.^a Produção, e devido às poucas opções disponíveis, optou-se pela utilização de dois erlenmeyers de 5 L, sendo que o volume de meio contido em cada um foi de 4 L. Uma vez que não havia condições para controlar a temperatura nestes biorreatores, e sendo que o valor de temperatura ambiente foi registado como 21 °C, sendo mantido constante na sala por ar condicionado, o tempo da última fase de produção foi alterado de 24 h para 48 h, para compensar o efeito negativo desse valor de temperatura na taxa de crescimento das leveduras (Arroyo-López *et al.*, 2009; Yalcin & Ozbas, 2008).

As condições de arejamento foram mantidas constantes ao longo de toda a fermentação. Relativamente ao fator da agitação, considerou-se que esteve presente, embora não controlado nem mesurável, uma vez que a turbulência provocada pela saída de ar das pontas do tubo de arejamento demonstrava uma ação significativa no meio. Num dos erlenmeyers, o tubo de arejamento foi adaptado a uma peça em forma de T, com a inclusão de duas pontas de micropipeta em cada uma das extremidades da referida peça, de modo a aumentar a área superficial das bolhas do ar introduzido no meio, e aumentar a sua turbulência, o que ajuda à

agitação. Um peso foi também adicionado, de modo a evitar movimentação indesejada do tubo. Note-se a Figura 2, que fornece uma melhor perspetiva da particularidade descrita. No outro erlenmeyer utilizou-se um tubo já fabricado para o efeito.



Figura 2 – Detalhe do sistema de arejamento.

A Figura 3 representa toda a instalação, relativamente à fase final do crescimento na 2.^a Produção. Um dos erlenmeyers está ligado a uma rede fixa de ar, enquanto que o outro tem como fonte de arejamento um compressor.



Figura 3 – Instalação utilizada na fase final do crescimento na 2.^a Produção.

No final da primeira parte deste processo de produção, foi recolhida uma quantidade igual a 82 g de depósito, após centrifugação. Foi decidido reservar a levedura obtida em ambiente frio (4 °C) e repetir a produção efetuada, de forma a tentar obter uma quantidade suficiente para realizar o teste de produção de pão, após junção do depósito centrifugado no final das duas fases de produção de levedura.

Na segunda parte da 2.^a produção foi efetuada apenas uma alteração ao procedimento utilizado na primeira parte, que foi o acerto do valor de pH inicial do meio, sendo que o valor, em vez de 4,5, foi de 5,5. Tal deveu-se ao facto de a quantidade obtida na primeira fase desta 2.^a produção (82 g) ter sido virtualmente a mesma que na 1.^a produção, tendo-se especulado que o valor de pH final ter-se-ia tornado baixo o suficiente para se tornar inibitório, parcialmente, do desenvolvimento e proliferação de levedura.

No final, foram recolhidos 120 g de depósito (leveduras, água), após centrifugação. Houve, portanto, um aumento de cerca de 46 % em massa, relativamente à 1.^a Produção, o que foi considerado significativamente positivo, e uma consequência direta da alteração feita ao valor do pH.

Foi adicionado o depósito obtido nesta segunda fase ao depósito que se encontrava armazenado em ambiente refrigerado (82 g), sendo que a soma perfaz um total de 202 g. Foi, no entanto, tido também em conta o teor de água (considerado 20 % do peso total, de forma generalizada, para efeitos de cálculo), o que resulta num valor total de levedura obtido de cerca de 160 g, o valor utilizado na Formulação 3 (ver subcapítulo 4.2.3).

4.1.3 Terceira Produção (Levedura I200)

Tal como na Segunda Produção, o objetivo desta produção, em termos de quantidade de produto final, foi o de obter 250 g de levedura, de modo a se poder realizar o teste de produção de pão. Relativamente à produção anterior, foi efetuada a seguinte alteração:

– Nas duas fases do crescimento anteriores à fase final, sendo esta correspondente à terceira fase, nos dois erlenmeyers de 5 L, a velocidade de agitação utilizada foi de 150 min⁻¹ (substituindo os 200 min⁻¹ indicados no protocolo).

No final desta primeira fase de produção, foram obtidos 104 g de depósito, após centrifugação (leveduras, água). Tal valor foi inferior ao obtido na segunda fase da 2.^a Produção, sendo que a sua diminuição foi atribuída, numa primeira fase de avaliação, à inferior velocidade de agitação que foi utilizada nas duas primeiras fases de crescimento de levedura, relativamente ao valor indicado no protocolo. De modo a complementar a informação disponível para a análise de resultados, foi também efetuada uma medição do pH do meio. O valor obtido foi igual a 3,

considerado parcialmente inibitório para o desenvolvimento e proliferação da levedura utilizada (Arroyo-López *et al.*, 2009; Yalcin & Ozbas, 2008), sendo que tal provocou a tomada de decisão de se ajustar o pH para 6,5 na segunda fase de produção, subindo 1 unidade, relativamente ao utilizado na segunda fase da produção anterior (o que obteve maior êxito, em termos de quantidade produzida). A Figura 4 apresenta a instalação da fase final da Produção 3, no início da mesma.



Figura 4 – Instalação na segunda fase da Produção 3 (Início do crescimento).

No final da segunda fase de produção (Figura 5), e após centrifugação do meio, o valor de depósito obtido foi de 113 g. Tal valor representa um aumento de cerca de 9 %, em massa, relativamente à quantidade obtida na primeira fase de produção, tendo sido considerado pouco significativo, mas não insignificante. Foi medido novamente o valor de pH, sendo que o valor resultante foi de 3,3, o que revela uma ligeira melhoria das condições do meio, relativamente a este parâmetro, para o desenvolvimento e proliferação da levedura utilizada. Tal valor ainda não se encontra, no entanto, dentro do intervalo ótimo referenciado pela bibliografia consultada, o que mostra que ainda há margem para continuar a investigação, neste aspeto (Yalcin & Ozbas, 2008).

A soma das quantidades obtidas no final das duas fases de produção perfaz um total de 217 g. Tendo em conta o teor considerado de 20 % de água, do peso total (tal como em 4.1.2), concluiu-se que o peso de levedura obtida no final foi 173 g, sendo este o valor utilizado na Formulação 4 (ver subcapítulo 4.2.4).



Figura 5 – Instalação na segunda fase da Produção 3 (Final do crescimento).

A análise dos resultados obtidos permite concluir quanto às melhores condições de crescimento (de entre as várias utilizadas) para a realização deste tipo de trabalho. Não se notou nenhuma consequência negativa que se possa atribuir individualmente à ausência do uso de agitação, devido ao facto de, em nenhum par de fases de produção de levedura, esse ter sido o único parâmetro diferente. O valor de pH que apresentou melhores resultados foi o de 5,5, sendo que, no entanto, não se fizeram testes suficientes para atribuir o sucesso da produção referente ao valor de pH mencionado a esse parâmetro, individualmente. Uma posterior experimentação e observação com diferentes valores de pH, como única variável, utilizando a instalação referida, fará com que se possam tirar conclusões exatas. De notar também que o valor de velocidade de rotação nas duas primeiras fases do processo de crescimento, nos erlenmeyers de menor volume, que apresentou melhores resultados foi a referida no protocolo original, 200 min^{-1} . Quanto à descida teoricamente prevista de 1 unidade de pH durante o crescimento de levedura, verificou-se que não ocorreu, sendo que ficou a dúvida de que se aplique nas condições e instalações do projeto (Arroyo-López *et al.*, 2009).

4.2 Formulações

A primeira formulação foi criada começando por delinear uma base da receita, baseada em produtos semelhantes existentes, fabricados pela empresa. O Anexo A representa um exemplo de uma ficha técnica de formulação. Nota para a presença das colunas “% farinha” (correspondente às percentagens de padeiro) e “% total”, sendo que o valor da percentagem da farinha T55 na coluna de “% farinha”, correspondente a 100 %, não se encontra representado por ambiguidade.

Por sua vez, a soma dos valores da coluna de “% total” terá sempre de apresentar o valor de 100 %, o que confirma a inexistência de erros nos valores da quantidade de cada ingrediente.

As quantidades dos ingredientes utilizadas à partida foram adequadas ao método de produção estandardizado na empresa para experiências e para novos produtos, sendo que as quantidades relativas são, logicamente, apenas uma pequena fração das utilizadas aquando da produção normalizada de produtos para venda.

O primeiro ponto de divergência para com a receita-base apresentada foi a substituição de uma parte da quantidade de Farinha T55 (comummente designada por farinha branca) por farelo de trigo. Tal modificação, juntamente com um aumento da quantidade de Farinha T150 (comummente designada por farinha integral), teve como objetivo aumentar o teor em fibra do produto final. A inclusão de uma pequena porção de farinha de linhaça na receita-base, como substituição, uma vez mais, da respetiva quantidade em Farinha T55, teve como objetivo não só aumentar o teor em fibra, como também conferir características nutricionais interessantes ao produto final (nomeadamente no teor em sais minerais), tal como será aprofundado no capítulo 4.2.1 (ver Tabela 1).

