

## **Efeito da redução do ponto de congelamento das massas para a produção de pães tipo forma contendo ingredientes funcionais sobre a viabilidade de células de levedura**

R. A. ZAMBELLI<sup>1</sup>, S. C. P. de MELO<sup>1</sup>, E. C. SANTOS-JUNIOR<sup>1</sup>, L. I. F. PINTO<sup>1</sup>, P. E. F. MELO<sup>1</sup> e D. F. PONTES<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos.  
E-mail para contato: Zambelli@alu.ufc.br

**RESUMO** - O estudo teve como objetivo estudar a redução do ponto de congelamento das massas e avaliar o efeito na viabilidade de células de levedura. Foram desenvolvidas 5 formulações de pães, uma padrão, sem a adição de ingredientes funcionais e as contendo 5 e 10% de polidextrose/brócolis em pó (B1 e B2); 5 e 10% polidextrose/açúcar em pó (A1 e A2). As massas foram congeladas em freezer por até 60 dias. Foram avaliados as curvas de congelamento por 24 horas e a viabilidade celular em UFC/g. Na curva de congelamento da massa padrão foi possível observar o ponto de cristalização da água e dos solutos, esta cristalização total promoveu maior redução da viabilidade celular, onde, após 60 dias, foi de  $15 \times 10^5$  UFC/g. Quando houve a incorporação dos ingredientes funcionais o ponto de congelamento foi reduzido para temperaturas inferiores a  $-10$  °C, não foi possível observar o ponto de cristalização dos solutos e isto refletiu na maior viabilidade celular, onde todas foram superiores a  $55 \times 10^5$  UFC/g.

### **1.0 INTRODUÇÃO**

O congelamento e o armazenamento congelado de massas para a produção de pães, bem como o uso do congelamento em diversas etapas da produção dos pães prejudica a qualidade dos produtos, conforme expostos por Meziani *et al.* (2012) e Ribotta *et al.* (2008). Shi *et al.* (2013) afirmam que o congelamento deteriora a qualidade panificável da massa de pão congelada, a viabilidade da levedura neste processo é um dos aspectos importantes, explicam que as células de levedura estão expostas à muitos estresses associados ao processo de panificação, como o congelamento e descongelamento, o ar de secagem e elevadas concentrações de soluto como sais e açúcar. As etapas que envolvem o uso de baixas temperaturas podem ocasionar graves danos para as células de levedura e diminuir a capacidade fermentativa das massas.

O uso de ingredientes funcionais em pães tipo forma, pode, além de melhorar o valor nutricional dos produtos, fornecer benefícios tecnológicos, promovendo a redução dos danos causados à estrutura do glúten e as leveduras ocasionados pelo congelamento das massas.

O presente estudo teve como objetivo estudar a obtenção de pães tipo forma com ingredientes funcionais através da tecnologia de massas congeladas, estudando o comportamento das curvas de congelamento das massas e avaliar o efeito da estocagem congelada por até 60 dias nas células viáveis de levedura.

## 2.0 METODOLOGIA

### 2.1 Delineamento Experimental

Foram desenvolvidas formulações de pães tipo forma incorporadas com diferentes quantidades de polidextrose, açai e brócolis em pó, conforme apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Formulações de pães tipo forma utilizadas no estudo da obtenção através de massas congeladas

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>Padrão</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>
<b>Farinha de Trigo</b>	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Água*</b>	58-62%	58-62%	58-62%	58-62%	58-62%
<b>Gordura Vegetal Hidrogenada</b>	10%	10%	10%	10%	10%
<b>Açúcar Refinado</b>	5%	5%	5%	5%	5%
<b>Fermento Biológico</b>	3,3%	3,3%	3,3%	3,3%	3,3%
<b>Polidextrose</b>	-	5%	10%	5%	10%
<b>Brócolis em pó</b>	-	5%	10%	-	-
<b>Açai em pó</b>	-	-	-	5%	10%

\* Com base no percentual de absorção de água de cada farinha.

