

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. ZAMBELLI¹, S. C. P. de MELO¹, E. C. SANTOS-JUNIOR¹, L. I. F. PINTO¹, P. E. F. MELO¹ e D. F. PONTES¹.

¹ 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 povidona/brócolis em pó (B1 e B2); 5 e 10% povidona/açaí 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 15×10^5 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 55×10^5 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, açaí 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

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

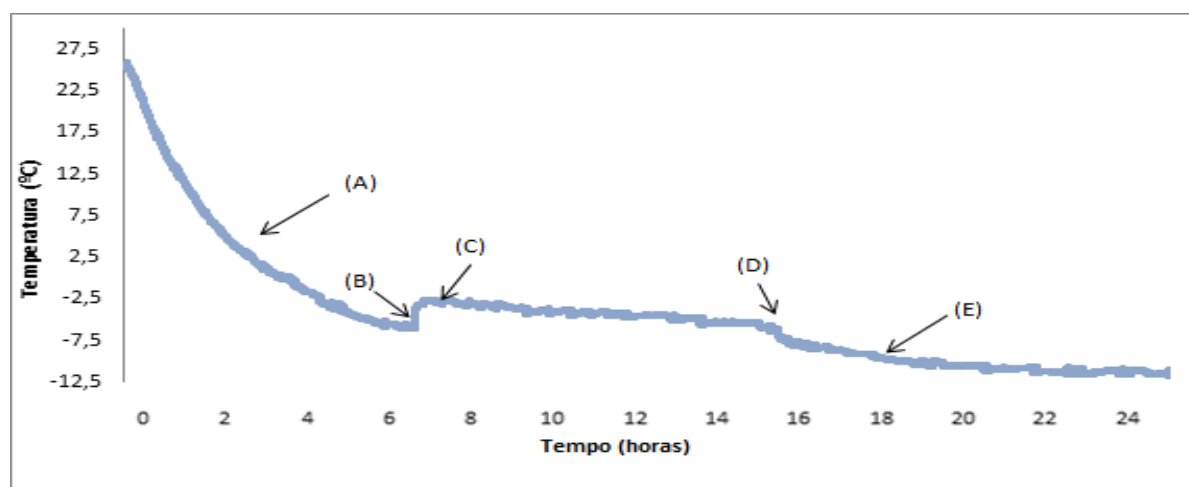


Figura 1 – Curva de congelamento da massa padrão

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 recalescência, 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).

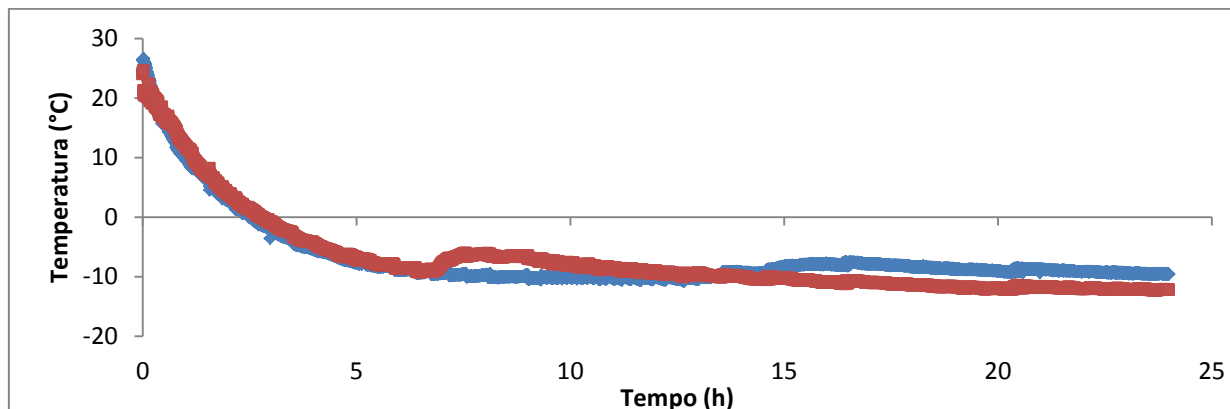


Figura 2 – Curvas de congelamento de massas Brócolis (vermelho) 1 e 2 (azul)

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 critais 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 povidexose 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 critais 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 Açaí 1 (vermelho) e Açaí 2 (azul).

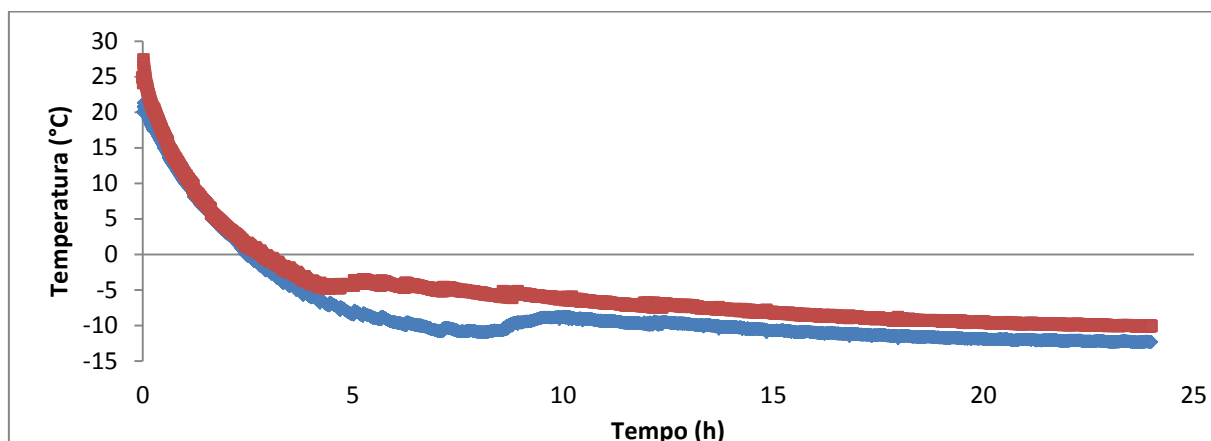


Figura 3 – Curvas de congelamento de massas Açaí 1 (vermelho) e 2 (azul).

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

*Valores médios obtidos a partir da diluição de 10^{-4} e três repetições; **Resultados expressos em 10^5 UFC/g de massa. 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 139×10^5 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 (15×10^5 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. Meziani *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 consequentemente 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.