



ValorNatural – Valorização de Recursos Naturais através da Extração de Ingredientes de Elevado Valor Acrescentado para Aplicações na Indústria Alimentar.

Entregável nº 4.2.1

Versão do Documento: 1

Data de Submissão: 31/05/2021

Responsável: UP (FEUP-LSRE)

Nome do Documento: Relatório com os perfis aromáticos dos produtos de panificação incorporados com os ingredientes naturais

Histórico de Revisão

Revisão	Data	Parceiros Envolvidos	Descrição

Lista de Autores

Madalena Dias

Isabel Martins

Vanessa Vieira

Júlia Cristiê Kessler

Resumo

O presente entregável destina-se à apresentação de resultados provenientes da análise de produtos de panificação incorporados com os aromas naturais obtidos por extração com CO₂ supercrítico que revelaram maior potencial de aplicação na atividade 4.1 - Extração de aromas naturais nacionais com propriedades organoléticas de interesse para a indústria de panificação.

Deste modo, avaliou-se o impacto da adição de extratos de amêndoa e alecrim desidratado em amostras de pão. Nesse sentido, os produtos incorporados foram avaliados quer do ponto de vista sensorial (Análise Discriminativa: Teste de Comparação Múltipla), quer pelo perfil químico dos odores presentes nas amostras de crosta e miolo recorrendo a técnicas de cromatografia de gases (GC).

Índice

1	Identificação	5
2	Informação	6

1 Identificação

<i>Deliverable</i>	E 4.2.1. Relatório com os perfis aromáticos dos produtos de panificação incorporados com os ingredientes naturais
Tipo de <i>deliverable</i>	Relatório
Nível de disseminação	Confidencial
PPS	4. Aromas e modelos de aromas

2 Informação

Os extratos de aroma de amêndoa (*Prunus dulcis*; AM) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*; AD) desidratado foram considerados os mais promissores na atividade 4.1 - Extração de aromas naturais nacionais com propriedades organoléticas de interesse para a indústria de panificação. Deste modo, a gama de concentrações a aplicar foi delimitada pelos resultados obtidos nas análises de *Odor Threshold* (ODT) e inibição da proliferação de células *Vero* (GI₅₀), tal como exposto na tabela 3 do Entregável 4.1.4.

Os valores tabelados de ODT de cada extrato foram determinados em água. No entanto, e de forma expectável, para que sejam perceptíveis quando incorporados em matrizes alimentares mais complexas (como o caso do pão) quantidades superiores podem ser necessárias. Consequentemente, o valor máximo a incorporar foi definido através de ensaios de viabilidade celular, ou seja, valores de GI₅₀ determinados em células *Vero*.

Apesar das mais-valias associadas ao uso do CO₂ supercrítico na extração de aromas, os rendimentos de extração são ainda inferiores aos desejáveis para um estudo alargado do seu potencial como ingrediente aromático alimentar com origem em fontes naturais. Consequentemente, optou-se por fazer um estudo preliminar de incorporação recorrendo a um óleo essencial de alecrim (CAS: 8000-25-7) de grau alimentar. Assim, e de forma objetiva, pretendeu-se otimizar diferentes aspetos essenciais à execução das tarefas afetas à Atividade 4.2, nomeadamente (i) o efeito dose/resposta do ponto de vista sensorial e (ii) metodologias de amostragem e caracterização química de amostras. Os resultados obtidos e respetivas conclusões encontram-se detalhados no Relatório de Execução do 5º semestre. Contudo, um resumo dos resultados da avaliação sensorial podem ser revistos no presente documento na **Tabela 1**.

Tabela 1. Notas médias e diferenças significativas de avaliação sensorial de odor de pão controlo e pão incorporado com extratos (g ext) de alecrim desidratado (AD) e amêndoa (AM), obtidos em SFE.