### 2.2 Processamento dos Pães Tipo Forma

Os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica separadamente. Aplicou-se o método direto, onde todos os ingredientes são colocados simultaneamente no início da etapa de mistura, com exceção do sal e água. Eles foram misturados em misturadora de escala semi-industrial durante 1 minuto em baixa velocidade para a homogeneização dos ingredientes, em seguida foi adicionada a água e misturada por 3 minutos em velocidade média, por último foi adicionado o sal e a massa foi misturada em alta velocidade por 6 minutos até o seu completo desenvolvimento. As massas foram divididas em porções de 250 g e moldadas na forma de elipses manualmente. Após a moldagem manual na forma de elipses, as massas foram inseridas em sacos de polietileno de forma individual e acomodadas em Freezer Horizontal Esmaltec® para serem congeladas e permanecerem estocadas até a sua utilização. A temperatura de armazenamento foi de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 60 dias. As massas congeladas, quando completados os tempos para realização das análises, foram removidos do freezer e desembaladas. Foram colocadas sobre bandejas de alumínio e o descongelamento ocorreu em estufa de circulação forçada de ar a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante duas horas. A fermentação ocorreu a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 60% de umidade relativa durante duas horas. Após este processo, os pães foram forneados sem vapor a  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos e resfriados à temperatura ambiente.

### 2.3 Avaliação Física das Massas e dos Pães Tipo Forma

Determinação das curvas de congelamento: Foram obtidas curvas de temperatura durante o congelamento e armazenamento congelado das massas durante 24 horas através de termopares “Tipo T” inseridos no centro geométrico e nas extremidades da massa de pão. O sistema de monitoramento e armazenamento de dados utilizado foi o Data Logger® da empresa NOVUS.

Determinação de células viáveis de levedura: A determinação de células viáveis de levedura foi executada de acordo com metodologia mencionada por Downes e Ito (2001). Utilizou-se massas de aproximadamente 25 gramas que foram homogêneas em erlenmeyers contendo 225 mL de água peptonada 0,1%, realizando-se diluições até  $10^{-6}$ . As diluições foram inoculadas através de espalhamento em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud (2% glicose, 2% ágar, 1% peptona, 0,05% cloranfenicol), as placas foram incubadas em estufas à 30°C pelo período de 03 dias. Após este período foi realizada a contagem das placas e o valor calculado com base no peso da amostra de massa, sendo os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de massa (UFC/g).

## 2.4 Análise Estatística

A avaliação dos resultados dos resultados das células viáveis de levedura foi realizado o teste de médias ao nível de 5% de significância. A análise foi realizada através do programa STATISTICA 7.0.

## 3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta a curva de congelamento da massa padrão, sem a incorporação dos ingredientes funcionais.