Tendo em conta a informação apresentada no capítulo 1, assim como os ingredientes disponíveis em stock, foram selecionadas as sementes a adicionar à receita, de forma a que o produto final atingisse os objetivos propostos. Os ingredientes escolhidos foram:

- Bagas de goji: consideradas um “superalimento”, contêm uma panóplia de minerais interessantes para o projeto, tendo como exemplos o zinco, o ferro (em teor superior ao da carne vermelha), o cálcio e o fósforo. De notar ainda um elevado teor em fibras e proteínas (Donno, Beccaro, Mellano, Cerutti, & Bounous, 2015; Vieira, 2016). Foi também considerado um ingrediente muito importante em termos visuais, numa componente de marketing do produto;

- Sementes de quinoa: contêm um elevado teor em hidratos de carbono, sendo que o seu elevado teor em fibra (8,9 %) e proteína (12 % a 15 %) são os aspetos mais chamativos deste alimento (Vega-Gálvez et al., 2010);

- Sementes de girassol: contêm um elevado teor de derivados de ácidos linoleicos polinsaturados tais como o ómega 3 (produto mais comummente encontrado na forma de óleo de girassol), assim como um teor elevado de potássio, cálcio e magnésio, em maior destaque (Škrbić & Filipčev, 2008);

– Sementes de chia: alimento muito rico em ómega 3 e ácidos gordos, cujos principais constituintes, em termos de sais minerais, são o cálcio, magnésio e potássio. Possui também um teor de fibra muito elevado (34 %) (Muñoz, Cobos, Diaz, & Aguilera, 2013);

– Sementes de linhaça castanha: contêm um elevado teor em ómega 3 e ácidos gordos, sendo muito rica em fibra (33,5 %) e proteína (14,1 %). Contêm também elevados teores em sais minerais, dos quais se destacam o cálcio, o magnésio, o fósforo e o potássio (Gill, 1987);

– Soja: este alimento contém um teor muito elevado de potássio, sendo que também contém um teor assinalável de cálcio, ferro e magnésio. Adicionalmente, possui um teor elevado de proteínas (36 %) e gorduras polinsaturadas (11 %) (Sacks *et al.*, 2006).

A informação relativa a alegações nutricionais foi retirada da legislação em vigor [Reg. (CE) N.º 1924/2006; Reg. (UE) N.º 1169/2011]. Foram utilizadas, como fontes de informação nutricional dos ingredientes utilizados, fichas técnicas de cada ingrediente fornecidas pela Paniprado – Panificadora do Prado, Lda. Todos os documentos a que se teve acesso, de entre os referidos, encontram-se no Anexo D. Não se obteve ficha técnica nutricional para todos os ingredientes utilizados, sendo que, nesse caso, os valores nutricionais para todos os componentes foram considerados como iguais a zero, para efeitos de cálculo de composição nutricional, nas formulações.

É também relevante indicar que o nutriente Sódio não pode ser declarado em rótulos alimentares [Reg. (UE) N.º 1169/2011].

Após análise das fichas técnicas nutricionais de cada ingrediente, concluiu-se que não há dados suficientes nos documentos fornecidos pela Paniprado – Panificadora do Prado, Lda., para se poder fazer qualquer afirmação relativa a teor de minerais no produto final. Considerou-se que a informação nutricional relativa aos nutrientes Ferro e Cálcio é muito incompleta. Adicionalmente, apenas três ingredientes (Farinha T55, Farinha T150 e Farelo) possuem informação relativa aos nutrientes Magnésio e Zinco, sendo que nenhum deles faz parte da categoria “Sementes”, sobre a qual a pesquisa bibliográfica mais incidiu (devido à sua grande importância no trabalho, relativamente ao seu teor em sais minerais, para a obtenção das respetivas alegações nutricionais). Considerou-se a informação nutricional relativa a estes nutrientes como praticamente inexistente. De notar também que a evolução entre formulações é maioritariamente conseguida fazendo alterações na quantidade e tipo de sementes utilizadas.

4.2.1 Formulação 1 – Levedura Comercial

A criação da primeira formulação foi baseada e influenciada pela informação apresentada no capítulo 2. Na Tabela 1 encontram-se os ingredientes (e respetivas quantidades) constituintes da Formulação 1.

Tabela 1 – Formulação 1 – Ingredientes (e respetivas quantidades, em massa, *m*) constituintes da receita-base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita

Ingrediente	<i>m/kg</i>	Ingrediente	<i>m/kg</i>
Farinha T55	2,00	Bagas de goji	0,25
Farinha T150	1,00	Sementes de chia	0,1
Farelo de trigo	0,30	Sementes de linhaça castanha	0,25
MIX Paniprado	0,15	Sementes de quinoa	0,1
Glúten	0,03	Sementes de girassol	0,1
Sal	0,06	Soja granulada pequena	0,1
Propionato de cálcio	0,01	Flocos de tremçoço	0,1
Conservant T (ácido sórbico)	0,01		
Xtendlife	0,03		
Soro de leite	0,06		
Água	1,65		
Farinha de linhaça	0,15		
Fermento	0,25		

Após a formulação, foram então calculados os valores nutricionais por 100 g de produto final, utilizando para isso as fichas técnicas nutricionais (Anexo D).

Como método de comprovação dos dados, efetuou-se a soma das quantidades presentes em todas as fontes de informação nutricional, para todos os ingredientes, de modo a garantir que o total seria igual ao valor total de peso do produto final. De forma a visualizar melhor o resultado, foi atribuído o valor de 100 % ao peso total do produto, do qual estaria em função o valor calculado com a informação obtida das fichas técnicas dos ingredientes. O valor obtido foi de 95,21 %, relativamente ao já referido valor de referência, podendo-se concluir que a margem de erro das

alegações nutricionais, e tabela nutricional, relativas a esta formulação será de 4,79 %. Na Tabela 2 encontra-se apresentada a informação nutricional relativa à Formulação 1.

Tabela 2 – Formulação 1 – Informação Nutricional

	Por 100 g Produto final
Fibras	5,37 g
Proteínas	10,24 g
HC	44,99 g
GT	633,48 mg
GS	0,48 g
Conteúdo energético	314,71 kJ
Ca	26,30 mg
Fe	1,25 mg
Na	20,88 mg
Mg	24,11 mg
Zn	0,49 mg

Nota: HC – “Hidratos de carbono”; GT – “Gorduras totais”; GS – “Gorduras saturadas”.

O produto final deste teste consistiu em pães de forma, que foram avaliados sensorialmente, no momento, com uma abordagem superficial, para garantir que possuíam características atrativas e adequadas.

A análise feita aos resultados da Tabela 2, usando como referência a legislação relativa a alegações nutricionais, permitiu definir mudanças a aplicar para uma segunda versão da formulação.

Em primeiro lugar, e com base nos resultados relativos à informação nutricional (Tabela 2) identificaram-se os objetivos atingidos com esta formulação:

– Alegação nutricional “Fonte de fibra” (> 3 g/100 g) [Reg. (CE) N° 1924/2006, Reg. (UE) N.º 1169/2011];

– Alegação nutricional “Baixo teor de gordura saturada” (< 1,5 g/100 g) [Reg. (CE) N.º 1924/2006, Reg. (UE) 1169/2011];

– Alegação nutricional “Baixo teor de gordura” (< 3 g/100 g) [Reg. (CE) N° 1924/2006];

– Alegação nutricional “Fonte de proteína” (≥ 12 % do conteúdo energético do produto é referente à proteína presente) [Reg. (CE) N° 1924/2006], sendo que a percentagem obtida foi de 13,02 %.

Salienta-se, no entanto, que as alegações nutricionais apenas se podem considerar válidas após análise do produto por entidade certificada, e confirmação dos valores. Face a estes resultados, definiu-se como objetivo, na formulação seguinte, a obtenção das alegações mais favoráveis ao cumprimento das principais metas do projeto, relativamente a cada uma, sendo, respetivamente: “Alto teor em Fibra” ($> 6 \text{ g}/100 \text{ g}$) e “Sem gordura” ($\leq 0,5 \text{ g}/100 \text{ g}$) [Reg. (UE) 1169/2011]. Tal seria feito ajustando a formulação relativamente às quantidades (e tipos) de sementes a utilizar, otimizando os valores obtidos, baseando-se nas fichas nutricionais respetivas.

Foi tomada a decisão de não perseguir o objetivo de atingir a alegação “Alto teor de proteína” ($\geq 20 \%$ do conteúdo energético do produto é referente à proteína presente), uma vez que o pão é, por natureza, um alimento rico em hidratos de carbono (nutriente com a maior contribuição para o teor calórico do produto em questão), e a tentativa de conseguir esta alegação nutricional teria como contrapartida a diminuição potencial do teor em minerais, de maneira geral (relacionados principalmente com as sementes), que foi considerada uma questão com maior prioridade que a referida anteriormente.

Tomou-se, posteriormente, a decisão de se retirar o soro de leite da lista de ingredientes a utilizar, uma vez que este contém lactose. Tal decisão deve-se ao facto de existir uma elevada percentagem da população, de modo geral, (e muito variável, consoante a etnia do indivíduo considerado) pertencente ao público-alvo, que sofre de intolerância a este composto (Scrimshaw & Murray, 2008).

Baseado na opinião de pessoas qualificadas na empresa, tomou-se também a decisão de restringir o peso total das sementes a um valor máximo de 1 kg, na formulação, de modo a não afetar negativamente a estabilidade e crescimento da massa. Foi também decidido priorizar sementes de menor diâmetro, pela mesma razão.