Concentração (g/L)		Q1		Q2		Q3		Q4	
AD	AM	AD	AM	AD	AM	AD	AM	AD	AM
Controlo (0)		3,11a	3,32a	3,00a	3,16a	3,16a	3,42a	3,16a	2,89a
2×10^{-3}	1.4×10^{-2}	2,84a	3,05a	2,84a	2,79a	3,00a	3,11a	3,16a	2,95a
6×10^{-3}	3×10^{-2}	2,53a	2,58b	2,84a	2,63a	2,63a	2,74b	2,58a	2,68a
1.4×10^{-2}	6.2×10^{-2}	2,84a	2,79a	3,05a	3,21a	2,95a	3,16a	3,00a	2,95a

Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa da amostra controlo com $\alpha=0,1$.

Escala: 1- muito mais intenso; 2- ligeiramente mais intenso; 3- igual ao controlo; 4- menos intenso; 5- muito menos intenso.

Q1: Relativamente ao odor a pão na crosta; Q2: Relativamente ao odor a pão no miolo; Q3: Relativamente ao odor distinto na crosta e Q4: Relativamente ao odor distinto no miolo.

Com este estudo preliminar, foi possível delinear os ensaios utilizando os extratos naturais de forma a rentabilizar todo o produto extraído. Neste sentido, a perceção olfativa de amostras de pão incorporado com extratos naturais de amêndoa e alecrim desidratado foi avaliada segundo uma análise discriminativa aplicando um teste de comparação múltipla (TCM) [1], seguindo as boas práticas de análise sensorial estabelecidas pela ISO 8586:2012 [2]. Para isso, um painel de avaliadores de 19 elementos foi convidado a comparar amostras aleatórias com uma amostra conhecida (pão “simples”) segundo uma escala (**Anexo I**). Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na adição de extrato de amêndoa no odor da crosta do pão à concentração de $1,4 \times 10^{-2}$ g/L de pão e, em média, à mesma concentração, o aroma de miolo apresentou a nota mais baixa. Por sua vez, na incorporação com extrato de alecrim, em média, os avaliadores identificaram alterações no odor das amostras à concentração de 3×10^{-2} g/L de pão, o que significa que, apesar de não evidenciado estatisticamente, a esta concentração de extrato, foram encontradas as maiores diferenças nas propriedades organolépticas do pão (crosta e miolo). Desta forma, os aromas de amostras de pão incorporados às concentrações supracitadas foram analisados por GC-MS. Para isso, recorreu-se à amostragem do *headspace* (HS) de amostras de crosta ou miolo expostos em *vials* com recurso a fibras de SPME (*solid-phase microextraction*). Além disso, e de forma a mimetizar o tempo que o pão poderá estar exposto numa prateleira, estes aromas foram analisados em dois tempos distintos: $t = 0$, logo após o arrefecimento (t_0); e $t = 4$, 4 horas após o cozimento (t_4). As condições otimizadas para o efeito encontram-se apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Condições de amostragem e análise dos voláteis presentes na crosta e miolo de pão.

Taxa ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de espera (min)
-	40	6
8,5	75	2
10	150	2
15	270	3

Tempo = 32,62 min
 Temperatura da coluna = 40 $^{\circ}\text{C}$
 Temperatura de injeção = 270 $^{\circ}\text{C}$
 Volume de injeção = 1 μL

Pressão de injeção: 200 kPa; 0,5 min
 Temperatura de ionização = 230 $^{\circ}\text{C}$
 Temperatura de interface = 270 $^{\circ}\text{C}$
Split ratio = 2

Notas:

Separação de crostas e miolo seguido de congelamento das amostras (t0 e t4) em azoto líquido para trituração durante 10 segundos.

Massa: 1 g

Temperatura de incubação: 50 $^{\circ}\text{C}$

Tempo de incubação: 5 min

Tempo de exposição da fibra: 30 min

Os aromas de pão “simples” e incorporados com extratos naturais foram caracterizados de acordo com o perfil em voláteis presentes em amostras de crosta e miolo. A abundância relativa de cada molécula detetada encontra-se sumarizada na **Tabela 3**. De um modo geral, é possível verificar que amostras de crosta apresentam uma maior complexidade ao nível da sua composição em voláteis comparativamente às amostras de miolo (maior número de moléculas).