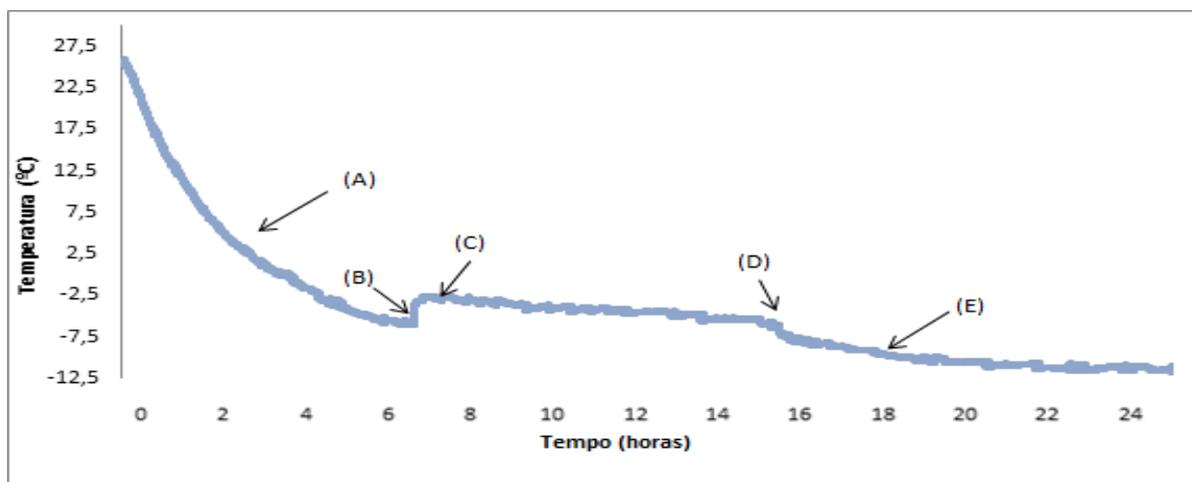


Figura 1 – Curva de congelamento da massa padrão

As massas para a produção de pães padrão entraram no freezer com temperatura média de  $25,8 \pm 0,65$  °C e tiveram a sua temperatura reduzida, pela retirada do calor sensível (de A até B), que é momento início da formação da formação dos cristais de gelo, fenômeno conhecido como nucleação (B). Para as massas padrão, a nucleação ocorreu em  $-6,0 \pm 0,54$  °C, com a característica de subresfriamento da água. De modo instantâneo houve a liberação do calor latente de fusão (B-C), a taxa de liberação deste calor foi maior que a de resfriamento, elevando a temperatura da massa até valores próximos de  $-2,8 \pm 0,88$  °C. De acordo com Hindmarsh *et al.* (2004) nesta etapa ocorre a recalcência, havendo um rápido aumento na formação de cristais de gelo impulsionados pelo subresfriamento, sendo observado entre os pontos C e D, devido ao alto teor de água das massas (aproximadamente 46%), esta etapa teve longa duração. No ponto E ocorreu a etapa de resfriamento ou têmpera, quando a temperatura

do centro das massas foi reduzida até  $-11,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , quando cessou a captação dos dados de temperatura após 24 horas.

A figura 2 apresenta a curva de congelamento das massas para a produção de pães Brócolis 1 (vermelho) e Brócolis 2 (azul).

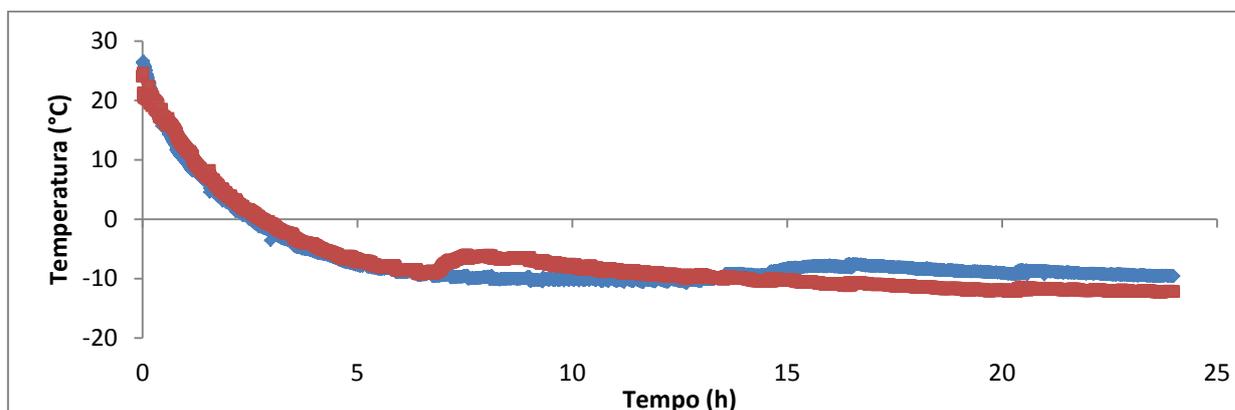


Figura 2 – Curvas de congelamento de massas Brócolis (vermelho) 1 e 2 (azul)

A temperatura inicial das massas foi de  $24,06\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,33$  para a massa Brócolis 1 e  $26,35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,21$  para a Brócolis 2. O início da formação dos cristais de gelo ocorreu após 6 horas, a uma temperatura média de  $-6,51\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,27$ , enquanto que para a Brócolis 2 este fenômeno ocorreu somente após 13 horas, devido à incorporação de maiores quantidades de povidona e brócolis em pó, o ponto de congelamento desta massa foi reduzido para temperaturas inferiores a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o que mostra que quanto maior o teor de sólidos presentes no alimento, mais baixo será seu ponto de congelamento incipiente.