4.2.2 Formulação 2 – Levedura Comercial

Com base nos resultados da primeira formulação, e seguindo a legislação relativa às alegações nutricionais como referência para o melhoramento da mesma, desenvolveu-se a segunda formulação, apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Formulação 2 – Ingredientes (e respetivas quantidades, em massa, *m*) constituintes da receita-base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita

Ingrediente	<i>m/kg</i>	Ingrediente	<i>m/kg</i>
Farinha T55	2,50	Bagas de goji	0,15
Farinha T150	0,50	Sementes de chia	0,30
Farelo de trigo	0,30	Sementes de linhaça castanha	0,250
MIX Paniprado	0,15	Sementes de quinoa	0,10
Glúten	0,09	Sementes de girassol	0,05
Sal	0,06	Soja granulada pequena	0,15
Propionato de cálcio	0,01		
Conservant T (ácido sórbico)	0,01		
Xtendlife	0,03		
Gordura	0,09		
Água	1,65		
Farinha de linhaça	0,15		
Fermento	0,25		

Uma vez que a formulação difere em constituição, relativamente à Formulação 1, e de modo a aferir quanto ao grau de incerteza dos resultados obtidos no cálculo da tabela nutricional do produto final, foi utilizado o mesmo método que na Formulação 1. O valor obtido foi de 94,39 %, relativamente a 100 % do peso total, o que resulta numa margem de erro de 5,61 %.

Na Tabela 4 encontram-se discriminados os valores relativos à informação nutricional do produto obtido com a Formulação 2. Esta foi escolhida como a formulação a utilizar nos testes com as duas leveduras selecionadas, L17 e I200.

O produto final deste teste consistiu, tal como o da Formulação 1, em pães de forma (Figura 6), que foram avaliados sensorialmente, de forma pouco aprofundada, para garantir que possuíam características atrativas e adequadas.

Tal como no subcapítulo 4.2.1, e com base nos resultados relativos à informação nutricional (Tabela 4) conclui-se que houve o seguinte objetivo atingido com esta formulação (que não tinha sido atingido na Formulação 1):

– Alegação nutricional “Alto teor em fibra” (> 6 g/100 g) [Reg. (CE) N.º 1924/2006], que substitui a alegação nutricional “Fonte de fibra”.

Tabela 4 – Formulação 2 – Informação Nutricional

	Por 100 g Produto final
Fibras	6,17 g
Proteínas	10,22 g
HC	43,52 g
GT	574,10 mg
GS	0,42 g
Conteúdo energético	308,24 kJ
Ca	25,02 mg
Fe	1,16 mg
Na	7,58 mg
Mg	24,89 mg
Zn	0,51 mg

Nota: HC – “Hidratos de carbono”; GT – “Gorduras totais”; GS – “Gorduras saturadas”.

Todas as alegações nutricionais conseguidas na Formulação 1 mantiveram-se após análise nutricional do produto obtido com a Formulação 2. Relativamente à alegação nutricional “Fonte de proteína”, o valor de percentagem calculado foi de 13,26 %, o que continua a corresponder a um valor que permite manter a alegação correspondente (terá de ser superior a 12 %).

Não se conseguiu, porém, atingir o objetivo de obter a alegação “Sem gordura” ($\leq 0,5$ g/100 %).



Figura 6 – Produto final obtido com a Formulação 2.

4.2.3 Formulação 3 – Levedura L17

Na Formulação 3 foram produzidos, em paralelo, dois pães diferentes, sendo que num foi utilizada a levedura L17 e, no outro, levedura comercial, comum às formulações anteriores.

Uma vez que, aquando da produção da levedura em ambiente laboratorial, não se conseguiu obter quantidade suficiente para substituir a utilizada na formulação (250 g), calculou-se a quantidade necessária de cada ingrediente, usando a quantidade disponível de levedura L17 como referência (165 g). Na Tabela 5 encontram-se listados os ingredientes relativos à Formulação 3.

A informação contida na Tabela 5 é comum aos dois produtos, em termos de quantidades. Pode então concluir-se que o valor obtido no cálculo da margem de erro referente à Formulação 2 não se altera (5,61 %). Uma vez que não existe ficha técnica que forneça informação nutricional relativa ao ingrediente “Fermento” utilizado, correspondente à levedura L1, os valores individuais de cada nutriente do ingrediente “Fermento” foram considerados como sendo iguais aos da levedura comercial. Os valores de informação nutricional referente à Formulação 3 são idênticos aos da Formulação 2, apresentados na Tabela 4.

Tabela 5 – Formulação 3 – Ingredientes (e respetivas quantidades, em massa, *m*) constituintes da receita base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita

Ingrediente	<i>m</i> /kg	Ingrediente	<i>m</i> /kg
Farinha T55	1,651	Bagas de goji	0,099
Farinha T150	0,330	Sementes de chia	0,198
Farelo de trigo	0,198	Sementes de linhaça castanha	0,165
MIX Paniprado	0,099	Sementes de quinoa	0,066
Glúten	0,059	Sementes de girassol	0,033
Sal	0,040	Soja granulada pequena	0,099
Propionato de cálcio	0,007		
Conservant T (ácido sórbico)	0,007		
<i>Xtendlife</i>	0,017		
Gordura	0,059		
Água	1,514		
Farinha de linhaça	0,099		
Fermento	0,165		

O produto final deste teste traduziu-se na forma de pães individuais, separados consoante a formulação a que correspondem, e com cerca de 50 g de peso, de modo a facilitar a posterior prova sensorial.

4.2.4 Formulação 4 – Levedura I200

Na Formulação 4 foram produzidos, em paralelo, dois pães diferentes, sendo que na formulação de um foi utilizada a levedura I200 e, na do outro, a levedura comercial, comum às formulações anteriores.

O procedimento utilizado na obtenção das quantidades das formulações foi semelhante ao descrito no subcapítulo anterior, referente aos testes com as Formulações 2 e 3. Houve apenas uma alteração na formulação, referente ao valor da quantidade de “Fermento” (levedura I200) que se conseguiu obter para a utilização no teste, tendo sido igual a 170 g. Na Tabela 6 encontram-se listados os ingredientes da Formulação 4.

Tabela 6 – Formulação 4 – Ingredientes (e respetivas quantidades, em massa, *m*) constituintes da receita base, à esquerda, e sementes adicionadas, à direita

Ingrediente	<i>m</i> /kg	Ingrediente	<i>m</i> /kg
Farinha T55	1,7	Bagas de goji	0,102
Farinha T150	0,34	Sementes de chia	0,204
Farelo de trigo	0,204	Sementes de linhaça castanha	0,17
MIX Paniprado	0,102	Sementes de quinoa	0,068
Glúten	0,0612	Sementes de girassol	0,034
Sal	0,0408	Soja granulada pequena	0,102
Propionato de cálcio	0,0068		
Conservant T (ácido sórbico)	0,0068		
Xtendlife	0,017		
Gordura	0,0612		
Água	1,2376		
Farinha de linhaça	0,102		
Fermento	0,17		

Tal como descrito no subcapítulo 4.2.3, também neste teste a tabela apresentada (neste caso a Tabela 6) representa as quantidades dos ingredientes utilizados, tanto na Formulação 4, como na 2. O valor relativo à margem de erro para a Formulação 4 é semelhante ao valor obtido e referenciado no subcapítulo anterior (5,61 %), uma vez que, tal como para a Formulação 3, não se possuía nenhum tipo de informação nutricional referente ao único ingrediente que diferia das outras formulações, a levedura utilizada. Em todos os cálculos, e de forma a uniformizar o processo, foram utilizados os valores nutricionais referentes à levedura comercial como pertencentes à levedura I200, tal como no capítulo 4.2.3, com a levedura L17. Portanto, a informação nutricional relativa à Formulação 4 é também idêntica à referente às Formulações 2 e 3, podendo ser consultada na Tabela 4.

Na Figura 7 encontram-se os pães individuais que são produto final da aplicação da Formulação 4, sendo que na imagem apenas se encontra um dos dois tipos de pão produzidos, referentes a uma das leveduras.



Figura 7 – Produto final da aplicação da Formulação 4.

O produto final deste teste traduziu-se, tal como no teste referenciado no subcapítulo 4.2.3, na forma de pães individuais, tendo estes sido divididos por tipo, consoante a formulação a que correspondem, de modo a facilitar a posterior prova sensorial. Estes pães têm um tamanho semelhante ao comum *bijou*, com cerca de 50 g de peso.

5. Avaliação Sensorial dos Produtos Desenvolvidos

No sentido de avaliar os produtos desenvolvidos, foram efetuadas duas séries de análises sensoriais, tendo correspondido cada uma, respetivamente, à prova dos pães produzidos nos subcapítulos 4.2.3 e 4.2.4 (Formulações 3 e 4). As duas séries de provas foram levadas a cabo em semanas diferentes, tendo os respetivos pães sido produzidos no dia anterior a cada prova, por volta das 19:00 h, e postos à prova no dia seguinte, de modo a garantir que tinham arrefecido completamente. Tal situação é a ideal, de modo a garantir que as características do pão se encontrem no seu potencial sensorial máximo (Elía, 2011; Škrbić & Filipčev, 2008).

O formato da prova consistiu na análise sensorial pelo provador de dois pães individuais, sem conhecimento de qualquer informação nutricional ou de composição a seu respeito, tendo um dos produtos sido produzido com levedura comercial e o outro com a levedura da empresa Vinalia. A ficha de análise sensorial utilizada foi adaptada diretamente de fichas standardizadas existentes, adaptadas, estando disponível no Anexo C (Elía, 2011).

Todos os provadores são indivíduos voluntários e não especializados, escolhidos aleatoriamente. Houve a tentativa de conseguir a maior percentagem possível de provadores com idade igual ou superior a 65 anos, de forma a tornar o estudo ainda mais significativo dentro do trabalho. No entanto, a percentagem de indivíduos com essas características que faz parte do grupo de inquiridos é inferior a 10 %. Todos os valores, relativos a resultados, apresentados e utilizados no capítulo 5 (e todos os incluídos no mesmo) representam a mediana dos dados obtidos.