Tabela 3. Identificação de voláteis em amostras de pão (crosta e miolo) simples e incorporado com extratos de alecrim (AD) e amêndoa (AM) ao longo do tempo (t0 e t4).

ID	Compound	Peak base	Tr (min)	Bread crusts						Bread crumbs					
				Without extract		With AD		With AM		Without extract		With AD		With AM	
				t0 (%)	t4 (%)	t0 (%)	t4 (%)	t0 (%)	t4 (%)	t0 (%)	t4 (%)	t0 (%)	t4 (%)	t0 (%)	t4 (%)
1	Isopentyl alcohol	55, 42, 70	2.672	14.14	15.72	8.52	13.02	13.66	10.89	51.83	50.59	23.38	29.39	27.46	26.45
2	1-Pentanol	42, 55, 70	3.303	0.49	0.41	0.35	0.67	0.49	0.29	1.41	1.70	2.19	1.87	1.46	1.61
3	Hexanal	44, 56, 41	3.959	13.51	13.30	11.49	16.08	13.65	11.50	18.67	19.68	24.12	22.46	22.98	21.73
4	Dihydro-2-methyl-3-furanone	43, 28, 72	4.183	-	-	0.23	0.13	0.19	0.21	-	-	-	-	-	-
5	2- Methylpyrazine	94, 67, 40	4.707	5.68	6.42	8.77	5.93	6.35	6.04	-	-	-	-	-	-
6	Furfural	96, 39, 29	5.016	25.56	25.33	28.57	25.15	19.86	21.39	2.51	-	2.58	-	0.91	-
7	2-Furanmethanol	98, 41, 81	6.212	5.50	5.81	10.82	6.28	6.62	8.88	-	-	-	-	-	-
8	1-Hexanol	56, 43, 70	6.742	6.19	7.78	4.53	7.23	6.37	5.22	18.44	19.66	25.29	23.34	24.90	23.33
9	Styrene	104, 78, 51	7.287	1.64	2.75	4.84	3.67	6.76	5.62	-	-	1.08	2.84	2.28	5.05
10	2-Heptanone	43, 58, 71	7.391	-	-	-	-	0.21	0.32	-	-	-	-	-	-
11	Unknown	81, 53, 39	7.735	-	-	-	-	-	0.62	-	-	-	-	-	-
12	Heptanal	44, 70, 55	7.814	3.65	3.95	2.93	3.88	3.61	2.87	3.42	3.92	4.82	4.28	5.03	4.98
13	Methional	48, 104, 76	7.994	0.55	0.51	0.32	0.49	0.85	0.74	-	-	-	-	-	-
14	2-Acetylfuran	95, 110, 39	8.077	1.16	1.22	1.81	1.35	1.46	1.80	-	-	-	-	-	-
15	2,5-Dimethylpyrazine	108, 42, 39	8.175	3.88	1.10	1.30	0.77	1.20	1.47	-	-	-	-	-	-
16	2-Ethylpyrazine	107, 80, 53	8.233	3.88	1.92	0.40	0.42	0.36	0.45	-	-	-	-	-	-
17	2,3-Dimethylpyrazine	67, 108, 40	8.344	-	-	-	-	-	0.30	-	-	-	-	-	-
18	α -Pinene	93, 91, 77	8.726	-	-	0.84	0.65	-	-	-	-	1.79	2.68	-	-
19	Camphene	98, 121, 79	9.193	-	-	0.10	tr	-	tr	-	-	0.26	0.29	-	-
20	Benzaldehyde	77, 105, 51	9.654	-	-	-	-	0.49	0.67	-	-	-	-	-	-
21	Unknown	67, 95, 43	9.684	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.43	0.76
22	5-Methylfurfural	110, 53, 27	9.760	0.99	1.08	0.78	1.84	0.79	2.61	-	-	-	-	-	-