Massas produzidas com farinha de trigo e submetidas ao congelamento são constituídas de uma fase de gelo, bem como uma fase descongelada com ponto de congelamento baixo, este baixo ponto é atribuído a concentração de solutos na fase descongelada quando a água é imobilizada pela formação dos cristais de gelo, é nesta fase, que, segundo Ribotta e Le Bail (2007), onde ocorrem as deteriorações, mesmo em baixa temperatura. O fluxo de calor da frente de congelamento diminui conforme a frente penetra no produto. Este fato se deve ao aumento da resistência térmica da parte congelada localizada entre a superfície refrigerada e a frente de congelamento.

No caso de geometrias cilíndricas e elipses, a resistência térmica aumenta enquanto as camadas de gelo são formadas, o volume a ser congelado é cada vez menor conforme a frente de congelamento aumenta quando se afasta da superfície (Chevalier *et al.*, 2000), o que explica o rápido decréscimo da temperatura das massas nas primeiras horas de congelamento e a retomada de forma lenta da redução da temperatura após a liberação do calor latente de solidificação.

A figura 4 apresenta os valores de temperatura em função do tempo de congelamento das massas para a produção de pães Açai 1 (vermelho) e Açai 2 (azul).

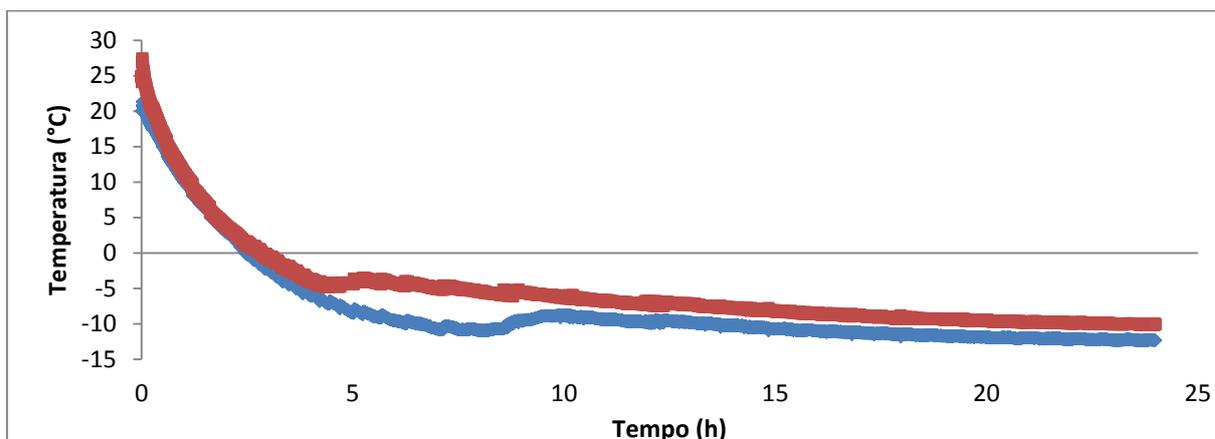


Figura 3 – Curvas de congelamento de massas Açaí 1 (vermelho) e 2 (azul).