Devido à natureza das provas, nomeadamente as circunstâncias de produção, diferenças expectáveis no mesmo tipo de produtos (por serem fornadas de dias diferentes, tendo as provas sido feitas também em dias diferentes), reduzido painel de provadores e falta de especialização técnica dos mesmos, os dados obtidos não se podem considerar absolutos. Portanto, todas as conclusões referentes à sua análise devem ser olhadas de forma relativa, tendo em conta o fator associado de incerteza.

5.1 Prova A – Comparação entre as leveduras L17 e comercial

Em primeiro lugar, foi efetuada a prova A, na qual o provador comparou um pão produzido com a levedura L17 (amostra 1A) com um pão produzido com a levedura comercial (amostra 2A). O

painel de amostra consistiu em 22 provadores (10 mulheres e 12 homens). Foram compilados os resultados em gráficos relativos à componente visual (Figura 8), à componente olfativa (Figura 9) e à componente gustativa (Figura 10).

Todos os provadores da Prova B foram também participantes na Prova A. No entanto, devido ao facto de a Prova A ter um maior número de provadores (logo, não comuns às duas provas), devem ser consideradas as diferenças em termos de incerteza quanto à análise dos resultados obtidos que esta situação causa.

A Figura 8 apresenta os resultados finais relativos à componente visual da prova. Pode concluir-se, de forma generalizada, que as duas amostras são idênticas em todos os parâmetros, excetuando o parâmetro relativo a “Migalhas”. Tal parâmetro visa aferir quanto à produção de migalhas aquando do corte/divisão do pão em duas ou mais partes. Procura-se um pão que produza menos migalhas no ato da refeição, o que parece tornar a amostra 2 mais atrativa, relativamente à componente visual da prova.

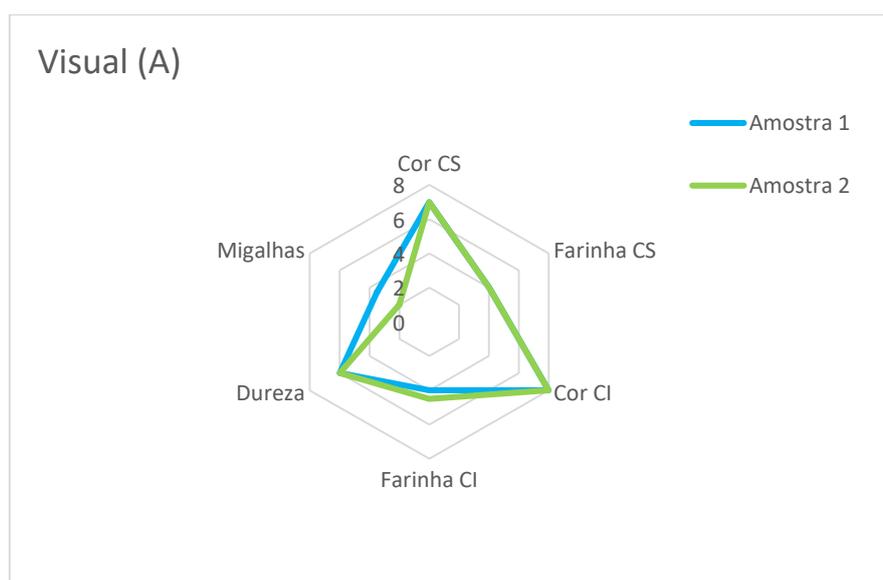


Figura 8 – Resultados da Componente Visual da prova A.
Nota: CS – Crosta Superior; CI – Crosta Inferior

No que se refere à componente olfativa da prova sensorial (Figura 9), conclui-se, mais uma vez, que, de forma geral, as duas amostras são muito semelhantes. Ténues diferenças de 0,5/10 separam as duas amostras, nos pontos em que há diferença nos resultados, sendo que não são consideradas relevantes. A análise do parâmetro “Impressão geral” revela que existe uma

diferença mínima (0,5) entre o valor das duas amostras, dando a entender que o seu nível de aceitação relativamente à componente olfativa do produto é semelhante.

Serão agora listados (ainda que com elevado grau de incerteza) exemplos de possíveis compostos voláteis do aroma, que podem estar presentes, baseando-se nas respetivas características odoríferas, identificadas pelos provadores, acima do seu limiar de perceção (considerado como valor mínimo 3/10), fazendo uma relação direta entre os parâmetros da ficha de prova e as respetivas características odoríferas de cada composto (Birch *et al.*, 2013; Pico *et al.*, 2015). Note-se que os parâmetros apresentados seguidamente estão representados nas duas amostras em quantidade significativa. A ordem de aparecimento não tem relevância.

- Fermento (levedura): 2-pentanol, 2-octan-4-ona;
- Fruta: acetato de etilo, octanoato de etilo, 2-pentilfurano, 1-propanol, 2-heptanol, 1-pentanol, 1-butanol, 2-etil-1-decanol, 3-etoxi-1-propanol, 2-nonen-1-ol, 2-undecanol, 1-nonanol, 3-metil-3-buten-1-ol, nonanal, decanal, 2-undecanal, octanal, acetaldeído, 2-octanona, 2-nonanona, 2-nonan-4-ona, acetato de butilo, nonanoato de etilo;
- Frutos secos: benzaldeído, 5-metil-2-furfural, 3-furfural, 2-(E)-octenal, 2-metilbutanal;
- Tostado: 3-metilbutanal, fenilacetaldéido, guaiacol, butanal, propanal, 2-(E)-octenal;
- Manteiga: 2,3-butanodiona, decanol, 1-penten-3-ol, 2-(E)-octenal, 3-hidroxi-2-butanona, 2,3-hexanodiona.

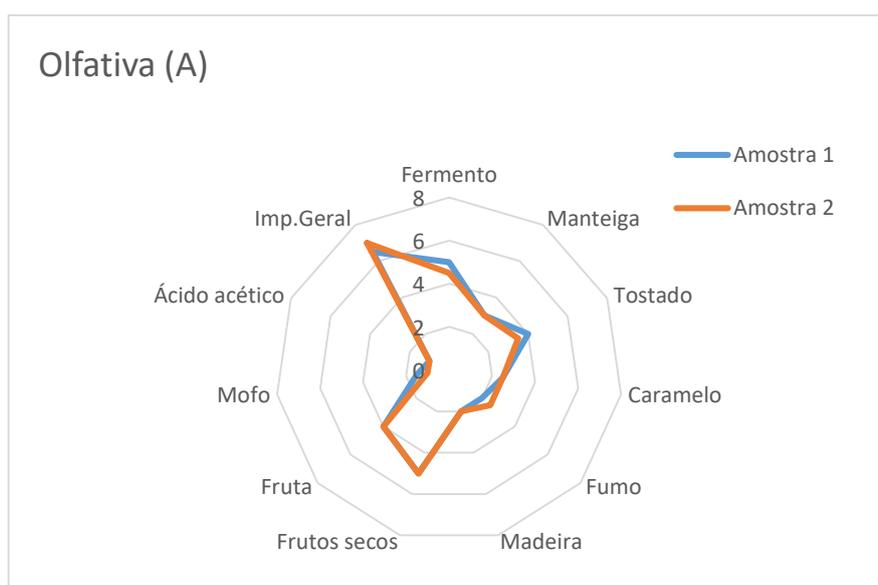


Figura 9 – Componente Olfativa da prova A.

Relativamente à componente gustativa da prova sensorial (Figura 10), parece poder concluir-se que o pão produzido com levedura L17 (Amostra 1) tem uma presença mais acentuada no que respeita às características não desejadas, tais como sabores “Ácido”, “Amargo”, “Desagradável” (ainda que por 0,5/10) e até “Tostado”. De notar também que, não obstante estes resultados negativos relativamente à Amostra 1, o parâmetro de “Impressão Geral” apresenta o mesmo valor da Amostra 2 (pão produzido com levedura comercial), dando a entender que o seu nível de aceitação relativamente à componente gustativa do produto é similar.

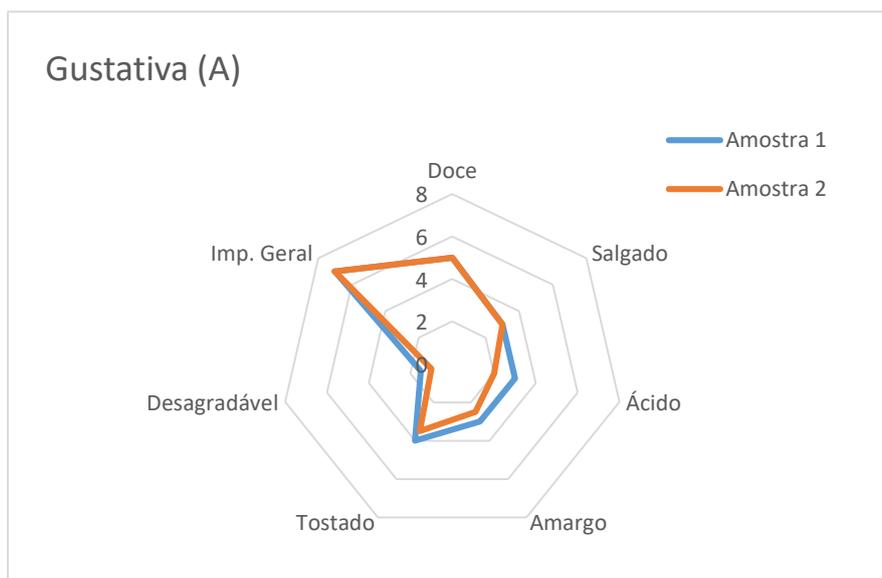


Figura 10 – Resultados da Componente Gustativa da prova A.

Quanto ao parâmetro “NOTA FINAL”, que engloba todos os outros, e no qual o inquirido demonstra a sua classificação do pão, de uma forma objetiva, na escala apresentada, a amostra 1A obteve 7/10, enquanto a amostra 2A obteve 8/10. De acordo com os resultados, tendo em conta a sua falibilidade, e por uma pequena margem, conclui-se que a amostra 2A, referente ao pão produzido com a levedura comercial, supera a amostra 1A.

5.2 Prova B – Comparação entre as leveduras I200 e comercial

Foi efetuada a prova B, dias depois da prova A, na qual os provadores compararam um pão produzido com a levedura I200 (Amostra 1B) com um pão produzido com a levedura comercial (Amostra 2B). A análise sensorial foi realizada por 17 provadores (8 mulheres e 9 homens), todos

eles comuns à Prova A. Foram compilados os resultados em gráficos relativos à componente visual (Figura 11), à componente olfativa (Figura 12) e à componente gustativa (Figura 13).

É de referir mais uma vez que se admite a existência de potenciais pequenas diferenças entre o lote de pão produzido com amostra comercial para a Prova B, relativamente à Prova A, sendo que a análise dos resultados deve ter em conta esse fator.

Relativamente à componente visual, é de notar a semelhança dos resultados das duas amostras. Os parâmetros nos quais se observam diferenças são os parâmetros “Dureza”, “Farinha da Crosta Superior”, “Cor da Crosta Inferior”. Relativamente ao parâmetro “Dureza”, e uma vez que os dois resultados se encontram abaixo dos 5/10, nenhum é considerado que se encontre a um nível que leve a que seja tomado como característica negativa, uma vez que se prefere uma menor dureza, geralmente, em pão. Relativamente aos dois restantes parâmetros, de entre os mencionados, nenhum apresenta valores que possam indicar qualquer característica indesejável, ou diferenças consideráveis entre si.

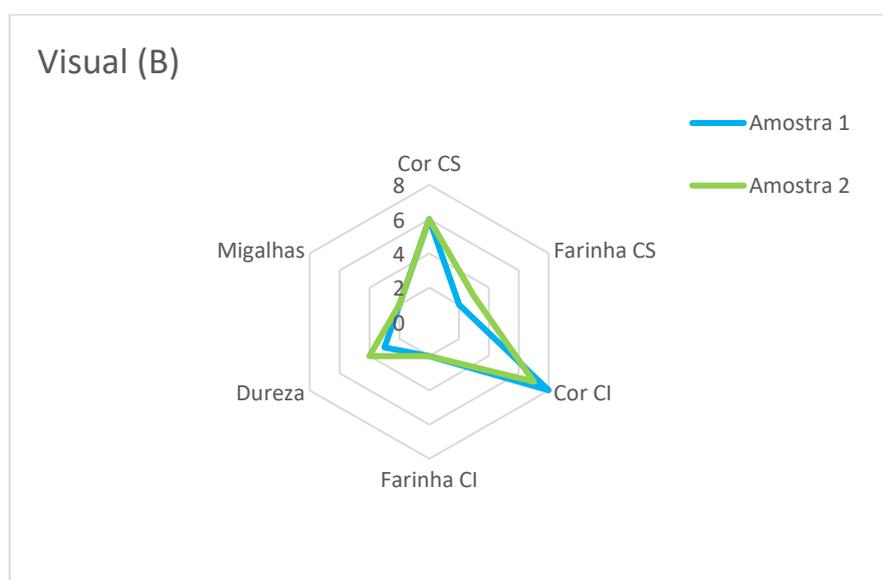


Figura 11 – Resultados da Componente Visual da prova B.
Nota: CS –Crosta Superior; CI – Crosta Inferior

Analisando a componente olfativa da ficha de prova sensorial (Figura 12), observa-se que os resultados das duas amostras seguem, de forma geral, o mesmo perfil. As diferenças encontram-se nos parâmetros: “Frutos secos”, “Fermento” e “Tostado”. Tal como os parâmetros destacados na análise à componente visual, estes não apresentam diferenças consideráveis entre si (respetivas amostras), nem valores que possam fazer surgir nenhum tipo de comentário negativo.

Nota para o facto de o resultado relativo ao parâmetro “Impressão Geral” ser igual para as duas amostras, indicando que se encontram no mesmo patamar a nível de preferência dos inquiridos.

Foram identificados exemplos de possíveis compostos voláteis do aroma que podem estar presentes (ainda que com elevado grau de incerteza), baseando-se nas respetivas características odoríferas, identificadas pelos provadores, acima do seu limiar de perceção (considerado como valor mínimo 3/10) e fazendo uma relação direta entre os parâmetros da ficha de prova e as respetivas características odoríferas de cada composto (Birch *et al.*, 2013; Pico *et al.*, 2015). Os compostos voláteis do aroma relativos à Prova B são semelhantes aos da Prova A, de entre os representados nas duas amostras em quantidade significativa, com exceção do parâmetro “Tostado”, apenas presente na Amostra 2, e o parâmetro “Manteiga”, não presente em nenhuma das amostras.

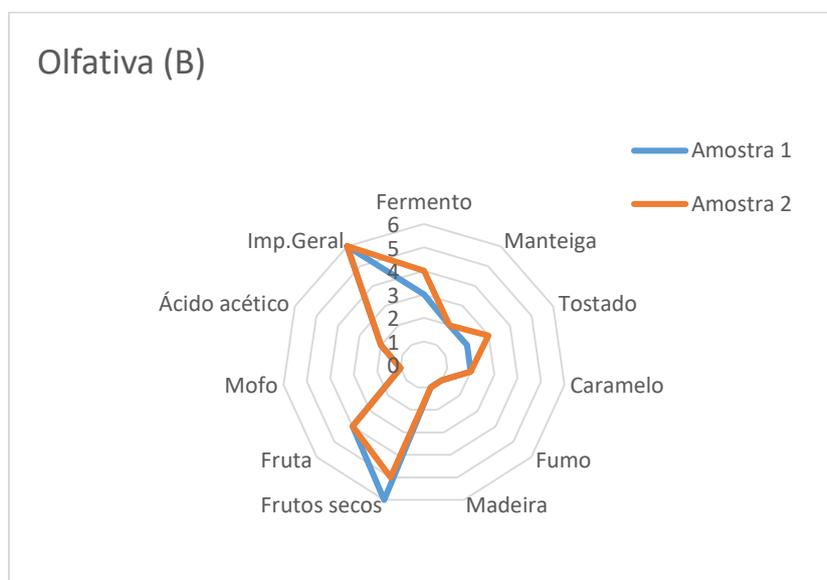


Figura 12 – Resultados da Componente Olfativa da prova B.

Relativamente à componente gustativa da ficha de prova (Figura 13), consegue-se imediatamente notar que, mais uma vez, os resultados das duas amostras seguem o mesmo padrão. No entanto, após análise dos resultados, nota-se uma diferença de 1 ponto no parâmetro “Impressão Geral”, no qual a Amostra 1 (pão produzido com a levedura I200) leva a melhor. Relativamente ao parâmetro “Doce”, no qual a diferença entre amostras é também de 1 ponto, é pertinente lembrar que um dos objetivos do projeto é produzir um produto final que não tenha sabor doce, de modo a poder ser consumido a qualquer altura do dia, e em qualquer refeição. Face a esta situação, conclui-se que a vantagem que a Amostra 1 apresenta relativamente ao parâmetro

“Impressão Geral” é mitigada, ou até anulada, pelo facto de ter apresentado um resultado superior, em 1 ponto, no parâmetro “Doce”.

Note-se que o resultado relativo ao parâmetro “NOTA FINAL” indica que as duas amostras obtiveram a mesma pontuação, 8/10. Tal resultado revela que o nível de aceitação das duas amostras por parte dos inquiridos é semelhante, não permitindo, portanto, declarar a existência de qualquer preferência.

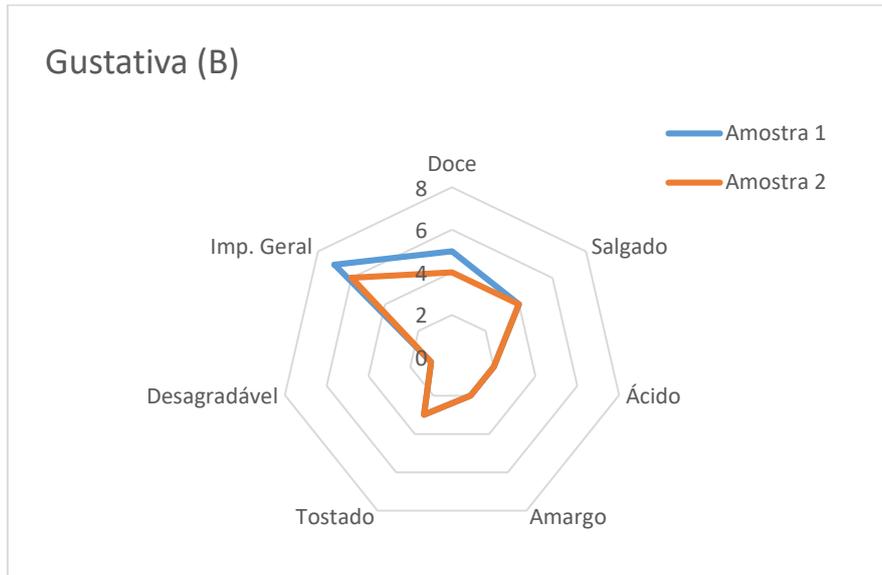


Figura 13 – Resultados da Componente Gustativa da prova B.

6. Conclusões e Perspetivas de Trabalho

Relativamente ao processo de desenvolvimento da Formulação final, marcado pela otimização de formulações, até atingir o resultado final, pode concluir-se que se cumpriram, em grande parte, os objetivos que foram propostos no início do projeto. De notar o sucesso na obtenção de todas as alegações nutricionais (olhando apenas aos valores calculados, sem confirmação por entidade certificada), segundo a legislação em vigor, relativas ao teor de fibra e ao teor de gordura, que foram definidas como objetivo mínimo: “Fonte de fibra”, “Baixo teor de gordura saturada”, “Baixo teor de gordura” e “Fonte de proteína”. Adicionalmente, conseguiu-se obter a alegação mais favorável ao cumprimento dos objetivos, relativa ao teor de fibra: “Alto teor em fibra”. Não se conseguiu, no entanto, atingir o nível seguinte das declarações nutricionais relativas ao teor de gordura e ao teor de proteína, respetivamente, “Sem gordura” e “Alto teor de proteína”. Tal não se considerou de elevada importância, uma vez que estes dois objetivos tinham sido declarados como objetivos secundários, no início do projeto.

Analisando os resultados com o necessário grau de incerteza, face às circunstâncias apresentadas, conclui-se que nenhuma das estirpes de levedura não comerciais apresentou resultados que justifiquem uma potencial substituição da levedura comercial, tendo apresentado resultados muito idênticos entre si. Uma vez que as leveduras não comerciais ainda não foram submetidas aos procedimentos necessários para a sua aprovação como estirpes comerciais, não provaram que tal empreendimento compensasse.

Em provas futuras, recomenda-se que se utilizem amostras com um número mais elevado de provadores, mantendo sempre uma distribuição igualitária de género, e que se utilize o maior número possível de provadores pertencentes ao público-alvo.

Referências Bibliográficas

- AFP. (2010). Prehistoric man ate flatbread 30,000 years ago: study. Consultado em 27 de Setembro, 2016, em <http://phys.org/news/2010-10-prehistoric-ate-flatbread-years.html>
- Alcock, J. P., Marchant, J. H., & Reuben, B. G. (2009). *Bread, a Slice of History*. The History Press Ltd.
- Arroyo-López, F. N., Orlić, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 120–127. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>
- Lei 75/2009 de 12, de Agosto de 2009. *Diário da República*, 155(1), 5225–5226.
- BIRT - Baking Industry Research Fund. (2016). History of Bread Production. Consultado em 25 de Setembro, 2016, em <http://www.bakeinfo.co.nz/Facts/Bread-making/Bread-production-in-New-Zealand>
- Bekatorou, A., Psarianos, C., & Koutinas, A. A. (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 407–415.
- Birch, A. N., Petersen, M. A., Arneborg, N., & Hansen, Å. S. (2013). Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. *Food Research International*, 52(1), 160–166. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.011>
- Busti S, Coccetti P, Alberghina L, V. M. (2010). Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Samsons*, 10(6), 6195 - 6240.
- Regulamento (CE) N.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho (retificado), 22, 1–76.
- Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho (retificado), 50, 1–54.
- de Alencar, E. M. B., de Souza-Motta, C. M., Walter, B. S., Pessoa Santos, R. M., Marques, O. M., & de Queiroz, L. A. (2009). Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), 819–824. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132009000400004>

- Donno, D., Beccaro, G. L., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., & Bounous, G. (2015). Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1070–1085. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.020>
- Elia, M. (2011). A procedure for sensory evaluation of bread: Protocol developed by a trained panel. *Journal of Sensory Studies*, *26*(4), 269–277. <http://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2011.00342.x>
- Figoni, P. I. (2010). *How Baking Works: Exploring the Fundamentals of Baking Science* (3rd ed.). Wiley.
- Gill, K. S. (1987). *Linseed*. New Dehli: Publications and Information Division Indian Council of Agricultural Research. Consultado em http://krishikosh.egranth.ac.in/HD/common/split_document.jsp?doc=289.pdf1/2049071/1/
- Heenan, S. P., Dufour, J. P., Hamid, N., Harvey, W., & Delahunty, C. M. (2009). Characterisation of fresh bread flavour: Relationships between sensory characteristics and volatile composition. *Food Chemistry*, *116*(1), 249–257. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.042>
- Briggs, K. (2014). Water-Soluble Vitamins 101, *1*.
- INE - Instituto Nacional de Estadística. (2015). *Estatística Demográfica 2014*.
- Kreuter MW , Brennan LK , Scharff DP, L. S. (1997). Do nutrition label readers eat healthier diets? Behavioral correlates of adults' use of food labels. *American Journal of Preventive Medicine*. *13*(4), 277-283.
- Ministérios da Economia da Agricultura e do Mar e da Saúde. (2015). Portaria nº52/2015, *Diário da República*, (26/2/2015), 1202–1204.
- Mohd-Radzman, N. H., Ismail, W. I. W., Adam, Z., Jaapar, S. S., & Adam, A. (2013). Potential role of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review, *Evidence-based Complementary Alternative Medicine*, *2013*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/718049>.
- Mortimer, R. K., & Johnston, J. R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*, *113*(1), 35–43.

- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2013). Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. *Food Reviews International*, 29(4), 394–408. <http://doi.org/10.1080/87559129.2013.818014>
- Newman, S. (2013). Bakers in the Middle Ages. The Finer Times, Consultado dia 27 de setembro, 2016, em <http://www.thefinertimes.com/Middle-Ages/bakers-in-the-middle-ages.html>
- Nutrition Up 65. (2015). Nutrition Up 65 Project. In *Faculdade de Ciências da Alimentação e Nutrição (Universidade do Porto)*.
- ONU - Organização das Nações Unidas. (2015). *World population Ageing*. <http://doi.org/ST/ESA/SER.A/390>
- Paniprado - Panificadora do Prado Lda. (2016). Método de Fabrico Paniprado.
- Pico, J., Bernal, J., & Gómez, M. (2015). Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review. *Food Research International*, 75, 200–215. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.051>
- Prado, C. M. M., Wells, J. C. K., Smith, S. R., Stephan, B. C. M., & Siervo, M. (2012). Sarcopenic obesity: A Critical appraisal of the current evidence. *Clinical Nutrition*, 31(5), 583–601. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.06.010>
- Randez-Gil, F., Isaac, C.-S., & Prieto, J. a. (2013). Genetic and phenotypic characteristics of baker's yeast: relevance to baking. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 191–214. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182609>
- Rodrigues, F., Ludovico, P., & Leão, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts : an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, 101–121. http://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_6
- Sacks, F. M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P., & Winston, M. (2006). Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: An American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, 113(7), 1034–1044. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171052>

- Scrimshaw, & Murray. (2008). The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *The American Society for Clinical Nutrition, Inc.*
- Škrbić, B., & Filipčev, B. (2008). Nutritional and sensory evaluation of wheat breads supplemented with oleic-rich sunflower seed. *Food Chemistry, 108*(1), 119–129. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.052>
- Tanahill, R. (1995). *Food in History* (Broadway Books).
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90*(15), 2541–2547. <http://doi.org/10.1002/jsfa.4158>
- Vieira, É. de A. (2016). *Potencial Nutricional e Antioxidante de Goji berry (Lycium barbarum L.)*. Universidade Federal da Paraíba, Brasil.
- Yalcin, S. K., & Ozbas, Z. Y. (2008). Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology, 39*(2), 325–332. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200024>

ANEXOS

ANEXO A – Exemplo de ficha técnica de fabrico utilizada pela Paniprado

ANEXO B – Protocolos para crescimento de leveduras

Anexo B1 – Protocolo-base

Anexo B2 – Protocolo utilizado no trabalho

ANEXO C – Ficha de análise sensorial

ANEXO D – Fichas nutricionais dos ingredientes utilizados

Anexo A – Exemplo de Ficha técnica de fabrico utilizada na Paniprado

PANIPRADO						
PRODUTO	FORMA SENIOR					
FICHA TECNICA DE FABRICO						
RECEITA						
MATERIA PRIMA	PESO	PESO	PESO	% /	%/ TOTAL	
	1 MASSA	1/2 MASSA	1/4 MASSA	FARINHA		
FARINHA T55	2,500	1,250	0,625		37,23%	AM
FARINHA T150	0,500	0,250	0,125	20,00%	7,45%	
SEMEA GROSSA	0,300	0,150	0,075	12,00%	4,47%	
MIX PANIPRADO	0,150	0,075	0,038	5,00%	2,23%	
GLUTEN	0,090	0,045	0,023	3,00%	1,34%	
SAL	0,060	0,030	0,015	2,00%	0,89%	
PROPINATO	0,010	0,005	0,003	0,33%	0,15%	PES
CONSERVANT T	0,010	0,005	0,003	0,33%	0,15%	
XTENDLIFE	0,025	0,013	0,006	0,83%	0,37%	DES
GORDURA	0,090	0,045	0,023	3,00%	1,34%	
AGUA	1,820	0,910	0,455	60,67%	27,10%	ROI
FARINHA LINHAÇA	0,150	0,075	0,038	5,00%	2,23%	PO:
FERMENTO	0,250	0,125	0,063	8,33%	3,72%	PO:
AGUA GOJI	0,100	0,050	0,025		1,49%	
AGUA SEMEA GROSSA	0,660	0,330	0,165		9,83%	
		0,000	0,000		0,00%	
		0,000	0,000		0,00%	
TOTAL	6,715	3,358	1,679	100,50%	100%	T
						O
TOTAL DECORAÇÕES	0,000	0,000	0,000			
QUANTIDADE DE UNIDADES POR MASSA	216	108	54			F
OBSERVAÇÕES						
<p>AO COLOCAR A MASSA NA LATA COLOCAR COM A EMENDA PARA BAIIXO E O MAIS UNIFORME POSSIVEL PARA LEVEDAR UNIFORME</p>						

Anexo B1 – Protocolo-base

Microrganismos e Inóculo

Foram usadas 8 estirpes de leveduras diferentes (duas comerciais e seis selvagens). Culturas destas leveduras foram mantidas a 4 °C em meios cuja composição consiste em: extrato de levedura (3,0 g/L), extrato de malte (3,0 g/L), peptona (5,0 g/L), glucose (10,0 g/L), agar (10,0 g/L).

Para a preparação do inóculo, as leveduras cresceram durante 24 h, numa incubadora a 30 °C e 200 min⁻¹, num erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio composto por: glucose (50,0 g/L), fosfato de amónio dibásico (3,0 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (1,0 g/L), extrato de levedura (3,0 g/L). Após 24 h, as células foram centrifugadas (4000 min⁻¹, 10 min) para retirar o meio de fermentação, tendo sido, de seguida, ressuspensas em meio fresco e postas a crescer num erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL do mesmo meio. Após 24 h foi retirado o meio por centrifugação e efetuada uma nova lavagem às células.

Condições de Fermentação

Os ensaios decorreram num biorreator de 5 L (BIOSTAT ED, B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany), contendo 4 L de meio de fermentação, com composição igual ao meio do inóculo. O pH inicial foi ajustado com ácido fosfórico até 4,5 e o meio foi autoclavado dentro do reator a 110 °C durante 20 min. Após arrefecimento foi inoculado com as células obtidas no inóculo, a fermentação foi mantida a 30 °C e com rotação de 180 min⁻¹. O arejamento foi ajustado para 4 L/min e o pH foi mantido a 4,5 usando uma solução de hidróxido de amónio (diluída 1/5). Foi adicionado ao meio 0,5 mL de antiespuma, para evitar a sobreformação de espuma. As fermentações duraram entre 19 h a 28 h e foram retiradas amostras para determinar a concentração de açúcares e concentração celular. No fim da fermentação o conteúdo do reator foi colocado em Erlenmeyers de 2,5 L e mantido a 4 °C *overnight*. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado por decantação e sucção (bomba de vácuo).

Anexo B2 – Protocolo utilizado no trabalho

Microrganismos e Inóculo

Foram usadas 8 estirpes de leveduras diferentes (duas comerciais e seis selvagens). Culturas destas leveduras foram mantidas a 4 °C em meios cuja composição consiste em: extrato de levedura (3,0 g/L), extrato de malte (3,0 g/L), peptona (5,0 g/L), glucose (10,0 g/L), agar (10,0 g/L).

Para a preparação do inóculo, as leveduras cresceram durante 24 h, numa incubadora a 30 °C e 200 rpm, num erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio composto por: glucose (50,0 g/L), fosfato de amónio dibásico (3,0 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (1,0 g/L), extrato de levedura (3,0 g/L). Após 24 h, as células foram centrifugadas (4000 rpm, 10 min.) para retirar o meio de fermentação, tendo sido, de seguida, ressuspensas em meio fresco e postas a crescer num erlenmeyer de 1 L, contendo 500 mL do mesmo meio, num agitador orbital a 30 °C e 200 min⁻¹. Após 24 h foi retirado o meio por centrifugação.

Condições de Fermentação

Os ensaios decorreram em dois Erlenmeyers de 5 L, contendo cada um 4 L de meio de fermentação, com composição igual ao meio do inóculo. O pH inicial foi ajustado com HCl até 4,5 e o meio foi autoclavado dentro do reator a 110 °C durante 20 min. Após arrefecimento foi inoculado com as células obtidas no inóculo, tendo estas sido ressuspensas em meio fresco, sendo que a fermentação foi mantida à temperatura ambiente. O arejamento foi ajustado para 4 L/min. A fermentação durou 48h, sendo que, no final desse período, o conteúdo dos Erlenmeyers foi centrifugado, a 4000 min⁻¹, durante 10 min., e o depósito foi recolhido.

Anexo C – Ficha de análise sensorial

FICHA DE PROVA DE PÃO

NOME :

Idade:

Data:

Avaliar as características organolépticas do pão numa escala de 0 a 10
(1 = ausência a 10 = muito intenso).

VISUAL	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2
Crosta superior		
Cor	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Farinha	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Crosta inferior		
Cor	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Farinha	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Textura		
Dureza	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Migalhas	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩

OLFATIVO		
Fermento	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Manteiga	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Tostado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Caramelo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Fumo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Madeira	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Frutos secos	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Fruta	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Mofo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Ácido acético (vinagre)	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Impressão	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Geral		

GUSTATIVO		
Doce	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Salgado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Ácido	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Amargo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Tostado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Desagradável	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Impressão Geral	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩

NOTA FINAL	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
-------------------	---------------------	---------------------

OBSERVAÇÕES

Anexo D – Fichas nutricionais dos ingredientes utilizados

Farinha T55:

<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalheAlimento.aspx?ID=IS415> (Consultado no dia 17/05/2016)

Farinha T150:

<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalheAlimento.aspx?ID=IS414> (Consultado no dia 17/05/2016)

Farelo de trigo:

USDA National Nutrient Database

Basic Report

Report Run at: June 08, 2016 07:28 EDT

Nutrient data for: 20033, Oat bran, raw

Nutrient,Unit,1Value per 100 g,"1 cup = 94.0g",

Proximates

Water,g,6.55,6.16

Energy,kcal,246,231

Protein,g,17.30,16.26

Total lipid (fat),g,7.03,6.61

Carbohydrate, by difference,g,66.22,62.25

Fiber, total dietary,g,15.4,14.5

Sugars, total,g,1.45,1.36

Minerals

Calcium, Ca,mg,58,55

Iron, Fe,mg,5.41,5.09

Magnesium, Mg,mg,235,221

Phosphorus, P,mg,734,690

Potassium, K,mg,566,532

Sodium, Na,mg,4,4

Zinc, Zn,mg,3.11,2.92

Vitamins

Vitamin C, total ascorbic acid,mg,0.0,0.0

Thiamin,mg,1.170,1.100

Riboflavin,mg,0.220,0.207

Niacin,mg,0.934,0.878

Vitamin B-6,mg,0.165,0.155

Folate, DFE,µg,52,49

Vitamin B-12,µg,0.00,0.00

Vitamin A, RAE,µg,0,0

Vitamin A, IU,IU,0,0

Vitamin E (alpha-tocopherol),mg,1.01,0.95

Vitamin D (D2 + D3),µg,0.0,0.0

Vitamin D,IU,0,0

Vitamin K (phylloquinone),µg,3.2,3.0

Lipids

Fatty acids, total saturated,g,1.328,1.248

Fatty acids, total monounsaturated,g,2.376,2.233

Fatty acids, total polyunsaturated,g,2.766,2.600

Cholesterol,mg,0,0

Amino Acids

Other

Caffeine,mg,0,0

Soja granulada pequena:



Nombre producto / Product name TROCEADO PEQUEÑO DE SOJA

Código Trades 026014

SUITABILITY DATA

	Suitable	Unsuitable	Certified	Not certified	Comment
Vegetarian (Ova-Lacto)	X				
Vegan	X				
Coeliac	X				
Kosher	X			X	Certification on request
Halal	X			X	Certification on request

NUTRITION INFORMATION

Nutrient	Typical Value	Unit
Energy in kJ	1798	kJ
Energy in Kcal	430	Kcal
Total Carbohydrates	12,08	g
Carbohydrates as Sugars	7,96	g
Total Fat	24,81	g
Saturated Fat	3,9	g
Monounsaturated Fat	4,96	g
Polyunsaturated Fat	15,95	g
Protein (N X 6,25)	39,70	g
Dietary Fibre	17,98	g
Sodium	0,0	mg
Ash	3,93	g

Data Source

Analyses by external laboratory

METAL DETECTION LIMITS

>1.0 mm Ferrous, >1.2 mm non-Ferrous, >1.6 mm Stainless steel

Farinha/sementes de linhaça castanha:

1. Description of product

Description :	Linseed, Brown
Taste :	typical
Odor :	typical
Purity :	99,90%
Moisture :	< 10%

2. Legal information

Legal name :	Linseed
Intended use :	edible seeds, must be heated as ingredient or before direct consumption
Organic status :	non-organic
Legislation :	adheres to current European food legislation
Certificate of analyses :	per contractual agreement
Certificate of conformance :	provided

3. List of ingredients (QUID)

Linseed

4. Microbiological characteristics (tested by an external accredited laboratory)

aerobe number of germs :	max. 5,000,000 cfu/g
coliforms :	max. 25,000 cfu/g
yeast/moulds :	max. 5,000 cfu/g
escherichia coli :	max. 100 cfu/g
salmonella :	negative in 25/g

5. Nutritional value per 100 gram (USDA Nutrient Database, average)

energy Kcal	534 Kcal	fat (total)	42.16 g
energy Kjoule	2234 Kjoule	saturated fatty acids (total)	3.66 g
carbohydrates, by difference	28.88 g	monounsaturated fatty acid (total)	7.53 g
sugars (total)	1.55 g	polyunsaturated fatty acid (total)	28.73 g
protein	18.29 g	trans fatty acid	0.06 g
fibre (total dietary)	27.3 g	free fatty acid	<3 %
ash	3.72 g		
sodium	0.03 g		
water	6.96 g		

6. Shelf-life (unopened, original packaging)

min. 18 months after production, using stipulated storage conditions

7. Storage conditions

temperature (average) : 15 °C
rel. humidity (average) : < 50 %
unopened, kept dark and dry.
do not store the products in proximity of odorous (raw) materials.
do not stack the products.

8. Packaging markings and traceability

Product marked with label, containing ingredient(s), unit weight, batch number and best before date.
Product is traceable using the unique batch code.

9. REACH and MSDS

In reference to E.C. regulation (EC) 1907/2006 article 2, this specification does not include a safety data sheet.

Sementes de girassol:

Product Specification

1. Description of product

Description :	sunflower kernels, bakery
Taste :	typical
Odor :	typical
Purity :	99,90%
Moisture :	< 8%
Broken kernels :	< 10 %

2. Legal information

Legal name :	sunflower kernels
Intended use :	edible seeds
Organic status :	non-organic
Legislation :	adheres to current European food legislation
Certificate of analyses :	per contractual agreement
Certificate of conformance :	provided

3. List of ingredients (QUID)

Sunflower kernels

4. Microbiological characteristics (tested by an external accredited laboratory)

aerobe number of germs :	max. 1,000,000 cfu/g
coliforms :	max. 50,000 cfu/g
yeast/moulds :	max. 10,000 cfu/g
escherichia coli :	max. 100 cfu/g
salmonella :	negative in 25/g

5. Nutritional value per 100 gram (USDA Nutrient Database, average)

energy Kcal	584 Kcal	fat (total)	51.46 g
energy Kjoule	2445 Kjoule	saturated fatty acids (total)	4.46 g
carbohydrates, by difference	20.00 g	monounsaturated fatty acid (total)	18.53 g
sugars (total)	2.62 g	polyunsaturated fatty acid (total)	23.14 g
protein	20.78 g	trans fatty acid	0.06 g
fibre (total dietary)	8.6 g	free fatty acid	<3 %
ash	3.02 g		
sodium	0.09 g		
water	4.73 g		

6. Shelf-life (unopened, original packaging)

min. 18 months after production, using stipulated storage conditions

7. Storage conditions

temperature (average) : 15 °C
rel. humidity (average) : < 50 %
unopened, kept dark and dry.
do not store the products in proximity of odorous (raw) materials.
do not stack the products.

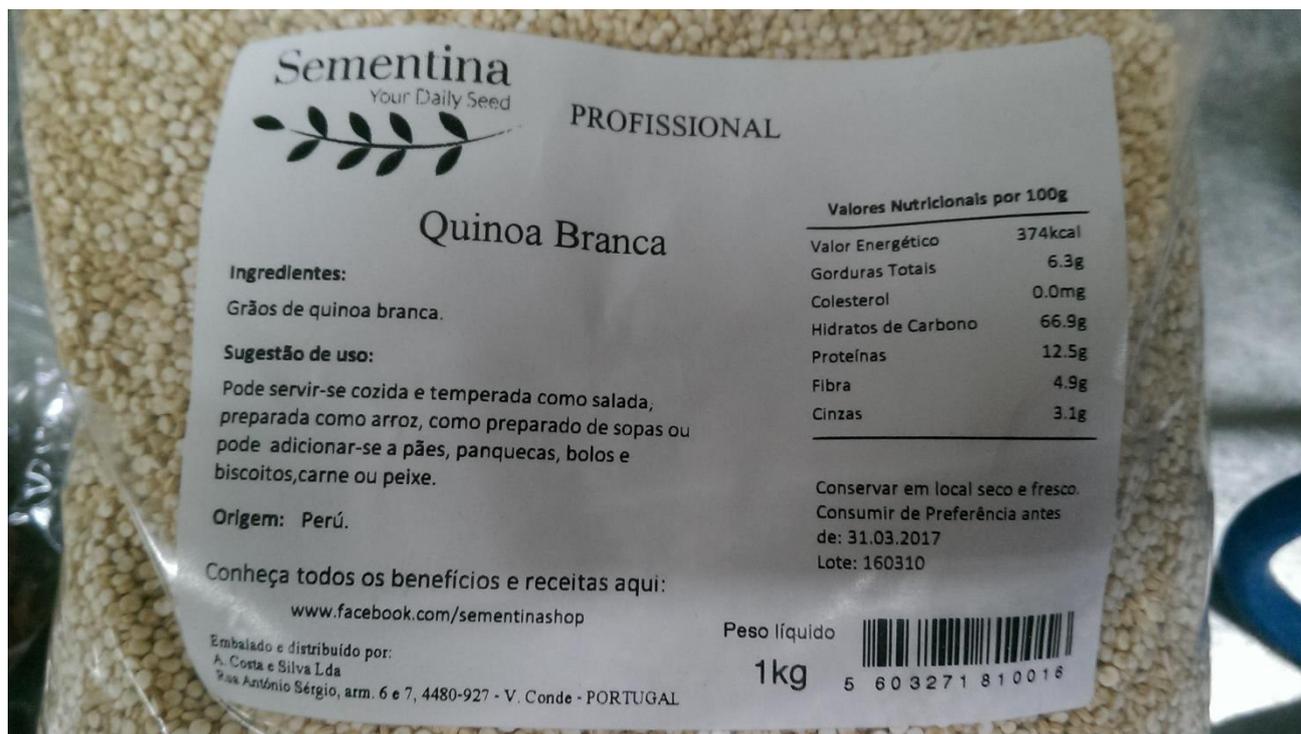
8. Packaging markings and traceability

Product marked with label, containing ingredient(s), unit weight, batch number and best before date.
Product is traceable using the unique batch code.

9. REACH and MSDS

In reference to E.C. regulation (EC) 1907/2006 article 2, this specification does not include a safety data sheet.

Sementes de quinoa:



Sementes de chia:

SPECIFICATION SHEET

Chia seeds (salvia hispanica)

2013

Organoleptic Specifications

Appearance	Seeds 3-5 mm.
Color	Black, brown & white
Odor	None
Texture	Hole seeds
Taste	None, light nutty roasted
Country of origin:	South-America

Nutritional Specifications

	per 100 gram
Protein	20,65
Carbohydrate	2
Fat	31
of which	
- Omega 3	18,6
- Omega 6	4,8
- Omega 9	1,6
Fibre	37,9
Energi	1650 kj / 400 kcal

Analytical properties

Purity	> 99,5%
Broken	> 0,1%
Insects	None
Mouldy	None
Rotten	None

Certifications & Allergy

- No allergines according to EFSA
- Kosher-certified
- Non GMO-certified

Microbiological Specifications

	Max.
Total Plate Count cfu/g	1.000.000
Yeast, cfu/g	10.000
Mould cfu/g	10.000
Coliformes cfu/g	100
E. Coli cfu/g	100
Salmonella cfu/25g	Negative/absent

Functional Specifications

According to the Novel Food registration (258/97/EC) approved for use in bread products with up to 5% calculated on the basis of the baked finished product.

Production

Producer is HACCP-certified.
X-ray-detection f. metal, glass & stones in EU

Packaging and storage conditions

Kept in it's original packaging in a cool original packaging in a cool, ventilated and dry place.

Net content	25 kg.
Kind of packing	double pp-bags

The product stability is 36 month in it's original packaging without physicochemical and organoleptic changes.

Levedura comercial:

CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

Parâmetro	Valor	Unidade	Parâmetro	Valor	Unidade
Calorias	300 – 360	Kcal/100g	Cinzas	6,0 - 10,0	% M.S.
Proteína	40,0 - 50,0	% M.S.	Cálcio	0,035	% M.S.
P ₂ O ₅	2,00 - 3,00	% M.S.	Ferro	0,005	% M.S.
Carboidratos totais	34,0 - 44,0	% M.S.	Sódio	0,1	% M.S.
Açúcares	34,0	% M.S.	Vitaminas grupo B	0,006	% M.S.
Outros carboidratos	5,0	% M.S.	Vitaminas PP	0,01	% M.S.
Lípidos totais	7,0	% M.S.			

Valores de referência, não constituem especificação do produto

MIX Paniprado:

Parâmetros Nutricionais

Valores Médios por 100g:

Humidade:	6 g
Proteína:	6 g
Gordura:	6 g
Hidratos de Carbono:	77 g
Cinza:	4 g

XTENDLIFE:

5.- ANÁLISIS NUTRICIONAL (VALORES INDICATIVOS)

Parámetro	Valor	Unidades
Valor energético	368 +/- 30	Kcal / 100 g de producto
Proteínas	1 - 11	%
Hidratos de carbono	80 - 90	%
Lípidos	<5	%
Humedad	<10	%
Grasas		%
Cenizas		%

Bagas de goji:



Soro de leite:

CRITÉRIOS FÍSICOS E QUÍMICOS / PHYSICAL AND CHEMICAL CRITERIA

Humidade	Humidity	Max 4 %
Proteína (MAT)	Protein (TWM)	Average 11 %
Gordura	Fat	Max 1,5 %
Acidez titulável	Titration acidity	Max 0,17 %

Nitritos	Nitrites	Aus / Abs
Cinza total	Total ash	< 8,5 g / 100 g
Lactose	Lactose	Min 70 %
pH	pH	6,20 - 6,70