23	Sabinene	93, 77, 41	9.931	-	-	-	-	-	-	-	-	0.13	0.21	-	-
24	1-Heptanol	70, 56, 43	10.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.99	0.98
25	β-Pinene	93, 41, 69	10.015	-	-	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	tr	-
26	1-octen-3-ol	57, 43, 72	10.326	0.69	0.80	0.73	0.82	0.96	0.93	0.88	1.04	1.01	0.80	1.19	1.53
27	2-Pentylfuran	81, 138, 53	10.491	3.87	4.06	3.07	3.75	4.04	3.34	-	-	2.62	2.58	3.32	3.65
28	2-Ethyl-5-methylpyrazine	121, 39, 56	10.748	0.39	0.42	0.60	0.47	0.43	0.76	-	-	-	-	-	-
29	2-Ethyl-3-methylpyrazine	121, 67, 39	10.853	-	-	-	-	0.20	0.28	-	-	-	-	-	-
30	p-Cymol	119, 134, 91	11.535	-	-	0.33	0.18	-	-	0.44	0.47	0.35	0.55	-	-
31	D-Limonene	68, 93, 136	11.731	-	-	0.85	0.75	1.19	0.95	-	-	1.20	1.18	2.42	2.32
32	Unknown	67, 95, 43	11.751	1.87	1.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Eucalyptol	93, 68, 43	11.770	-	-	2.60	1.82	0.70	0.56	1.24	1.49	3.57	3.03	1.03	1.05
34	Benzene acetaldehyde	91, 120, 65	12.238	3.85	3.36	2.77	2.34	5.07	4.94	-	-	-	-	-	-
35	γ-Terpinene	93, 77, 136	12.743	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	(E)-2-Octenal	41, 55, 70	12.842	-	-	-	-	0.20	0.15	-	-	-	-	0.35	0.38
37	β-Linalool	71, 93, 55	14.010	-	-	-	-	-	-	-	-	0.18	0.14	0.23	0.24
38	Nonanal	57, 41, 98	14.154	1.01	1.11	1.10	0.86	1.53	1.63	0.87	0.94	1.23	0.61	1.10	1.87
39	Camphor	95, 81, 41	15.063	-	-	-	-	tr	tr	-	-	2.55	2.85	-	-
40	2-Nonenal	43, 55, 70	15.451	0.77	0.91	0.81	0.77	1.37	2.19	0.29	0.49	0.34	0.50	0.82	1.49
41	3-Methylundecane	57, 43, 71	15.641	-	-	-	-	0.07	0.37	-	-	-	-	1.27	0.37
42	Dodecane	57, 43, 71	16.249	-	-	-	-	0.42	0.65	-	-	-	-	0.59	0.52
43	Decanal	41, 55, 70	16.367	-	-	-	-	0.20	0.59	-	-	-	-	-	0.42
44	Bornyl acetate	95, 43, 121	17.703	-	-	0.22	0.19	-	-	-	-	1.30	0.40	-	-
45	Tetradecane	57, 43, 71	17.985	0.74	0.83	0.32	0.51	0.71	0.69	-	-	-	-	0.56	0.53
46	Pentadecane	57, 43, 71	19.469	-	-	-	-	0.62	0.93	-	-	-	-	0.68	0.74
Total não identificado				1.87	1.21	0	0	0	0.62	0	0	0	0	0.43	0.76
Total identificado				98.13	98.79	100	100	100	99.38	100	100	100	100	99.57	99.24
TOTAL				100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Torna-se desafiante discutir o conjunto de resultados relativos à composição em voláteis das amostras analisadas. Mesmo assim, algumas conclusões/factos podem ser extraídas pela análise da **Tabela 3**. No que concerne às moléculas tipicamente presentes em amostras de pão [3], o furfural (6) tende a desaparecer com o tempo, mesmo quando incorporado extrato. Por sua vez, a dihidro-2-metil-3-furanona (4) apenas surge em amostras de crosta de pão com extrato incorporado, o mesmo para estireno (9) e 2-pentilfurano (27) em amostras de miolo. Adicionalmente, também se verificou a presença de 1-heptanol (24), 2-octenal (36), 3-metilundecano (41), dodecano (42), decanal (43), tetradecano (44) e pentadecano (45) apenas em amostras de pão incorporado com AM. De facto, a identificação de moléculas adicionais no produto final, nomeadamente da classe dos furanos (4 e 27) e aldeídos (6, 36 e 43) corroboram o potencial que poderá representar a incorporação dos extratos de aroma (amêndoa e alecrim) em produtos de panificação, sendo já reconhecido o seu efeito agradável no odor do pão [4]. Além disso, os ensaios laboratoriais indicam que (exceto para o furfural), estes aromas agradáveis perduram no tempo (pelo menos 4 horas). Assim, a incorporação de ingredientes naturais, como são os extratos de AD e AM, podem representar uma mais-valia na durabilidade de propriedades organoléticas (odor) de matrizes alimentares complexas (como o pão), tal como indicaram os estudos preliminares de avaliação sensorial.