A temperatura inicial das massas foi de  $26,59\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,13$  (Açaí 1) e  $20,04\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,17$  (Açaí 2). Para a massa açaí 1, o início da nucleação ocorreu após 4 horas, onde a retirada do calor sensível (A), o início da formação dos cristais de gelo (B) ocorreu a temperatura de  $-4,23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,23$ , houve o aumento da temperatura para valores de  $-3,39\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,15$ . Após 24 horas de coleta dos dados, a temperatura final da massa foi de  $-11,26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,17$ . Pelo aumento no conteúdo de sólidos incorporados na massa Açaí 2, o início da formação dos cristais de gelo ocorreu apenas após sete horas (B), havendo diminuição do ponto de congelamento da massa, quando comparado com a Açaí 1, esta diferença fica evidente ao ser observada na figura 3. O início da nucleação ocorreu à temperatura média de  $-10,75\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,37$  (B), seguido de elevação da temperatura pela liberação do calor latente de solidificação para temperatura de  $-8,83\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,22$ . A temperatura final das massas foi de  $-12,44\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,25$ . Pela quantidade de soluto incorporada nas formulações e devido à capacidade de redução da temperatura do equipamento utilizado, não foi possível observar a nucleação dos solutos presentes, onde pode-se afirmar que a formação dos cristais de gelo não foi total.

A tabela 2 fornece o número de células de levedura das massas congeladas por até 60 dias e os resultados a cerca do teste de tukey.

Tabela 2 – Número remanescente de células viáveis de levedura nas massas.

Formulação	0 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<b>Padrão</b>	$133^{\text{Ac}}\pm 5,50$	$53^{\text{Bc}}\pm 8,50$	$35^{\text{Ca}}\pm 2,51$	$24^{\text{CDa}}\pm 4,04$	$15^{\text{Da}}\pm 2,08$
<b>B1</b>	$136^{\text{Ac}}\pm 4,16$	$115^{\text{Bde}}\pm 1,73$	$80^{\text{Cd}}\pm 3,78$	$69^{\text{CDde}}\pm 3,32$	$55^{\text{Dc}}\pm 2,02$
<b>B2</b>	$132^{\text{Ac}}\pm 4,16$	$117^{\text{Bde}}\pm 2,00$	$89^{\text{Cd}}\pm 4,04$	$70^{\text{Dde}}\pm 4,35$	$66^{\text{Dd}}\pm 3,21$
<b>A1</b>	$141^{\text{Ab}}\pm 2,00$	$121^{\text{Bd}}\pm 3,05$	$92^{\text{Ccd}}\pm 3,21$	$77^{\text{Dd}}\pm 3,51$	$68^{\text{Ed}}\pm 1,52$
<b>A2</b>	$139^{\text{Ab}}\pm 1,52$	$127^{\text{Ba}}\pm 3,05$	$101^{\text{Cc}}\pm 2,08$	$87^{\text{Dc}}\pm 3,21$	$71^{\text{Ed}}\pm 5,29$

\*Valores médios obtidos a partir da diluição de  $10^{-4}$  e três repetições; \*\*Resultados expressos em  $10^5$  UFC/g de massa. <sup>l</sup>Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de significância.

A maior contagem de células viáveis de levedura em massas não-congeladas (tempo zero) foi apresentada pela formulação A2, com  $139\times 10^5$  células. As formulações adicionadas de brócolis (B1 e B2), T1 e Padrão não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, o mesmo ocorreu entre as formulações A1 e A2. Ao 15º dia de armazenamento congelado, a formulação que apresentou a maior redução na viabilidade das leveduras foi a padrão. A

menor redução ocorreu na formulação A2. Não houve diferenças estatísticas entre T2, B1 e B2, as demais amostras diferiram entre si.

Decorridos 30 dias de armazenamento congelado das massas, a formulação B1 obteve a maior redução na viabilidade celular, seguido da formulação A1. As formulações T2 e A2 não diferiram entre si ao nível de significância de 5%, bem como as formulações adicionadas de brócolis (B1 e B2). Para 45 dias de armazenamento congelado, a formulação B2 apresentou a maior redução de viabilidade celular de leveduras neste período, seguido da T1 e T2. Houve diferenças significativas entre todas as formulações, com exceção entre B1 e B2. Após 60 dias, o menor valor de células viáveis de levedura foi apresentado pela formulação padrão ( $15 \times 10^5$  células), a maior redução foi observada em A2. Apenas as formulações B2, A1 e A2 não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância.

De acordo com Massaguer (2006), após o congelamento, durante a estocagem congelada, a destruição continua, a taxa de morte durante o período de armazenamento pode ser maior no início e geralmente decresce com o tempo, o que se aplicou às formulações de pães desenvolvidas neste estudo, onde as maiores reduções de células viáveis foram entre os trinta primeiros dias de armazenamento congelado.

A tabela 3 apresenta o percentual de células viáveis ao longo do tempo de armazenamento congelado.

Tabela 3 – Percentual de células viáveis de levedura nas massas

Dias de armazenamento congelado	Padrão	B1	B2	A1	A2
0	100%	100%	100%	100%	100%
15	39,84%	84,55%	88,63%	85,81%	91,36%
30	26,31%	58,82%	67,42%	65,24%	72,66%
45	18,04%	50,73%	53,03%	54,60%	62,58%
60	11,27%	40,44%	50,00%	48,22%	51,07%

Padrão: formulação sem a adição dos ingredientes funcionais; Açaí 1 (A1): 5% de açaí em pó e polidextrose; Açaí 2 (A2): 10% de açaí em pó e polidextrose; Brócolis 1 (B1): 5% de brócolis e polidextrose; Brócolis 2 (B2): 10% de brócolis em pó e polidextrose; Tomate 1 (T1): 5% de tomate em pó e polidextrose; Tomate 2 (T2): 10% de tomate em pó e polidextrose.

Comercialmente, pode ser observado que, com uma redução de 50% das células de levedura viáveis, os pães não apresentam o mesmo desempenho na fermentação (Kechinski *et al.*, 2010).

Até o 15º dia de armazenamento congelado a formulação padrão apresentou redução de 60% da viabilidade das células de levedura; 13,53% entre o 15º e o 30º dia; 8,27% entre o 30º e 45º e apenas 6,77% até o 60º dia. Comportamento semelhante foi obtido pela formulação T1, onde o maior percentual de morte de células de levedura concentrou-se até o 15º dia. Para a formulação T2 as maiores perdas de células viáveis ocorreram entre o 15º e 30º dia de armazenamento congelado, bem como entre os dias 45 e 60. Com relação as formulações adicionadas de polidextrose e brócolis em pó, para B1, a maior redução entre os trinta primeiros dias, com 15,45% e 25,75%, respectivamente, B2 obteve o mesmo comportamento, entretanto, com menores reduções, de 11,37% para os primeiros quinze dias

e de 21,21% entre o 15° e 30° dia. A adição de 10% de povidexose e brócolis em pó promoveu menores reduções de viabilidade celular ao longo de 60 dias de armazenamento congelado, preservando 50% do valor inicial das células de levedura, contra 11,27% da formulação padrão, demonstrando efeito crioprotetor.

Comportamento semelhante foi observado para as formulações adicionadas de povidexose e açaí em pó, onde as maiores reduções de viabilidade celular foram observadas entre os trinta primeiros dias, para A1 e para a A2, entre o 30° e 45° dia, ao final do período estudado as formulações preservaram valores superiores a 48% das células viáveis, também demonstrando que o açaí possui efeito crioprotetor.

A formação de gelo dentro das células das leveduras é o fator principal responsável pela morte celular, quanto menor a formação destes cristais intracelulares, maior é a viabilidade das leveduras, conforme relatam Zhang *et al.* (2007). O conteúdo intracelular das leveduras, quando exudados, promove colapsos nas proteínas do glúten, sendo um fator de enfraquecimento além do congelamento.

Jia *et al.* (2012), verificaram que a intensidade da solubilidade das proteínas do glúten foi maior quando houve menor redução da viabilidade celular das leveduras. Mezziani *et al.* (2012) afirmam que a taxa de congelamento lento, a qual foi empregada neste estudo, tem influência direta sobre a manutenção de equilíbrio osmótico na membrana da célula de levedura durante o congelamento, a cinética de transferência de água do meio intracelular para o extracelular foi favorecido por osmose.