Moléculas de aromas provenientes dos extratos incorporados também foram identificadas. Pela incorporação de AD foi possível detetar α -pineno (18), canfeno (19), sabineno (23), β -pineno (25), *p*-cimol (30), *D*-limoneno (31), eucaliptol (33), γ -terpineno (35) e cânfora. Por outro lado, com a incorporação de AM, detetaram-se *D*-limoneno (31), eucaliptol (33) e linalool (37). Assim, as moléculas de aroma de extrato mais abundantes (*D*-limoneno e eucaliptol) foram quantificadas (**Tabela 4**).

Tabela 4. Quantificação de *D*-limoneno e eucaliptol nas amostras de crosta e miolo de pão incorporadas com AD e AM a $t=0$ e $t=4$ horas.

Sample	<i>D</i> -Limonene ($\mu\text{g/g}$ bread)		Eucalyptol ($\mu\text{g/g}$ bread)		
	t_0	t_4	t_0	t_4	
AD	crust	6.78×10^{-3}	1.02×10^{-3}	2.68×10^{-2}	4.46×10^{-3}
	crumb	4.46×10^{-3}	2.32×10^{-3}	1.88×10^{-2}	8.57×10^{-3}
AM	crust	6.07×10^{-3}	5.81×10^{-3}	9.46×10^{-3}	7.88×10^{-3}
	crumb	1.52×10^{-2}	1.48×10^{-2}	1.37×10^{-2}	1.26×10^{-2}

Curvas de calibração: *D*-Limonene: $y = 1528696844x + 10728244$; $R^2 = 0.9997$, LOD = 1.80×10^{-3} $\mu\text{g/g}$; LOQ = 5.46×10^{-3} $\mu\text{g/g}$. Eucalyptol: $y = 1088850774x + 16641657$; $R^2 = 0.9993$, LOD = 6.21×10^{-3} $\mu\text{g/g}$; LOQ = 1.88×10^{-2} $\mu\text{g/g}$.

Através da análise quantitativa dos aromas incorporados, conseguimos perceber que estes tendem a libertar-se da matriz alimentar ao longo do tempo ($t_0 > t_4$). No entanto, foram encontrados dois padrões distintos. Por um lado, pela incorporação de AM, os aromas tendem a permanecer em maior quantidade no interior do pão (miolo ou *crumb*). Por outro, com a incorporação de AD, a distribuição dos aromas permanece na mesma ordem de grandeza tanto na crosta (*crust*) como no miolo. Mais uma vez, os resultados vão ao encontro do estudo preliminar de avaliação sensorial, onde a incorporação de AM revelou diferenças estatisticamente significativas de perceção entre o odor na crosta e no miolo (**Tabela 1**).