O conteúdo celular externo se transforma em hipertônico devido a desidratação e a formação dos cristais de gelo, fazendo com que a célula perca água e tenha influência sobre a sobrevivência celular (Chua e Chou, 2009). O lançamento de líquido intracelular provocado pelas condições externas adversas às células do fermento promovem a desidratação e plasmólise.

Pode-se afirmar que a adição dos ingredientes funcionais promoveram um equilíbrio osmótico entre o meio e as células de levedura, agindo como crioprotetores, minimizando os danos ao longo do tempo de armazenamento congelado. Estes resultados são de grande importância visando à manutenção da qualidade das massas e conseqüentemente dos pães após 60 dias de armazenamento congelado, tendo em vista que as leveduras e seu respectivo processo de fermentação são responsáveis pelo desenvolvimento da expansão da massa, volume dos pães, porosidade do miolo e de alguns componentes de sabor e aroma dos pães.

### 3.0 CONCLUSÃO

A incorporação dos ingredientes funcionais em formulações de pães tipo forma reduziu o ponto de congelamento das massas quando comparados à formulação padrão, onde o congelamento foi mais lento e em temperaturas mais baixas, devido a isto, houve alterações na viabilidade celular das leveduras, após 60 dias, foi possível a manutenção de 51,07% das células na formulação A2 e 50,00% em B2, superiores à padrão, que obteve apenas 11,27%.

#### 4.0 REREFÊNCIAS

DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

CHEVALIER, D.; LE BAIL, A.; GHOUL, M. Freezing and ice crystals formed in a cylindrical food model: part I. Freezing at atmospheric pressure. *J. Food Eng.*, v. 46, n. 4, p. 277-285, 2000.

CHUA, K. J.; CHOU, S. K. On the study of the freeze-thaw thermal process of a biological system. *Appl. Therm. Eng.*, v. 29, n. 17, p. 3696-3709, 2009.

HINDMARSH, J. P.; RUSSELL, A. B.; CHEN, X. D. Experimental and numerical analysis of the temperature transition of a freezing food solution droplet *Chem. Eng. Sci.*, v. 59, n. 12, p. 2503-2515, 2004.

JIA, C.; HUANG, W.; WU, C.; LV, X.; RAYAS-DUARTE, P.; ZHANG, L. Characterization and yeast cryoprotective performance for thermostable ice-structuring proteins from Chinese Privet (*Ligustrum vulgare*) leaves. *Food Res. Int.*, v. 49, n. 1, p. 280-284, 2012.

KECHINSKI, C. P.; CASTRO, M. G.; FLECK, R. J.; NOREÑA, C. Z. Viabilidade de células de levedura em massas congeladas de pão francês. *Ciência Rural*, v. 40, n. 5, p. 1193-1198, 2010.

MASSAGUER, P.R. *Microbiologia dos Processos Alimentares*. São Paulo: Varela, 2006, 258p.

MEZIANI, S.; JASNIEWSKI, J.; RIBOTTA, P. D.; ARAB-TEHRANY, E.; GHOUL, J. M. M.; DESOBRY, S. Influence of yeast and frozen storage on rheological, structural and microbial quality of frozen sweet dough. *J. Food Eng.*, v.109, p. 538-544, 2012.

RIBOTTA, P. D.; LE BAIL, A. Effect of additives on the thermo-mechanical behavior of dough systems at sub-freezing temperatures. *Eur. Food. Res. Technol.*, v. 224, n. 1, p. 519-524, 2007.

RIBOTTA, P. D.; PÉREZ, G. T.; AÑÓN, M. C.; LEÓN, A. E. Optimization of additive combination for improved soy-wheat bread quality. *Food Biop. Technol.* v. 3, n. 2, p. 395-405, 2008.

SHI, K.; YU, H.; JIN, J.; LEE, T. Improvement to baking quality of frozen bread dough by novel zein-based ice nucleations film. *J. Cereal Sci.*, v. 57, n. 3, p. 430-436, 2013.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. *Food Res. Int.*, v. 40, n. 6, p. 763-769, 2007.