Por fim, de forma a concluir o trabalho realizado no âmbito da tarefa 4.2.1, a incorporação dos ingredientes AD e AM apresentam potencial não só no incremento das propriedades sensoriais (odor) do pão, como também, através do estudo de doses incorporadas, é possível obter produtos alimentares diferentes e inovadores. Não obstante, o *scale-up* do processo proposto incluindo o estudo das propriedades sensoriais dos protótipos produzidos em ambiente industrial (previstos na atividade 4.3) serão fundamentais para a avaliação e validação da viabilidade económica dos mesmos.

Referências

- [1] Dutcosky, S.D., 2019. Análise Sensorial de Alimentos, 5ed. PUCPRes - Editora Universitária Champagnat.
- [2] ISO 13299:2016(en) Sensory analysis - Methodology - General guidance for establishing a sensory profile.
- [3] Pico, J., Bernal, J., Gómez, M., 2015. Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: a review. Food Research International, 75, 200-215.
- [4] Budryn, G., Zaczynska, D., Oracz, J., 2016. Effect of addition of green coffee extract and nanoencapsulated chlorogenic acids on aroma of different food products. LWT - Food Sci. Technol. 73, 197–204.

Anexo I

ANÁLISE SENSORIAL

ANÁLISE DESCRMINATIVA: TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA

Prezado participante, ser-lhe-á apresentada uma amostra padrão e quatro amostras codificadas. As amostras poderão conter aromas naturais intensionalmente adicionados.

Instruções:

1. Da esquerda para a direita, inale o aroma de cada uma das amostras cuidadosamente (aspirando o ar pelas narinas e com a boca fechada).
2. Por favor, avalie as amostras quanto ao seu aroma/odor e assinale o grau de diferença entre cada amostra e o padrão anotando o código da amostra correspondente à escala segundo a sua percepção.

Notas:

- Respeite o intervalo de 30 segundos entre cada inalação/amostra.
- Entre amostras pode cheirar o seu braço para neutralizar os odores.
- Realize, no máximo, duas inalações de cada amostra.

Anexo I

Data: _____

Género: () Feminino () Masculino () Outro

Caro avaliador, inale cuidadosamente as amostras de extratos que lhe estão a ser apresentadas. Siga as instruções previamente indicadas. Havendo dúvidas, não hesite em perguntar.

() Consinto o tratamento dos dados recolhidos no âmbito deste questionário e que fui esclarecido/(a) sobre os objetivos dos mesmos.

() Não consinto o tratamento dos dados recolhidos / Não fui esclarecido sobre os objetivos desta avaliação.

A equipa “Valor Natural” agradece a sua participação. Muito obrigada!

Escala discriminativa

- 1- Odor muito mais intenso a pão que o controlo
- 2- Odor ligeiramente mais intenso a pão que o controlo
- 3- Sem diferenças no odor a pão (comparativamente ao controlo)
- 4- Odor ligeiramente menos intenso a pão que o controlo
- 5- Odor muito menos intenso a pão que o controlo

Relativamente ao odor a pão da crosta:

Código da amostra	Nota (escala discriminativa)

Comentários que lhe pareçam pertinentes:

Relativamente ao odor a pão do miolo:

Código da amostra	Nota (escala discriminativa)

Comentários que lhe pareçam pertinentes:

O questionário foi aprovado pelo **Unidade de Proteção de Dados / Data Protection Office da Deifil Technology.**

Anexo I

Escala discriminativa

- 1- Odor distinto muito mais intenso que o controlo
- 2- Odor distinto ligeiramente mais intenso que o controlo
- 3- Sem diferenças no odor (comparativamente ao controlo)
- 4- Odor distinto ligeiramente menos intenso que o controlo
- 5- Odor distinto muito menos intenso que o controlo

Entende-se por odor **distinto** um odor que habitualmente **não existe no pão tradicional**.

Relativamente ao odor a pão da crosta:

Código da amostra	Nota (escala discriminativa)

Comentários que lhe pareçam pertinentes:
