

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Concentração: Bromatologia

Estudo da interação entre lipoxigenase da soja e ácido  
ascórbico nas propriedades reológicas e sensoriais de pães

Roberto de Moraes Junqueira Junior

Dissertação para obtenção do  
Título de

**MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Inar Alves de Castro

São Paulo

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Concentração: Bromatologia

Estudo da interação entre lipoxigenase da soja e ácido  
ascórbico nas propriedades reológicas e sensoriais de pães

Roberto de Moraes Junqueira Junior

Dissertação para obtenção do  
Título de

**MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Inar Alves de Castro

São Paulo

2007

Roberto de Moraes Junqueira Junior

Estudo da interação entre lipoxigenase da soja e ácido ascórbico  
nas propriedades reológicas e sensoriais de pães

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Inar Alves de Castro  
Orientadora/Presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

São Paulo, de de 2007.



## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Roberto de Moraes Junqueira Junior no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 15 dias do mês de maio de 2007, no(a) Auditório Paulo de Carvalho realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Roberto de Moraes Junqueira Junior, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia, intitulada:

Estudo da interação entre lipoxigenase da soja e ácido ascórbico nas propriedades reológicas e sensoriais de pães

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Inar Alves de Castro	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Marisa Aparecida Bismara Regitano d'Arce	Titular	ESALQ - USP	Aprovado
João Roberto Oliveira do Nascimento	Titular	FCF - USP	APROVADO
Resultado Final: <i>Aprovado</i>			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Monica Dealis Perussi *Monica Dealis Perussi*, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 15 dias do mês de maio de 2007.

*Marisa Aparecida Bismara Regitano d'Arce*  
Marisa Aparecida Bismara Regitano d'Arce

*João Roberto Oliveira do Nascimento*  
João Roberto Oliveira do Nascimento

*Inar Alves de Castro*  
Inar Alves de Castro  
Orientador(a)

Comissão de Pós-Graduação  
HOMOLOGADO  
16 MAIO 2007  
*Inar Alves de Castro*  
Presidente

\* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 15/05/2007

*"...one of the strongest motives that lead men to art and science is escape from everyday life with its painful crudity and hopeless dreariness, from the fetters of one's own ever-shifting desires. A finely tempered nature longs to escape from the personal life into the world of objective perception and thought."*

"...um dos motivos mais fortes que levam os homens para a arte e a ciência é escapar da vida diária, com sua crueza dolorosa e aridez irremediável, e da ardência dos próprios desejos, que sempre mudam. Uma natureza finamente temperada almeja escapar da vida pessoal para o mundo da percepção objetiva e do pensamento".

Albert Einstein (1879-1955)

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Inar Alves de Castro que me acolheu em seu laboratório e compartilhou seu conhecimento de forma desprendida, incentivando e ensinando com método e disciplina. Apostou fielmente na idéia deste projeto com estudo e dedicação e diante das inúmeras dificuldades, foi inabalável, inspirando grande confiança para vencer os obstáculos que surgiram nessa extraordinária jornada de quase 4 anos da qual surgiu uma grande amizade.

Ao Prof. João Roberto Oliveira do Nascimento, que me ouviu sem preconceitos, me abriu as portas da Faculdade e acreditou no meu objetivo, sempre incentivando o estudo e a idéia da pós-graduação.

À Profa. Bernadette Dora Gombossy de Mello Franco que acreditou na minha vontade de concretizar este projeto e com imparcialidade e profissionalismo me estimulou e apontou o caminho.

À Profa. Beatriz Rosana Cordenunsi pelo apoio e confiança.

À Prof. Ursula Maria Lanfer Marques pelos valiosos comentários acerca de métodos e resultados.

Ao Prof. Maurílio Moreira da Universidade Federal de Viçosa que compartilhou e ensinou métodos e idéias essenciais desse projeto.

À Mariana Carrapeiro e Vânia Monteiro, minhas colegas de laboratório, pela amizade e prazer da convivência.

À todos do laboratório: Miriam, Kelen, Luciene, Marliz e Joana que tiveram tanta paciência comigo, e pela valiosa ajuda.

À Maria Luiza Gomes pela grande ajuda nos experimentos com o HPLC.

Ao Jorge Alves de Lima e a Elaine Midori Ychico da secretaria do programa de pós-graduação, e a Maria José da Silva da Secretaria da Graduação que sempre me orientaram com paciência e atenção.

Às secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica Dealy Perussi e Tânia Cacheiro pela paciência e disposição

À Adriana Barreiros da Biblioteca pela ajuda e sugestão na formatação escrita deste trabalho e à Leila Bonádio da BCQ pela ajuda nas referências.

Ao Fabrício Leal Rocha da Granotec do Brasil pela gentileza, profissionalismo e disponibilidade para contribuir significativamente neste trabalho na base científica da panificação e sobretudo nos testes práticos de panificação, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

Aos competentes Anderson, Geni e Dayane da Granotec do Brasil, que nos ensinaram e acompanharam os testes de panificação que foram decisivos para este projeto.

À Cargill-Tatuí, na pessoa do Sebastião Mendes, que desde o início acompanhou com genuíno interesse esta pesquisa e nos ensinou e compartilhou valioso conhecimento sobre trigo e pães.

Ao Maurício Sandri (Moinho Paulista) pelo seu interesse no tema ao executar ensaios e enriquecer a discussão sobre mecanismos bioquímicos.

Ao Eng. Giovanni Peticara (Moinho Anaconda) por tornar possíveis os nossos infundáveis testes de panificação, e pelas saudáveis discussões e sugestões.

À Carol Conti pela gentileza e disponibilidade nos ensaios no laboratório da Faculdade de Saúde Pública da USP e todas as consultas posteriores.

À Profa. Maria Brígida Scholz, do IAPAR de Londrina, pelos testes reológicos e as importantes considerações sobre trigo e reologia.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Tatiana, minha esposa, pelo apoio incondicional, incentivo, paciência e compreensão.

Ao Rogério Tieppo, com sua grande generosidade e tolerância, nunca deixou de me apoiar na busca do meu objetivo.

Ao Prof. Márcio Felix de Carvalho pelas inúmeras e divertidas aulas de química.

Ao amigo Prof. Rogério Lerner, que em 2001 me apontou o caminho antes desconhecido e me incentivou todo este tempo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção mundial de trigo em 2004 em milhões de toneladas. ....	4
Figura 2. Consumo de pão por ano per capita em kg. ....	5
Figura 3. Grão de trigo (corte transversal e seccional) .....	6
Figura 4. Molécula de Luteína (C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub> ) .....	8
Figura 5. Fatores que regem a qualidade da panificação e propriedades reológicas da massa panificável. ....	11
Figura 6. Estrutura molecular da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). ....	12
Figura 7. Oxidação do ácido ascórbico pelo oxigênio e da GSH pelo DHAA e mecanismo de formação do PSSG. ....	13
Figura 8. Estrutura proposta das moléculas do glúten. ....	17
Figura 9. Clivagem do peróxido de benzoíla. ....	20
Figura 10. Natureza química do ácido ascórbico e do ácido desidroascórbico. ....	22
Figura 11. Reações propostas para explicar o efeito melhorador do ácido ascórbico de acordo com a hipótese de Grosch. ....	23
Figura 12. Produtos da LOX e especificidade posicional a partir da oxidação do ácido linoléico. ....	24
Figura 13. Modelo do ácido linoléico na estrutura do sitio do ferro na LOX. ....	26
Figura 14. Mecanismo proposto da reação da LOX. ....	28
Figura 15. Mecanismo proposto para o branqueamento aeróbico de pigmentos carotenóides. ....	30
Figura 16. Mecanismo proposto para branqueamento anaeróbico de carotenóides durante a oxidação de ácidos graxos pela Lipoxigenase. ....	31

Figura 17. Delineamento experimental “centróide-simplex” .....	38
Figura 18. Avaliação sensorial da cor das farinhas.....	42
Figura 19. Sistema de cores CIE Lab. ....	43
Figura 20. Alveógrafo Chopin .....	44
Figura 21. Forma para fermentação e forneamento de pão tipo americano. ....	45
Figura 22. Texturômetro Texture Analyser TA-XT2i .....	46
Figura 23. Teste sensorial da elasticidade do pão.....	47
Figura 24. Atividade da lipoxigenase acompanhada por espectrofotometria na faixa do ultravioleta.....	51
Figura 25. Resistência à extensão ( <i>P</i> ) das diferentes misturas.....	52
Figura 26. Extensibilidade da massa ( <i>L</i> ) das diferentes misturas.....	53
Figura 27. Cor instrumental das misturas de farinha de trigo. ....	54
Figura 28. Curvas de contorno obtidas pelo modelo polinomial ajustado à elasticidade da massa ( <i>P</i> ) em mm.....	59
Figura 29. Curvas de contorno obtidas pelo modelo polinomial ajustado à extensibilidade da massa ( <i>L</i> ) em mm. ....	59
Figura 30. Curvas de contorno obtidas pelo modelo polinomial ajustado à luminosidade ( <i>Lc</i> ) da farinha.....	60
Figura 31. Determinação de cor em pães usando um colorímetro tipo Minolta.....	65
Figura 32. Pães Franceses preparados sem melhoradores de panificação. ....	66
Figura 33. Masseiras computadorizadas .....	67
Figura 34. Massas modeladas a mão em 2 kg. ....	67
Figura 35. Massa de 2 kg dividida em 30 pedaços (≈66,66 g).....	68

Figura 36. Pedacos modelados e transferidos à câmara de fermentação. ....	68
Figura 37. Caracterização da pestana no pão francês. ....	69
Figura 38. Atividade de lipoxigenase medida em amostras de farinha de soja. 1 unidade = $\Delta$ de 0,001/min. ....	73
Figura 39. Alveograma das amostras de farinha de trigo aplicada no delineamento experimental. ....	74
Figura 40. Curvas de contorno relativas ao efeito de branqueamento no miolo do pão (valor $b$ ) resultante da variação da atividade da lipoxigenase ( $x_1$ ) e o do tempo de fermentação ( $x_3$ ), adotando-se a força media da farinha de trigo ( $x_2 = 0$ ). ....	77
Figura 41. Curvas de contorno relativas ao efeito de branqueamento no miolo do pão (valor $b$ ) resultante da variação da atividade da lipoxigenase ( $x_1$ ) e o da força da farinha ( $x_3$ ), adotando-se o tempo médio de fermentação ( $x_2 = 0$ ). ....	77
Figura 42. Oxidação do ascorbato radical para ácido desidroascórbico na presença de oxigênio, correspondente à etapa (5) da reação acima descrita. .	82
Figura 43. Mecanismo proposto para a interação entre o ferro e o ácido ascórbico na panificação. ....	84
Figura 44. Mecanismo proposto para a interação entre a LOX e o ácido ascórbico na panificação. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso e composição das partes do grão do trigo de farinhas com diferentes graus de extração.....	6
Tabela 2. Conteúdo de lipídios livres e sua distribuição no grão. ....	9
Tabela 3. Composição química da farinha de soja e farinha de trigo. ....	49
Tabela 4. Composição química das farinhas de trigo preparadas de acordo com o delineamento experimental. ....	50
Tabela 5. Composição química dos pães utilizados nos experimentos .....	50
Tabela 6. Avaliação sensorial de cor das misturas. ....	55
Tabela 7. Cor instrumental (luminosidade e tonalidade amarela) dos pães. ....	55
Tabela 8. Volume específico dos pães. ....	56
Tabela 9. Firmeza (maciez) dos pães medidos por texturômetro. ....	56
Tabela 10. Escore sensorial da análise dos pães.....	57
Tabela 11. Análise da variância dos modelos aplicada aos dados experimentais.....	58
Tabela 12. Avaliação entre valores estimados dos modelos polinomiais e os valores determinados experimentalmente nas farinhas e respectivas massas.	61
Tabela 13. Delineamento com três fatores em três níveis do tipo Box-Behnken.	64
Tabela 14. Descrição da avaliação sensorial dos pães com escala de 9 pontos	70
Tabela 15. Composição química das farinhas de trigo codificadas. ....	72
Tabela 16. Parâmetros do farinógrafo para as amostras de farinha de trigo ....	74
Tabela 17. Volume específico, qualidade sensorial e tonalidade amarela dos pães. ....	75

Tabela 18. Regressão linear, coeficientes de interação quadrática e interação linear-linear para os modelos polinomiais de segunda ordem. ....	76
--	----

## LISTA DE SIGLAS

13-HPOD	13-hidroperóxido de ácido linoléico
9-HPOD	9-hidroperóxido de ácido linoléico
AA	ácido ascórbico
AAO	ascorbato oxidase
ADA	azodicarbonamida
ANOVA	análise de variância
DHAA	ácido desidroascórbico
DP	desvio padrão
FAO	<i>Food Agricultural Organization</i> (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação)
FIS	farinha integral de soja
GS	subunidades de glúten
GSH	glutathione reduzida
GSH-DH	glutathione dehidrogenase
GSSH	glutathione oxidada
HMV-GS	subunidades de glúten de alto peso molecular
LA	ácido linoléico
Lc	luminosidade
LH	ácidos graxos
LMV-GS	subunidades de glúten de baixo peso molecular
LOX	lipoxigenase
MSR	metodologia de superfície de resposta
PBZ	peróxido de benzoíla
pI	ponto isoelétrico
PSH	grupos sulfidríla da proteína do glúten
PSSG	proteína-glutathione
PSSP	ligações protéicas do glúten
PUFA	ácidos graxos polinsaturados
SH	grupos sulfidríla
SS	ligação dissulfídica

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE SIGLAS .....	x
SUMÁRIO .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) .....	3
Aspectos Econômicos .....	3
2.2 Morfologia e composição .....	5
Pigmentos .....	7
Lipídios do trigo e da farinha .....	8
Proteínas do trigo .....	9
Glutationa .....	12
2.3 Farinha de trigo .....	13
A panificação e os principais ingredientes .....	14
A mistura da massa .....	15
Métodos reológicos .....	17
2.4 Aditivos .....	18
Oxidantes .....	19
Peróxido de benzoíla .....	20
Ácido ascórbico .....	21
Lipoxigenase .....	23
Mecanismo de oxidação de carotenóides .....	29
Mecanismo de fortalecimento da matriz do glúten .....	31
A lipoxigenase e a soja .....	33
2.5 A metodologia de superfície de resposta .....	34
3. OBJETIVOS [PARTE 1] .....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS [PARTE I] .....	37

4.1 Material .....	37
4.2 Delineamento experimental das massas .....	37
4.3 Delineamento experimental dos pães .....	38
4.4 Métodos .....	39
Preparo das misturas .....	39
Fortificação da farinha de trigo .....	39
Determinação da composição centesimal .....	39
Determinação da atividade da lipoxigenase .....	40
Determinação do conteúdo de ferro nas farinhas de soja .....	41
Análise sensorial da cor das farinhas .....	42
Análise instrumental da cor das farinhas e dos pães .....	42
Propriedades reológicas .....	43
Preparo dos pães .....	44
Análise de volume dos pães .....	45
Propriedades de textura .....	46
Avaliação sensorial dos pães .....	46
Modelagem e otimização das regressões .....	48
Análise estatística .....	48
5. RESULTADOS [PARTE 1] .....	49
5.1 Composição química .....	49
5.2 Atividade de lipoxigenase da farinha de soja .....	50
5.3 Propriedades reológicas da massa .....	52
5.4 Cor das misturas com farinha de trigo .....	54
5.5 Cor dos pães .....	55
5.6 Volume dos pães .....	55
5.7 Textura (maciez) dos pães .....	56
5.8 Avaliação sensorial dos pães .....	56
5.9 Modelos polinomiais das misturas de farinha de trigo .....	57
5.10 Otimização e validação do modelo das misturas de farinha de trigo .....	60
6. OBJETIVOS [PARTE 2] .....	62
7. MATERIAL E MÉTODOS [PARTE 2] .....	63

7.1 Material .....	63
7.2 Delineamento experimental .....	63
7.3 Métodos .....	64
Determinação da composição centesimal .....	64
Determinação da atividade da lipoxigenase .....	64
Análise instrumental da cor dos pães .....	65
Propriedades reológicas .....	65
Preparo dos pães .....	66
Análise de volume dos pães .....	69
Avaliação sensorial dos pães .....	69
Análise estatística .....	70
8. RESULTADOS [PARTE 2] .....	72
8.1 Composição química da farinha de trigo .....	72
8.2 Atividade de lipoxigenase nas farinhas .....	72
8.3 Propriedades reológicas .....	73
8.5 Modelos polinomiais .....	75
10. CONCLUSÕES .....	90
11. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS .....	91
12. REFERÊNCIAS .....	92
13. ANEXOS .....	105

## Resumo

JUNQUEIRA-JR, R.M. **Estudo da interação entre lipoxigenase da soja e ácido ascórbico nas propriedades reológicas e sensoriais de pães.** 2007. 130f. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007].

A enzima lipoxigenase através da farinha integral de soja é amplamente utilizada na panificação com objetivos de branqueamento e melhora da reologia. Com base nesse pressuposto, o objetivo inicial deste estudo foi de observar a ação oxidante dessa enzima na presença de dois outros oxidantes (ácido ascórbico e peróxido de benzoíla) nas propriedades reológicas e sensoriais de pães. Sete misturas com diferentes combinações dos três compostos foram elaboradas utilizando-se um delineamento experimental do tipo “centroide-simplex”, sendo aplicadas à farinha de trigo para o preparo de pães. A enzima apresentou sinergia com o ácido ascórbico na elasticidade da massa, sugerindo uma inter-relação bioquímica entre os dois compostos no fortalecimento da matriz protéica do glúten. A mesma sinergia entre a lipoxigenase da soja e o ácido ascórbico foi observada na redução da tonalidade amarela dos pães medida instrumentalmente. A partir desses resultados, buscou-se avaliar a ação da enzima frente a variações tanto na força da farinha como no tempo de fermentação, reproduzindo as condições reais de processamento. Desta vez, um planejamento experimental do tipo Box-Behnken com três fatores (atividade da enzima, força da farinha e tempo de fermentação) em três níveis de variação, foi aplicado no preparo das amostras. Os resultados mostraram que a lipoxigenase da soja (fração 1) é uma enzima oxidante de ação rápida e seu efeito no branqueamento dos carotenóides da farinha de trigo exibiu interação positiva tanto com a força da farinha como o tempo de fermentação. Respostas reológicas e sensoriais decorrentes da ação conjunta de diferentes oxidantes e condições de processamento em pães foram pela primeira vez descritas através de modelos polinomiais com capacidade preditiva.

**Palavras-Chave: Lipoxigenase. Panificação. Reologia. Ácido ascórbico. Superfície de resposta.**

## Abstract

JUNQUEIRA-JR, R.M. **Study of the interaction between soy lipoxygenase and ascorbic acid in the rheological and sensory properties of bread.** 2007. 130f. [Dissertation (Master) – College of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2007].

Soy lipoxygenase enzyme through soy flour is widely used in breadmaking for bleaching and rheological improvement. Based on this fact, the initial objective of this study was to observe the enzymes' action in the presence of two other oxidants (ascorbic acid and benzoyl peroxide) in the rheological and sensory properties of breads. Seven mixtures with different combinations of the three compounds were prepared using a 'centroid-simplex' design and applied to wheat flour for breadmaking. The enzyme showed synergism with ascorbic acid in the dough elasticity suggesting a biochemical interrelation between the two compounds in strengthening the gluten protein matrix. The same synergy between soy lipoxygenase and ascorbic acid was observed with the yellow hue reduction of breads measured instrumentally. From these results, the enzyme action was evaluated with wheat strength and proofing time variations reproducing real processing conditions. This time, a Box-Behnken experimental design with three factors (enzyme activity, wheat strength and proofing time), and three variation levels were applied in the sample preparation. The results showed that soy lipoxygenase (type 1) is a fast-acting oxidizing enzyme and its bleaching effect on wheat flour carotenoid exhibited a positive interaction with wheat strength and proofing time. Rheological and sensory results attributed to the combined action of the different oxidants and breadmaking conditions were for the first time described through polynomial models with predictive capacity.

**Key words: Lipoxygenase. Breadmaking. Rheology. Ascorbic Acid. Response surface.**

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade de massas e produtos panificáveis depende de características únicas apresentadas pelas proteínas do trigo. No Brasil, a diversidade de cultivares produzidos associada às diferenças na procedência do trigo importado, torna difícil a manutenção das propriedades reológicas da farinha e conseqüentemente da qualidade dos pães. Outro fator que interfere diretamente na caracterização das farinhas produzidas no Brasil é o grau de extração a que o trigo é submetido durante o processo de moagem, sendo que quanto mais elevado é grau de extração, maior rendimento econômico pode ser alcançado, porém, com proporcional prejuízo à qualidade tecnológica da farinha.

Essa realidade levou a indústria a desenvolver e utilizar vários aditivos (enzimas, compostos oxidantes e emulsificantes) com distintos mecanismos de ação para padronizar as farinhas em relação à força do glúten, cor e fermentabilidade. Atualmente o Brasil gasta mais de US\$ 47 milhões/ano em aditivos importados para panificação. Além disso, há evidências de que o consumidor tende a preferir alimentos que contenham um número menor de aditivos em sua formulação e rotulagem. Entretanto, reduzir o volume adicionado desses compostos sem alterar as características sensoriais, tem se tornado um dos maiores desafios à ciência e à tecnologia de alimentos.

Há duas formas de tentar superar esse desafio. Empiricamente, a partir do conhecimento e experiência acumulados, vários testes seqüenciais podem ser realizados combinando-se diferentes proporções desses aditivos, até identificar uma proporção alternativa que permita reduzir o volume desses compostos na formulação. Outra forma de alcançar esse objetivo é através do uso de técnicas estatísticas de planejamento e análise, como a metodologia de superfície de resposta (MSR), que permite avaliar simultaneamente todas as combinações entre um número "n" de compostos, modelar essa resposta e otimizá-la na obtenção da proporção ideal de compostos que maximize as propriedades desejadas. Tudo isso com um número mínimo de ensaios experimentais.

Desta forma, o objetivo desse estudo foi de primeiramente avaliar a interação entre três compostos amplamente utilizados em panificação: lipoxigenase da soja, ácido ascórbico e peróxido de benzoíla, nas propriedades reológicas e sensoriais de farinhas, massas e pães formulados a partir de uma farinha de trigo com baixa qualidade tecnológica, usando as técnicas de MSR para misturas. A partir dessa avaliação, a interação observada entre a enzima lipoxigenase e o ácido ascórbico foi avaliada sob fermentação curta e longa e com farinhas de diferente qualidade tecnológica, desta vez empregando-se as técnicas de MSR para variáveis independentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Trigo (*Triticum aestivum*)

O Trigo é uma gramínea selvagem (família *Gramineae*) nativa dos países áridos da Ásia ocidental. O seu uso como alimento data da era Neolítica. Ao todo, cerca de 600 gêneros de gramíneas evoluíram e dentre eles as várias formas do gênero *Triticum*, sendo que o *aestivum* (*vulgare*), chamado de trigo comum, domina a produção mundial (MATTERN, 1991).

Após a Idade Média o trigo se tornou o principal grão uma vez que o pão, especialmente o fermentado, havia se tornado parte importante da dieta diária. O trigo era o único grão adequado para a produção de pão fermentado devido à presença de um complexo protéico único conhecido por glúten, capaz de formar uma matriz elástica o suficiente para reter os gases formados na fermentação, conferindo a textura aberta característica do pão (CORNELL; HOVELING, 1998).

### Aspectos Econômicos

O trigo fornece cerca de 1/5 de todas as calorias consumidas pelos seres humanos e responde por quase 1/4 da produção mundial de grãos. De um total de 2.227 milhões de toneladas de grãos produzidos no planeta em 2005, 628 milhões de toneladas (28%) foram de trigo (UNITED STATES, 2005a). De acordo com a *Food Agricultural Organization* (FAO) (FAOSTAT, 2006), 71 países cultivaram trigo em 2005 (Figura 1), sendo que a colheita do trigo é realizada todos os meses do ano nos diferentes países produtores (POMERANZ, 1987).

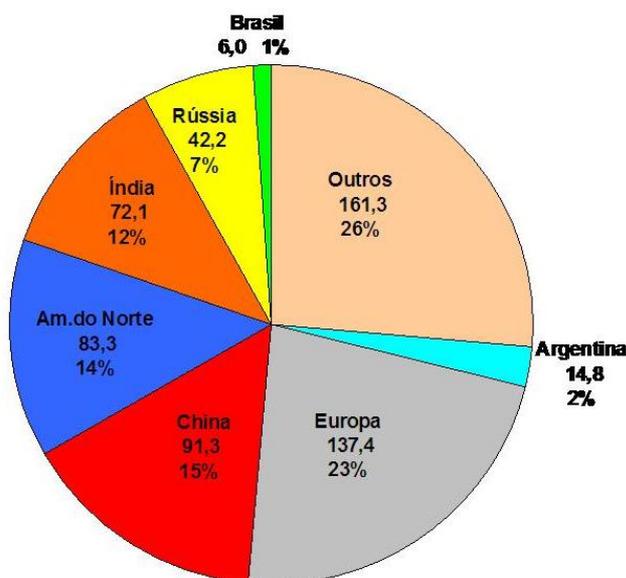


Figura 1. Produção mundial de trigo em 2004 em milhões de toneladas.

Fonte: FAO (2005).

O Brasil é o segundo maior importador mundial de trigo, consumindo 9,5 milhões de toneladas por ano e produzindo somente 4,8 milhões (CONAB, 2006).

O consumo de pão no Brasil é de 27 kg anuais per capita, representando metade da porção recomendada por organizações como a Organização Mundial da Saúde (OMS) de 60 kg/capita/ano e da FAO de 50 kg/capita/ano (Figura 2). Na Argentina e no Chile, o consumo de pão é significativamente maior. Por falta de dados oficiais, foram apresentados dados obtidos de empresas privadas que mostram que no Brasil o pão industrializado (pão de forma), chega a apenas 20% dos lares (FOUNTOURA; MARTINEZ, 2006) e de acordo com o Sindipan-Aipan (2006a), o consumo de pão tem estado estável desde 1997.

O setor de panificação está entre os seis maiores segmentos industriais do país, gera 580 mil empregos diretos (1,5 milhão indiretos) e as empresas do setor atendem uma média de 40 milhões de clientes/dia (ABIP, 2005).

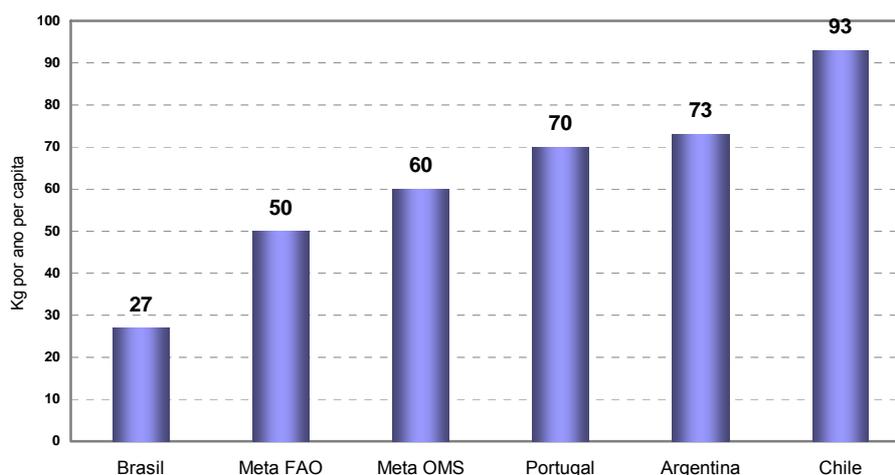


Figura 2. Consumo de pão por ano per capita em kg.

Fonte: SINDIPAN-AIPAN (2005)

## 2.2 Morfologia e composição

A estrutura do grão de trigo está apresentada na Figura 3. O pericarpo ou casca é composto de quatro camadas: epiderme, hipoderme, células cruzadas e células tubulares. Os demais tecidos são a casca interna (tecido nucelar e testa), endosperma e gérmen. A aleurona é a camada externa do endosperma. Em um grão normal, o gérmen responde por cerca de 2 a 3% do grão, a casca, 13 a 17%, sendo o restante endosperma. A casca interna ou aleurona é rica em proteínas, enquanto que a casca externa é rica em celulose, hemicelulose e minerais. O gérmen tem alta quantidade de proteínas, lipídios, açúcares e minerais e o endosperma consiste de grânulos de amido embutidos em uma matriz protéica.

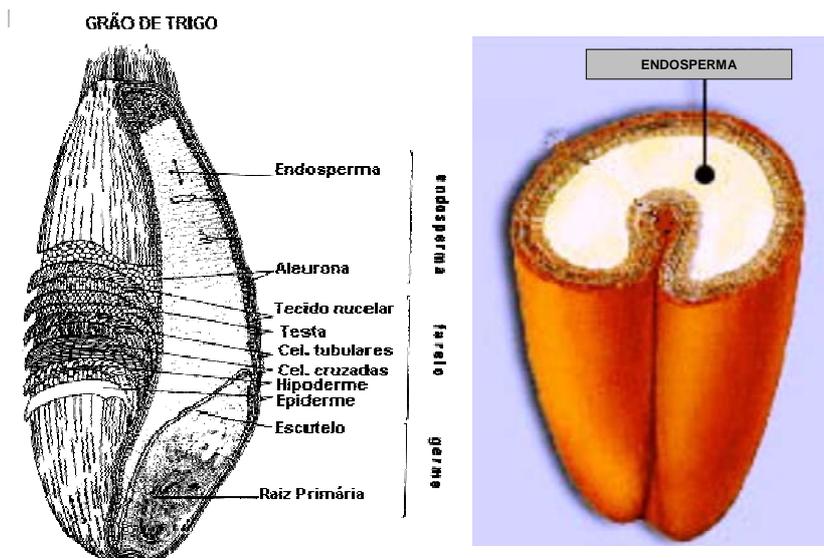


Figura 3. Grão de trigo (corte transversal e seccional)

Fonte: The New Zealand Institute for Crop & Research Ltd (2005) [adaptado].

Os diversos componentes químicos do grão não são uniformemente distribuídos nas diversas estruturas. A Tabela 1 compara os pesos e composições das principais partes anatômicas do trigo (POMERANZ, 1987).

Tabela 1. Peso e composição das partes do grão do trigo de farinhas com diferentes graus de extração.

Parâmetros	Pericarpo	Aleurona	Endosperma	Gérmen	Extração da moagem (%)		
Peso %	9,0	8,0	80,0	3,0	<b>75,0</b>	<b>85,0</b>	<b>100,0*</b>
Cinzas %	3,0	16,0	0,5	5,0	0,5	1,0	1,5
Proteína %	5,0	18,0	10,0	26,0	11,0	12,0	12,0
Lipídio %	1,0	9,0	1,0	10,0	1,0	1,5	2,0
Fibras %	21,0	7,0	<0,5	3,0	<0,5	0,5	2,0

\* Farinha integral de trigo

Fonte: Pomeranz (1987)

## Pigmentos

Variações na cor das farinhas e nos métodos para produção de uma farinha uniforme são tópicos relevantes nos processos de moagem e panificação. Segundo Grosch e Wieser (1999), a glutathione, um tripeptídeo presente no trigo, degrada-se durante o armazenamento da farinha. A diminuição desse composto é acompanhada por um aumento no desempenho e um clareamento do produto panificado (GELINAS *et al.*, 1998; SAIZ; MANRIQUE; FRITZ, 2001). No entanto, o processo natural de maturação e clareamento é lento, dispendioso e sem garantia de uniformidade. A solução prática para este problema tem sido o desenvolvimento e uso difundido de “agentes de maturação” que permitem o uso de receitas uniformes, eliminação de perdas na aplicação no uso doméstico e maior apelo visual ao consumidor (FORTMANN; JOINER, 1971).

Os grãos de trigo em processo de maturação contêm pigmentos carotenóides, especialmente presentes na casca. O conteúdo de carotenóides em diversas variedades de trigo varia de 5,5 a 8,4 mg/kg, e não são distribuídos de forma homogênea no grão. A casca contém de 0,9 a 2,2 mg/kg, o gérmen, 4,1 a 11,0 mg/kg e o endosperma, 1,6 a 2,2 mg/kg (CHUNG, 2001). Quando o endosperma é moído para se transformar em farinha, a casca é parcialmente separada. Consequentemente, a farinha recém-moída apresenta pigmentos remanescentes que promovem uma coloração amarelada típica, resultando em produtos panificados com uma cor comercialmente menos aceitável. Isso explica o fato de que farinhas amareladas estão relacionadas com alto grau de extração (FORTMANN; JOINER, 1971). Várias pesquisas têm demonstrado que xantofilas na forma livre ou esterificada, sem atividade de pró-vitamina A, poderiam ser consideradas como os principais pigmentos do trigo, uma vez que representam cerca de 85% do total (FORTMANN; JOINER, 1971; SAIZ; MANRIQUE; FRITZ, 2001; UNITED STATES, 2005b).

Como pode ser visualizado na Figura 4, a xantofila apresenta várias ligações duplas conjugadas. Quando o carbono associado a essas duplas sofre oxidação liberando o hidrogênio, ocorre uma ruptura dessas duplas resultando na perda da coloração amarela. Além das xantofilas e seus ésteres, outros

pigmentos encontrados no trigo são criptoxantinas e produtos da degradação da clorofila (FORTMANN; JOINER, 1971).

Desta forma, o branqueamento da farinha envolve principalmente o rompimento das ligações duplas conjugadas para um sistema conjugado sem cor (CHUNG, 2001; SAIZ; MANRIQUE; FRITZ, 2001).

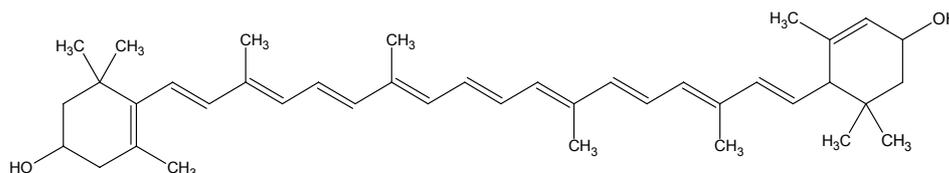


Figura 4. Molécula de Luteína ( $C_{40}H_{56}O_2$ )

Fonte: Fortmann e Joiner (1971).

## Lipídios do trigo e da farinha

Os lipídios constituem entre 2,5 e 3,3% do grão inteiro e são especialmente ricos em triacilgliceróis contendo grande quantidade de ácido linoléico, representando aproximadamente 60% do total de ácidos graxos. O trigo armazena os triacilgliceróis em corpúsculos de óleo, conhecidos por esferossomas ou oleossomas que são encontrados no gérmen e na aleurona (CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992).

Os lipídios do trigo podem ser encontrados na cadeia da amilose ( $\approx 20\%$ ) ou fora do grânulo de amido ( $\approx 80\%$ ). Estes últimos, conhecidos por lipídios não-amiláceos, podem por sua vez, apresentarem-se na forma ligada ou livre. Cerca de 90% dos lipídios livres apresentam propriedades apolares e 10% polares. Os lipídios livres, especialmente os polares, estão mais associados ao aumento de volume em pães que os lipídios ligados.

Durante o armazenamento da farinha, os triacilgliceróis podem ser hidrolisados por enzimas lipases produzindo ácidos graxos livres, que estão relacionados com a redução da qualidade dos pães. No entanto, a atividade da lipase é baixa em trigo não-germinado e está associada à casca. Desta forma, farinhas brancas com menor grau de extração no processo da moagem podem ser armazenadas por longo período de tempo, enquanto farinhas integrais são

mais suscetíveis à hidrólise lipídica. O trigo também contém a enzima lipoxigenase, que catalisa o processo de oxidação lipídica. Entretanto, sua atividade é desprezível na atividade de água da farinha armazenada (CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992). O conteúdo de lipídios livres varia de 1,6 a 2,1% do peso do grão do trigo e são distribuídos de forma não-uniforme no grão (Tabela 2).

Tabela 2. Conteúdo de lipídios livres e sua distribuição no grão.

Partes	Distribuição (%)
Endosperma	62,7
Gérmen	33,8
Casca	3,4

Fonte: Chung (1991) [adaptado].

Após a moagem do grão, os lipídios (até 2% podem ser extraídos) interagem com outros constituintes da farinha, sendo que 70% do total dos lipídios da farinha se associam ao glúten modificando e suportando-o estruturalmente, principalmente às gluteninas (81,5% do total de lipídios) (FRAZIER, 1983; CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992). Os lipídios polares (fosfolipídios) também podem se ligar à gliadinas por ligações hidrofílicas (CHUNG; POMERANZ; FINNEY, 1978) promovendo a melhora na panificação através de pontes entre as proteínas (gliadinas e gluteninas) e os componentes amiláceos, devido a suas características anfifílicas (CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992).

## Proteínas do trigo

Do ponto de vista funcional, dois grupos de proteínas do trigo devem ser caracterizadas: as proteínas não-glúten, sem função ou com uma função menor na panificação e as proteínas do glúten, com um papel significativo na panificação. As proteínas não-glúten (entre 15 e 20% do total de proteínas do trigo) ocorrem principalmente nas camadas externas do grão, com baixas concentrações no endosperma.

O glúten do trigo é a denominação que se dá a dois grupos principais de proteínas: as gliadinas, também conhecidas como prolaminas e as gluteninas.

As proteínas do glúten (entre 80 e 85% do total das proteínas do trigo) são as principais proteínas de armazenamento. São insolúveis em água ou em soluções salinas, sendo encontradas no endosperma do grão maduro onde formam uma matriz contínua em volta dos grânulos de amido. Dois grupos funcionalmente distintos de proteínas do glúten podem ser identificados: gliadinas monoméricas e gluteninas poliméricas (GOESAERT *et al.*, 2005).

As gliadinas e gluteninas são encontradas em proporções iguais no trigo, sendo que as gliadinas são um grupo altamente polimórfico com pesos moleculares variando entre 30.000 e 80.000 Da. Bioquimicamente, três tipos solúveis em álcool foram identificados ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\omega$ ). Estas exibem propriedades de fluidez viscosa sem elasticidade significativa e são consideradas responsáveis pela extensibilidade e coesividade da massa, sendo extremamente pegajosas quando hidratadas e com pouca ou nenhuma resistência à extensão (BELITZ *et al.*, 1986). Apesar das gliadinas conterem de 2 a 3% de resíduos de cisteína, elas aparentemente não sofrem polimerização extensa por interações sulfidrilá-dissulfeto.

As gluteninas são uma mistura heterogênea de polímeros com peso molecular variando de aproximadamente 80.000 a muitos milhões. Dentre as gluteninas estão as maiores proteínas encontradas na natureza. Somente uma pequena parte das gluteninas são solúveis em álcool, o que explica porque relativamente poucos detalhes estão disponíveis sobre sua estrutura, sabendo-se que suas subunidades (GS) são unidas por ligações dissulfídicas. Quatro diferentes grupos de GS podem ser caracterizados: subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) (entre 65.000 e 90.000) e tipos B, C e D de subunidades de gluteninas de baixo peso molecular (LMW-GS) (30.000 a 60.000). Por causa de sua habilidade em polimerizar extensivamente via interação sulfidrilá-dissulfeto, as gluteninas contribuem intensamente para a elasticidade da massa. É comumente aceito que as frações insolúveis de gluteninas de alto peso molecular são responsáveis pelas variações de desempenho em panificação entre diferentes variedades de trigo (DOBRSZCZYK; MORGENSTERN, 2003). Uma proporção ideal de gliadinas e gluteninas parece ser necessária para formar uma massa visco-elástica. Cerca de 1,4% dos aminoácidos no glúten são formados por resíduos cistina ou cisteína e as ligações dissulfídicas na cistina podem ligar porções da

mesma cadeia polipeptídica, contribuindo para a firmeza da massa. De acordo com Bloksma (1975), Belitz *et al.* (1986) e Goesaert *et al.* (2005), ensaios de fracionamento e reconstituição demonstraram que a qualidade da panificação do trigo depende fortemente de dois fatores da qualidade do glúten: o primeiro é a proporção gliadina/glutenina nas proteínas do glúten e o segundo é a qualidade (composição, estrutura e distribuição do tamanho) da glutenina que pode resultar em interações não-covalentes diferentes, determinando sua elasticidade (Figura 5).

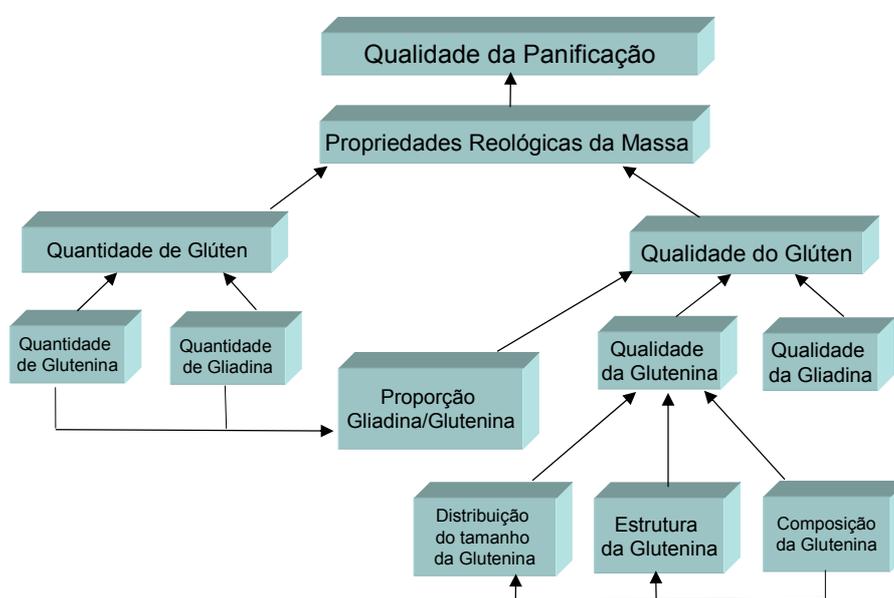


Figura 5. Fatores que regem a qualidade da panificação e propriedades reológicas da massa panificável.

Fonte: Goesaert *et al.*, 2005 [adaptado].

Além disso, um em cada três resíduos de aminoácidos do glúten é uma glutamina e um em cada sete resíduos é uma prolina. Esta elevada presença de resíduos de glutamina potencializam a formação de pontes de hidrogênio resultando em forte tendência de agregação no glúten (JEREZ *et al.*, 2005; DOBRASZCZYK; MORGENSTERN, 2003; KASARDA; NIMMO; KOHLER, 1971; HOSENEY, 1996; POMERANZ, 1987; DAMODARAM, 1996; LÁSZTITY, 1996).

As ligações dissulfídicas são uma forma que a natureza utiliza para conferir força e rigidez às estruturas fibrosas, análogo às ligações que unem escadas ou estruturas de aço (TIECKELMANN; STEELE, 1991). Foi observado, no entanto, que apenas 25 a 35% dos grupos sulfidrila e 4 a 13% das ligações dissulfídicas são reologicamente efetivas. No entanto, uma pequena redução nas ligações é suficiente para causar um considerável efeito reológico.

## Glutathiona

A glutathiona, um metabólico multifuncional da planta, é um tripeptídeo formado por glutamina, cisteína e glicina. Sendo endógena na farinha de trigo nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), a glutathiona é encontrada em altas concentrações no gémem do trigo e no endosperma (Figura 6).

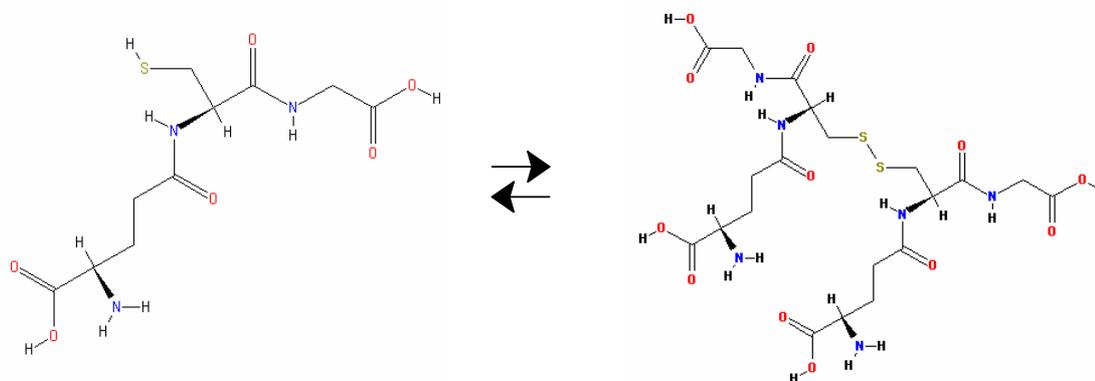


Figura 6. Estrutura molecular da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

Fonte: BRENDA: THE COMPREHENSIVE ENZYME INFORMATION SYSTEM, 2005.

A influência da GSH na melhora das propriedades reológicas foi elucidada recentemente quando Grosch e Wieser (1999) demonstraram que a GSH é oxidada para a forma GSSG pelo ácido desidroascórbico (DHAA) numa reação catalisada pela enzima glutathiona dehidrogenase (GSH-DH). O ácido desidroascórbico é formado pela oxidação do ácido ascórbico pelo  $O_2$  catalisada pela enzima ácido ascórbico oxidase (Figura 7).

Os dissulfetos mistos “proteínas-glutationas” (PSSG) também estão presentes na proteína do trigo e podem ser formados durante a mistura da massa, por reação da GSH com ligações dissulfídicas protéicas (PSSP) ou através da reação da GSSG com grupos sulfidríla da proteína (PSH) (CHEN; SCHOFIELD, 1995) (Figura 7). Desta forma, a glutaciona oxidada (GSSG) pode enfraquecer a massa panificável através da reação de intercâmbio SH/SS com grupos protéicos sulfidríla. A GSH liberada reage com as ligações dissulfeto protéicas (SCHOFIELD; CHEN, 1993).

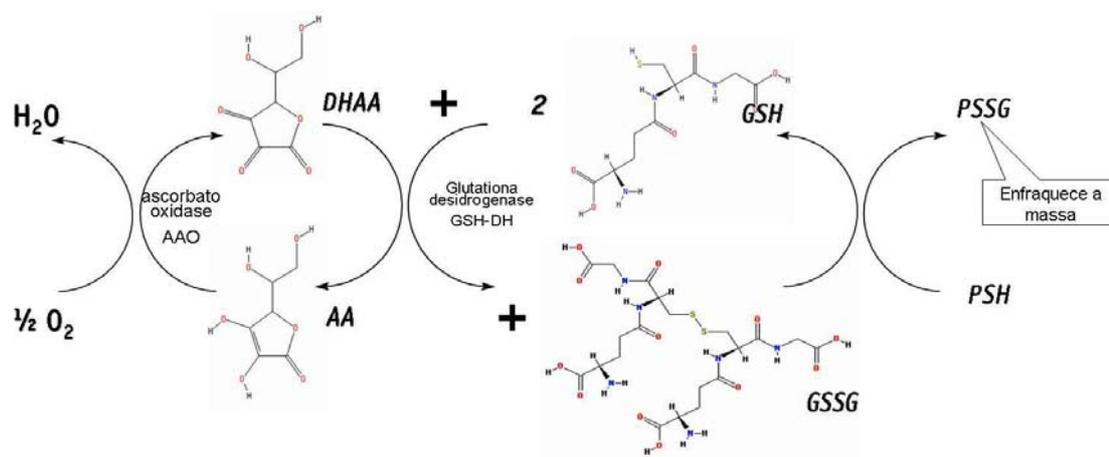


Figura 7. Oxidação do ácido ascórbico pelo oxigênio e da GSH pelo DHA e mecanismo de formação do PSSG.

AA= ácido ascórbico; DHA= ácido desidroascórbico; AAO= ácido ascórbico oxidase; GSH= glutaciona reduzida; GSSG= glutaciona oxidada; GSH-DH= glutaciona desidrogenase; PSH= proteína do glúten reduzida; PSSG= proteína ligada a glutaciona.

Fonte: Chen; Schofield (1995); Grosch; Wieser (1999); Koehler (2003a); Koehler (2003b) [Adaptado].

### 2.3 Farinha de trigo

A produção da farinha a partir do trigo é derivada de processos antigos de moagem dos grãos entre duas superfícies de pedra (CORNELL; HOVELING, 1998). O processo se desenvolveu consideravelmente para atender à demanda das grandes indústrias, onde diversos tipos de farinhas e

subprodutos são obtidos pelo uso de diferentes tipos de rolos, peneiras e sistemas de classificação por ar. O grau de extração do trigo para produção da farinha é um importante índice de eficiência da técnica de moagem e é expresso na base seca da quantidade de trigo utilizada em relação à quantidade ou rendimento em farinha, que varia de 72% para farinhas brancas para números próximos a 100% para farinhas integrais (CORNELL; HOVELING, 1998).

Quanto maior a extração, mais casca e fragmentos da aleurona serão incorporados, adicionando pigmentos carotenóides (FORTMANN; JOINER, 1971), glutatona (GROSCH; WIESER, 1999) e lipases à farinha (CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992).

## A panificação e os principais ingredientes

O processo de panificação consiste de diferentes estágios apresentando uma grande variação de tensão imposta ao material (TRONSMO, 2003b), no qual água e farinha são transformadas em uma massa visco-elástica. A farinha de trigo consiste de duas fases contínuas e imiscíveis: o glúten e a fase líquida contendo compostos solúveis e amido. As propriedades de forneamento e manuseio são fortemente influenciadas pelas condições de processamento (mistura, modelagem, laminação, fermentação e forneamento) e pelos ingredientes (AUTIO; LAURIKAINEN, 1997). Existem dois principais métodos de panificação: o método direto, mais curto e o método mais longo, chamado “método-esponja” (STAUFFER, 1990).

A água é adicionada para aglutinar a farinha e outros ingredientes em uma massa coesa para o desenvolvimento da fermentação. Quando a água é adicionada à massa, uma parte penetra nas camadas externas das partículas sólidas da farinha e se combina com proteínas solúveis, açúcares e outros compostos hidrossolúveis (POMERANZ, 1987). Neste estágio (a partir de 23% de umidade), ocorre um declínio significativo no nível de lipídios livres (principalmente lipídios neutros e polares) que se complexam com componentes da massa (CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992). A agitação ajuda

a remover a camada hidratada da partícula e expõe mais superfície ainda seca para absorção de mais água. Esse processo é repetido até que a hidratação das partículas da farinha esteja completa. Neste ponto quase toda água livre foi utilizada, a massa está elástica, apresenta resistência às pás do misturador e o desenvolvimento da matriz do glúten se inicia (POMERANZ, 1987).

O açúcar adicionado à formulação do pão em geral na forma de sacarose intensifica a fermentação, contribui para o escurecimento desejável (escurecimento não enzimático), contribui para a estabilidade e a elasticidade da massa e deixa o produto panificado mais adocicado (POMERANZ, 1987).

As gorduras conferem sabor aos produtos panificáveis, deixam a casca mais fina e sedosa e em pequenas quantidades (até 3% sobre o peso da farinha) aumentam volume e retenção de frescor no pão (POMERANZ, 1987). As gorduras também atuam como principal lubrificante da massa e como enriquecimento calórico. A gordura é adicionada na forma de óleo vegetal (soja, milho, amendoim, etc.), gordura animal (manteiga, banha), ou gordura hidrogenada, com ou sem emulsificantes, em variados pontos de fusão e plasticidade (ESTELLER, 2004). Os autores Carr, Daniels e Frazier (1992) também demonstraram que lipídios livres polares são benéficos para panificação, especificamente para o volume dos pães.

O sal é adicionado (aproximadamente 1,5% do peso da farinha) para efeito de sabor e para melhorar a estrutura da massa. O sal diminui a absorção da água e intumescimento das proteínas da farinha, reduz a extensibilidade da massa e melhora a retenção de gás (POMERANZ, 1987). O sal também interage na formação da rede de glúten e controla a fermentação devido ao efeito osmótico na célula da levedura, porém a sua função mais importante é a de conferir sabor (MATUDA, 2004).

## A mistura da massa

A massa é um sistema complexo, geralmente consistindo de uma matriz hidratada de glúten envolvida com partículas de amido. Não apenas as proteínas hidratadas se agregam, mas também a matriz do glúten e as interações amido-proteína aumentam as propriedades visco-elásticas, sendo

que todas estas interações afetam a reologia. As proteínas do glúten interagem através de pontes dissulfeto, interações intra-moleculares, pontes de hidrogênio, e interações hidrofóbicas formando uma grande matriz contínua.

Para a massa ser fermentada, o glúten precisa estar relaxado, ou seja, as ligações dissulfídicas precisam ser rompidas. A energia mecânica aplicada à massa durante a mistura rompe essas ligações (OKADA; NEGHISHI; NAGAO, 1987; NICOLAS; POTUS, 1994; MOREL *et al.*, 2002), resultando no desenrolamento do glúten (DONG; HOSENEY, 1995) e aumento da proporção de lipídios livres (NICOLAS; POTUS, 1994). Os grupos sulfidril (SH) são formados após o rompimento das ligações dissulfeto, e a massa se torna apta para crescer. Para manter esta nova “estrutura” expandida, as reações são revertidas, grupos sulfidril são oxidados e novas pontes dissulfeto são formadas com novos pares (Figura 8). Isso demonstra como grupos SH apresentam um papel importante na reologia da massa (OKADA; NEGHISHI; NAGAO, 1987). Esta reação de oxidação fortalece essa nova “estrutura” (TIECKELMANN; STEELE, 1991). Por esta razão, a manipulação excessiva normalmente resulta em uma massa pegajosa. Por outro lado, em massas insuficientemente batidas, o amido e a proteína ficam distribuídos desigualmente (AUTIO; LAURIKAINEN, 1997; TRONSMO *et al.*, 2003).

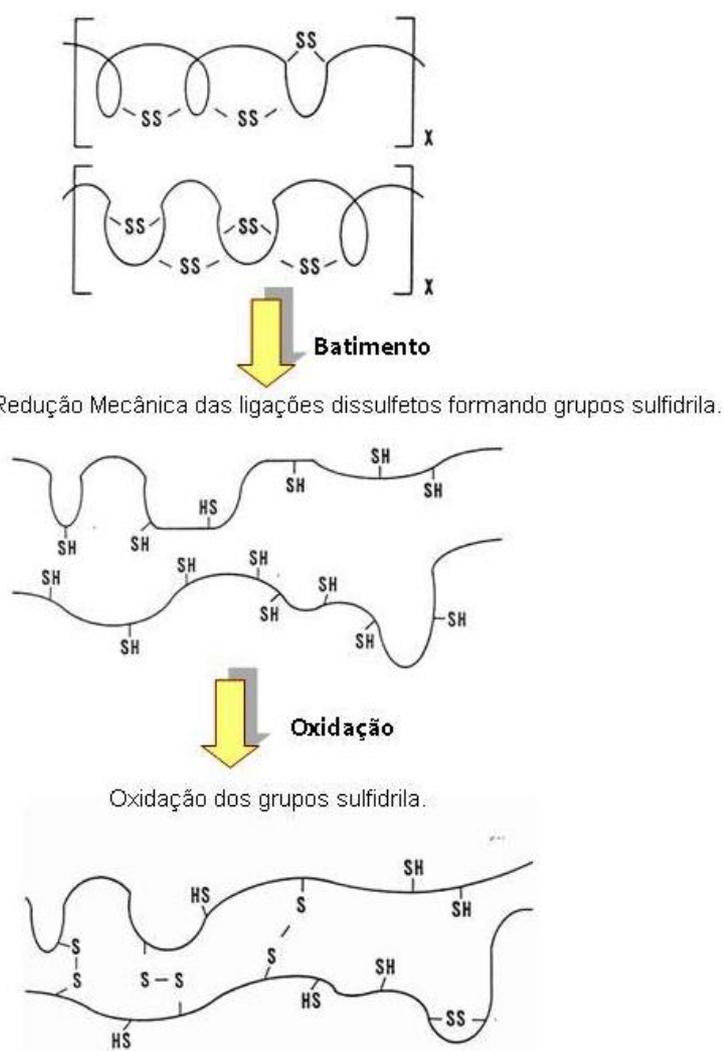


Figura 8. Estrutura proposta das moléculas do glúten.

Fonte: Tieckelmann; Steele (1991) [adaptado].

## Métodos reológicos

Os métodos reológicos empíricos, que usam grandes deformações, geralmente oferecem boas correlações com a qualidade de panificação (TRONSMO *et al.*, 2003). Os métodos baseados em extensão biaxial, como os alveográficos, podem ser considerados os mais apropriados para medir as propriedades reológicas da massa sendo que a maior vantagem desses testes é que a deformação assemelha-se bastante às condições práticas que ocorrem na parede celular ao redor das células de gás em expansão dentro da massa, (DOBRASZCZYK; MORGENSTERN, 2003). Durante a fermentação e

forneamento, o crescimento das bolhas de gás determina a expansão da massa e conseqüentemente a textura e volume final do produto panificado (HE; HOSENEY, 1991).

## 2.4 Aditivos

Numa padaria no Brasil há alguns anos atrás, um padeiro poderia ajustar o tempo da fermentação e da mistura, do forneamento, condições do forno e fazer ajustes frente às variações das propriedades da farinha, do fermento e da temperatura ambiente. Hoje, este alto grau de flexibilidade não é mais disponível, ou é possível a um alto custo e variabilidade de qualidade inaceitável, já que a mecanização, produção em grande escala e a crescente demanda do consumidor por alta qualidade, conveniência e tempo de prateleira (shelf-life) mais longo criaram a necessidade de estabilizar e trazer uniformidade aos produtos panificados. A utilização de aditivos tais como emulsificantes, oxidantes e enzimas satisfaz a estes propósitos. Para a indústria, a otimização das propriedades da massa e o aperfeiçoamento da qualidade do produto acabado são de grande interesse. Para o consumidor, o apelo sensorial do produto acabado é o atributo mais importante. Após a panificação, o frescor do pão reduz-se rapidamente devido à retrogradação do amido gerando perdas significativas à indústria de panificação: 8 a 10% da produção de pães são invendáveis devido à retrogradação do amido (STAUFFER, 1990; STAMPFLI; NERSTEN, 1994).

Em 2005 o Brasil importou US\$ 20,3 milhões em ácido ascórbico e US\$ 27,1 milhões em enzimas para serem utilizadas como aditivos funcionais na panificação (BRASIL, 2005).

## Oxidantes

Até a metade do século XX, os padeiros preferiam utilizar farinha que tivesse permanecido estocada a usar a farinha recentemente moída. Haviam aprendido pela prática que a farinha podia sofrer maturação, isto é, oxidação pelo oxigênio do ar durante a estocagem. Esta farinha maturada não produziria massas difíceis de manusear, ao contrário, produziria uma massa mais maleável e pães com maior volume (GUTKOVSKI *et al.*, 1997). Esta teoria foi comprovada por Ewart (1988) que determinou a redução de resíduos SH em farinhas de trigo estocadas durante 6 meses, e reportou que este processo também foi observado em farinhas estocadas por até 6 anos.

Atualmente é impraticável manter a farinha estocada por um tempo suficiente para que ocorra a maturação natural (envelhecimento). Devido à grande capacidade de moagem dos moinhos modernos e para evitar despesas no armazenamento, a farinha é expedida dos moinhos para as panificadoras um dia após sua produção e frequentemente, em menos de uma semana, é iniciada sua utilização. Nas padarias e panificadoras, nem sempre é possível e conveniente a manutenção de grandes espaços para armazenamento de farinhas e usualmente os estoques não são mantidos por grande período de tempo.

Estes fatores foram decisivos à introdução dos melhoradores de farinha que proporcionam os mesmos efeitos obtidos através da maturação natural num tempo muito menor (GUTKOVSKI *et al.*, 1997), sendo prática comum a adição de oxidantes a maioria das fórmulas de pães fermentados (KERR *et al.*, 1992).

O uso de compostos oxidantes na panificação confere as seguintes vantagens:

- aceleração do processo de maturação da farinha: a mudança nas propriedades reológicas e sensoriais da farinha recentemente moída proporcionando às mesmas características de produção obtidas através da maturação natural;

- branqueamento: a redução da cor amarelo-pálida promovida pelos pigmentos carotenóides presentes naturalmente na farinha;
- o fortalecimento da matriz do glúten necessário para suportar o estresse dos sistemas de manuseio mecânicos de alta velocidade e para conferir melhor volume final ao pão.

De um total de 34 possíveis compostos oxidantes listados por Jørgensen em 1945, 11 são comumente utilizados na indústria (STAUFFER, 1990), sendo que a formação de ligações dissulfídicas entre as subunidades das proteínas do glúten promovendo o fortalecimento da massa é o principal mecanismo de funcionamento desses compostos (KAUFMAN; FENNEMA, 1987; DONG; HOSENEY, 1995).

### Peróxido de benzoíla

O peróxido de benzoíla (PBZ) tem sido usado para branquear farinhas de trigo por mais de 75 anos e é adicionado na forma de uma pré-mistura diluída contendo 32% de princípio ativo (AMERICAN INGREDIENTS, 1998). Trata-se do mais comum dos agentes branqueadores de farinha, sendo permitido somente em alguns países, como por exemplo, o Brasil. O PBZ produz a oxidação de carotenóides por um mecanismo típico de radicais livres, rompendo o sistema de ligações duplas conjugadas e segundo Saiz, Manrique e Fritz (2001), exibe sua ação de descoloração ou branqueamento sem influenciar as propriedades de panificação (Figura 9).

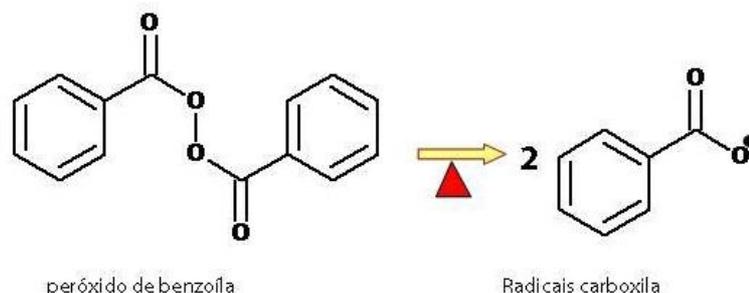


Figura 9. Clivagem do peróxido de benzoíla.

Fonte: Wade (1995) [adaptado].

O PBZ é extremamente reativo e se degrada a baixas temperaturas (<40 °C) por causa da instabilidade da ligação  $O_2^-$  com uma energia de ligação de aproximadamente 30 kcal/mol. A degradação do PBZ forma radicais derivados do benzoato, na fase de iniciação (Figura 9). Esses radicais propagam a reação reagindo ou com o PBZ ou com o solvente para formar radicais do solvente e mais radicais de benzoato (CHELLQUIST; GORMAN, 1992). Na panificação, o PBZ é amplamente utilizado pela sua eficácia na degradação de carotenóides, sob reduzida atividade de água.

## Ácido ascórbico

O ácido ascórbico tem sido extensivamente utilizado na indústria alimentícia como antioxidante em uma grande variedade de produtos (LARSON, 1997a). Em 1935, Jørgensen observou que 20 a 30 mg de *L-treo*-ácido ascórbico (AA)/kg de farinha de trigo, causavam um aumento pronunciado na força da massa com conseqüente aumento no volume do pão. Atualmente, o ácido ascórbico é um dos ingredientes mais utilizados na formulação de misturas aditivas melhoradoras para a indústria de panificação (AAMODT; MAGNUS; FÆRGESTAD, 2003).

Os carbonos 2 e 3 do ácido ascórbico possuem um  $pK_a$  de 11,8 e 4,2, respectivamente (Figura 10a) sendo mais estáveis em duas formas tautoméricas (Figura 10b e c). O ácido desidroascórbico é formado pela oxidação reversível do ácido ascórbico, podendo existir na forma hidratada (Figura 10d) antes de liberar água atingindo sua forma final (Figura 10e). O mecanismo de ação proposto por Grosch em 1999 foi posteriormente confirmado por Koehler (2003). Na fase inicial de mistura, o ácido ascórbico é rapidamente oxidado para o ácido desidroascórbico auxiliado pela enzima ascorbato oxidase (AAO) passando pelo intermediário monoânion íon ascorbato (Figura 7) (FRIMER; GILINSKY-SHARON, 1995; WIRSTA, 2003).

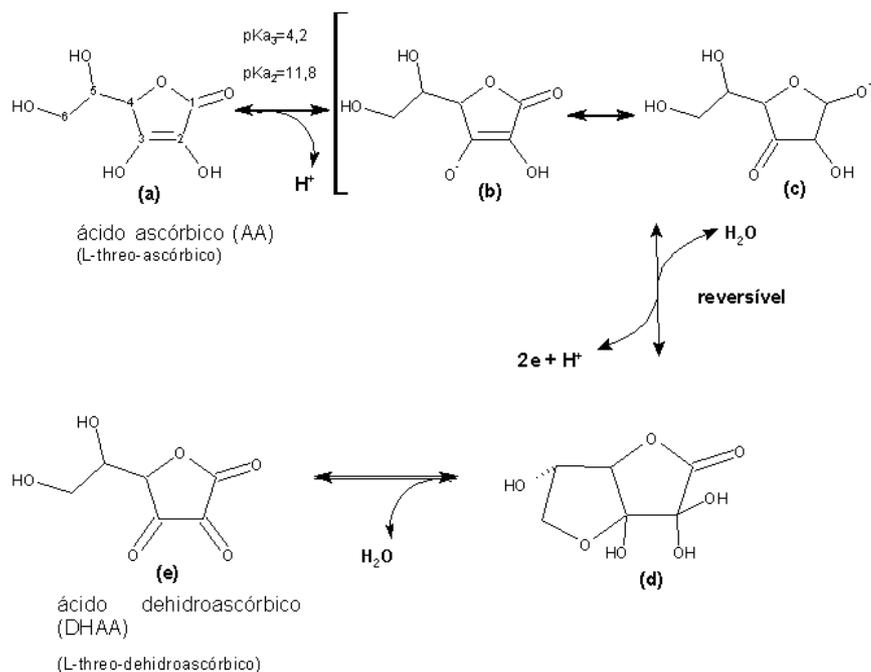


Figura 10. Natureza química do ácido ascórbico e do ácido desidroascórbico.

Fonte: Wirsta *et al.* (2003) [adaptado].

O ácido desidroascórbico, por sua vez, oxida a GSH endógena para a sua forma oxidada, a GSSG (Figura 7). A GSH oxida as proteínas do glúten (PSSP) que tem suas ligações dissulfetos rompidas formando dissulfetos proteína-glutationa (PSSG).

No entanto, a oxidação do GSH pelo ácido desidroascórbico ocorre com maior velocidade inibindo a redução do PSSP pela GSH. O fenômeno de redução das proteínas do glúten é conhecido por “despolimerização do glúten”, e é responsável pelo enfraquecimento da massa (GROSCH; WIESER, 1999). O resumo geral das reações descritas pode ser observado na Figura 11.

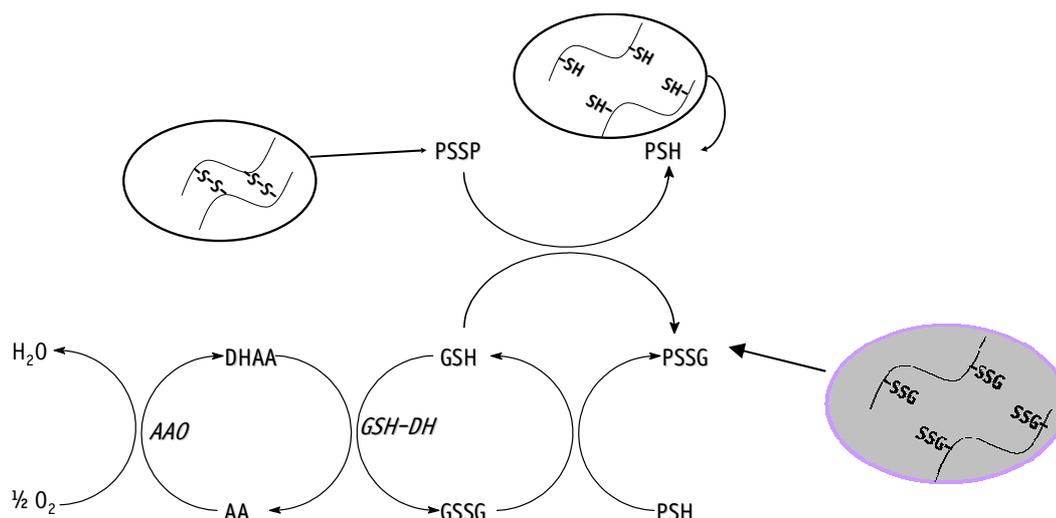


Figura 11. Reações propostas para explicar o efeito melhorador do ácido ascórbico de acordo com a hipótese de Grosch.

AA= ácido ascórbico; DHAA= ácido desidroascórbico; AAO= ácido ascórbico oxidase; GSH= glutationa reduzida; GSSG= glutationa oxidada; GSH-DH= glutationa desidrogenase; PSH= proteína do glúten reduzida; PSSG= proteína ligada a glutationa; PSSP= proteína do glúten.

Fonte: Chen; Schofield (1995); Grosch; Wieser (1999); Koehler (2003a); Koehler (2003b) [adaptado].

## Lipoxigenase

As lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidoreduases; EC 1.13.11.12) constituem uma família heterogênea de enzimas de peroxidação lipídica amplamente distribuídas em plantas e no reino animal, além de também serem encontradas em organismos marinhos inferiores como algas, ouriços, estrelas-do-mar, conchas e corais (KUHN; BORCHERT, 2002).

As lipoxigenases (LOX) são proteínas longas, de cadeia simples com peso molecular até 103 kDa com comprimento variando de 923 a 661 resíduos (PRIGGE *et al.*, 1997) contendo um único átomo de ferro não-heme por mol. São categorizadas como tipo 1 ou tipo 2, dependendo do seu substrato e especificidade dos produtos assim como o seu pH ótimo. A lipoxigenase tipo-1 (incluindo a LOX1 da soja) tem sua atividade ótima no pH 9 e lipoxigenase tipo-2 (incluindo a LOX2 e LOX3 da soja) tem geralmente seu pH ótimo mais ácido (pH 5-7) sendo menos específicas para seus substratos e produtos (SERPEN; GÖKMEN, 2006)

As LOX formam derivados hidroperóxidos catalisando a dioxigenação de ácidos graxos poliênicos contendo o sistema *cis,cis*-1,4-pentadieno, como por exemplo o ácido linoléico (LA),  $\alpha$ -linolênico ou araquidônico. Considerando que o ácido araquidônico é apenas um ácido graxo polinsaturado (PUFA) secundário no reino vegetal, as LOXs das plantas são classificadas com respeito a sua especificidade quanto à posição da oxigenação do LA, que ocorre no carbono 9 ou no carbono 13 formando dois grupos de hidroperóxidos: 9-HPOD (ácido 9-hidroperóxi-10,12-octadecadienóico) e 13-HPOD (ácido 13-hidroperóxi-9,11-octadecadienóico) conforme demonstrado na Figura 12 (FAUBION; HOSENEY, 1981; NELSON, 1996). Um estudo recente de Coffa *et al.* (2005) demonstrou que uma mutação no resíduo Ala<sup>542</sup> para Gly no sítio ativo do íon de Ferro na molécula da LOX é responsável pela alteração da proporção dos produtos 9-HPOD e 13-HPOD (Figura 13).

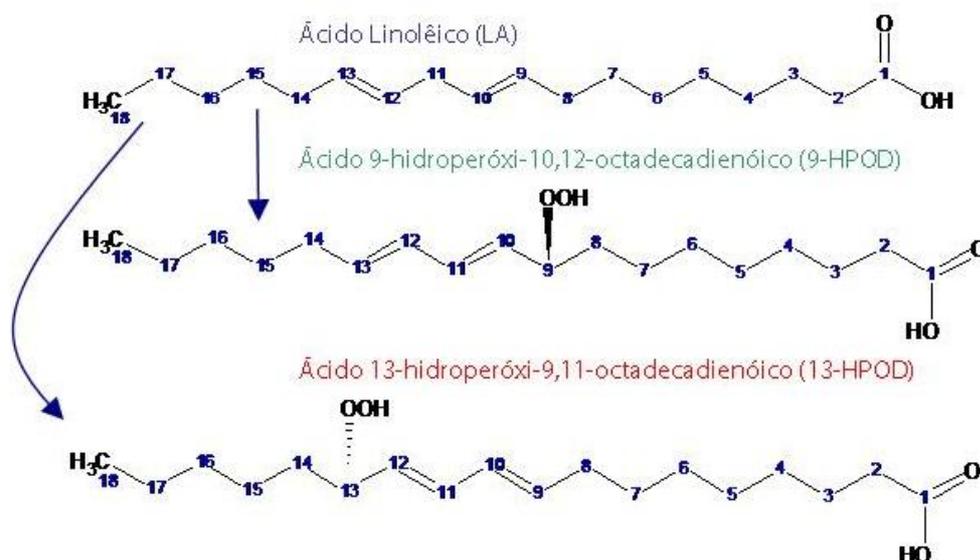
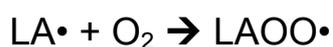


Figura 12. Produtos da LOX e especificidade posicional a partir da oxidação do ácido linoléico. Fonte: Whitaker (1991); Iacazio; Martini-Iacazio (2000) e Frankel (2005) [adaptado].

Estas duas classes de produtos da LOX derivados dos PUFA (9-HPOD) e (13-HPOD) são consideradas de importância central para a produção de uma grande diversidade de oxilipinas encontradas nas plantas ligadas às estratégias de defesa e mecanismos de resistência da planta (FEUSSNER; WASTERACK, 2002).

A oxigenação de PUFA's pode ocorrer por via enzimática e não-enzimática. Ambas as reações levam à formação de ácidos graxos peroxidados, mas há diferenças importantes entre os dois processos. A peroxidação lipídica não-enzimática forma uma mistura de produtos não-específica consistindo de diversos isômeros óticos e posicionais. Na reação com a LOX, ácidos graxos poliênicos são geralmente oxigenados a um isômero específico (FEUSSNER; KUHN, 2000).

A oxidação enzimática de componentes celulares lipofílicos é um princípio universal no metabolismo dos organismos vivos e uma variedade de sistemas enzimáticos foi criada com esse propósito. Dentre estes sistemas, as lipoxigenases são únicas porque catalisam a dioxigenação específica de ácidos graxos poliênicos usando oxigênio atmosférico como segundo substrato. Em contraste com monoxigenases lipídicas, LOXs introduzem oxigênio molecular, formando hidroperóxidos de ácidos graxos. Alternativamente, a formação de peróxidos lipídicos pode ser induzida por radicais livres formados como intermediários da reação de outros mecanismos metabólicos oxidativos, como por exemplo:



Fonte: Frankel (2005) [adaptado]. LAH representa a molécula de ácido linoleico, R•, o composto radical, LAOO•, o peróxido e LAOOH, o hidroperóxido.

Neste caso, a peroxidação lipídica pode ser considerada como um efeito secundário menor e múltiplos sistemas protetores (antioxidantes) são disponíveis para neutralizá-la. Em contraste, as LOXs são especificamente desenhadas para catalisar peroxidação lipídica e muitas defesas antioxidativas que ocorrem naturalmente são ineficientes em regular essa reação (KUHN; BORCHERT, 2002).

Os aspectos essenciais da atual hipótese do mecanismo de catálise são mostrados na

Figura 14: A enzima na sua forma inativa apresenta o ferro no estado oxidativo ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e necessita de ativação para iniciar o ciclo catalítico.

Essa ativação pode ser realizada com pequenas quantidades de hidroperóxidos. Estes peróxidos oxidam o estado ferroso inativo basal (*ground state*) da enzima para uma forma ativa férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (SCHILSTRA; VELDINK; VLIEGENTHART, 1994; JONES *et al.*, 1996).

Esta reação é bastante conhecida por ser também descrita como a “Reação de Fenton”, um exemplo clássico de reações de radicais livres catalisadas por metais de transição (LARSON, 1997b, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c; SPITELLER, 2005).



Coffa *et al.* (2005) demonstraram que a forma da ligação da enzima com o substrato se dá pela entrada do substrato (ácido linoléico) no sítio ativo da LOX através do canal aberto pelos movimentos das cadeias laterais dos resíduos Thr<sup>259</sup> e Leu<sup>541</sup> (Figura 13).

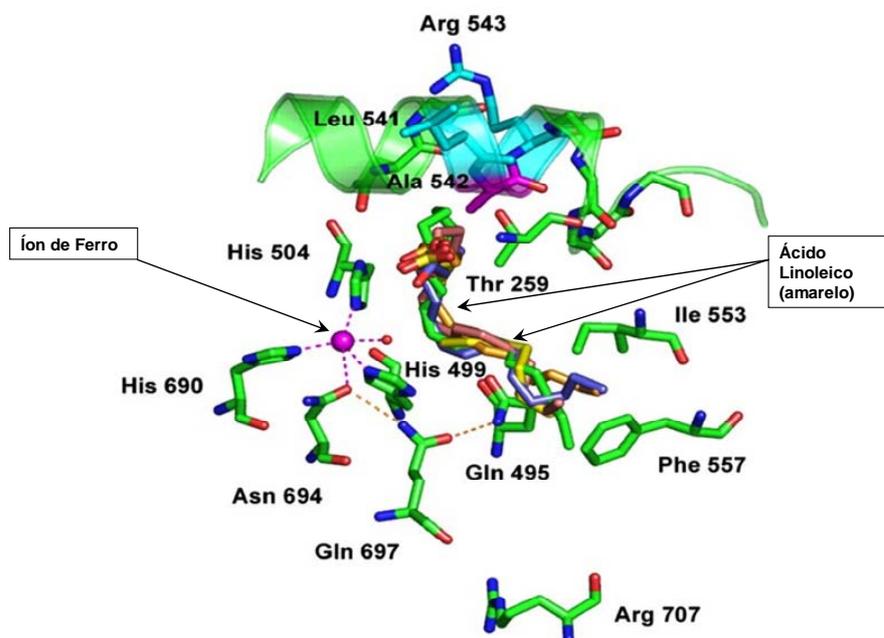


Figura 13. Modelo do ácido linoléico na estrutura do sítio do ferro na LOX.

Fonte: Coffa *et al.* (2005) [adaptado].

Após a ligação com o substrato, a LOX catalisa uma abstração estereoespecífica de um átomo de hidrogênio da posição 3 do sistema 1,4 penta-dieno do ácido graxo (LA) resultando na redução do  $\text{Fe}^{3+}$  e a formação de um radical pentadieno potencialmente muito reativo ( $\text{L}\cdot$ ) (Figura 14 - etapa b). Este conjunto de etapas denomina-se o ciclo anaeróbico da LOX. Em condições aeróbicas, oxigênio molecular reage com o radical alquila ( $\text{L}\cdot$ ) para formar um radical peroxila ( $\text{LOO}\cdot$ ) (Figura 14 - etapa c). Subsequentemente, o  $\text{Fe}^{2+}$  será oxidado para  $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 14 - etapa d) e o hidroperóxido será formado, que depois de protonado, se dissocia do  $\text{Fe}^{3+}$ -LOX cataliticamente ativo. Isso conclui o ciclo catalítico e a próxima molécula do substrato pode se ligar (JONES 1996; FEUSSNER; KUHN, 2000; FEUSSNER; WASTERACK, 2002). Estas etapas produzem um sistema 1-*cis*,3-*trans* pentadieno (dienos conjugados) que absorvem fortemente na região ultravioleta, diferente dos sistema 1,4 pentadieno, sendo sua produção base para a determinação da atividade da LOX (FUKUSHIGE *et al.*, 2005).

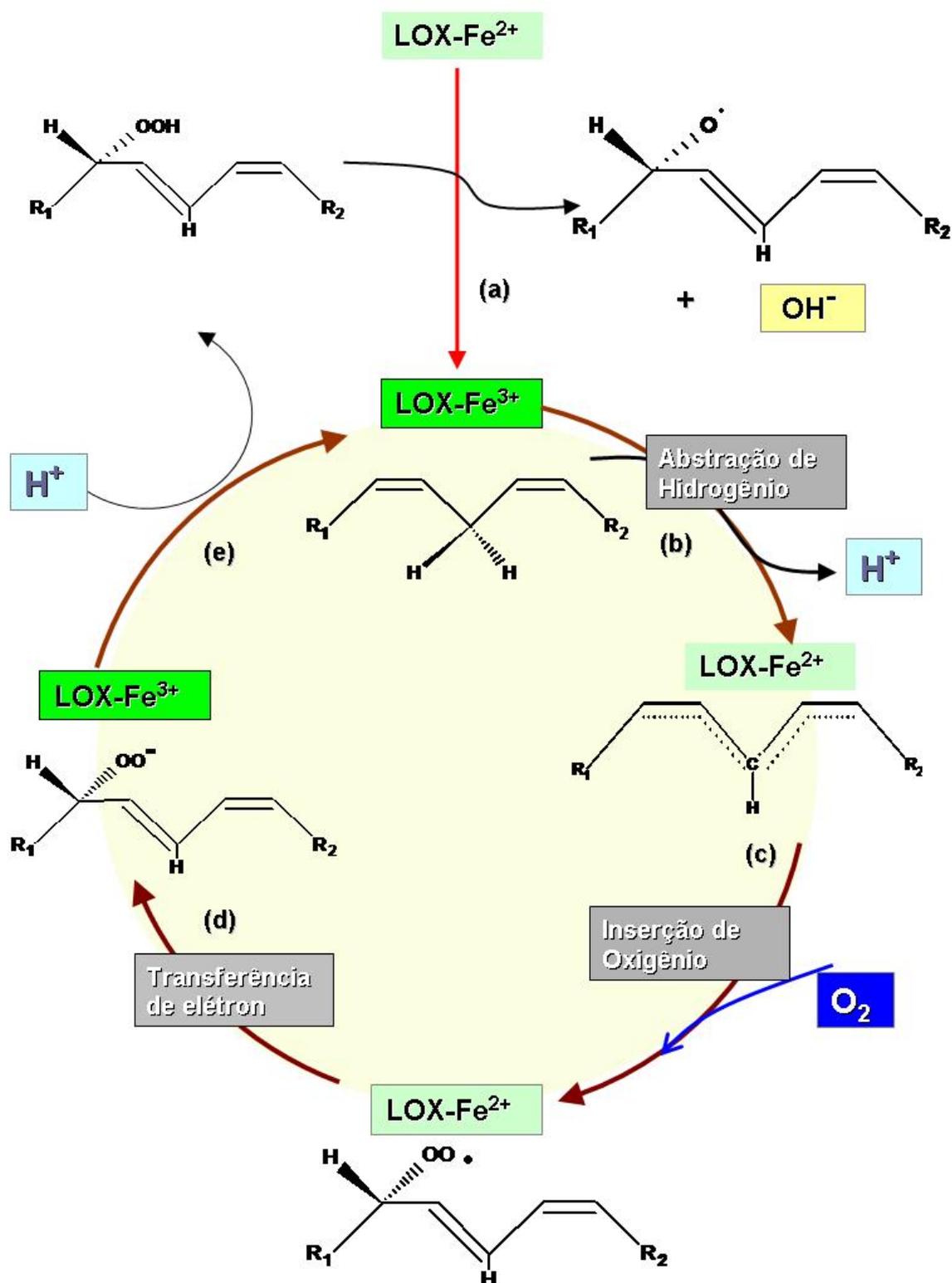


Figura 14. Mecanismo proposto da reação da LOX.

Fonte: Feussner; Kuhn (2000); Kuhn; Borchert (2002); Jones; Russell; Darley-Usmar; Stone; Wilson (1996) [adaptado].

## Mecanismo de oxidação de carotenóides

A habilidade da LOX para branquear ou descolorir diversos pigmentos, tais como clorofila e carotenóides são uma das suas mais conhecidas características (KLEIN *et al.*, 1984). O branqueamento enzimático dos carotenóides por co-oxidação (o processo é chamado de co-oxidação porque a enzima não age diretamente no composto a ser oxidado (CASEY *et al.*, 1999)) com ácidos graxos insaturados foi observado em 1934 (HOSENEY; RAO; FAUBION; SIDHU, 1980) e a perda do pigmento amarelo da luteína em relação à atividade da LOX no trigo *durum* foi investigada em 1950 (MCDONALD, 1979; ADDO *et al.*, 1993; DELCROS *et al.*, 1998; SERPEN; GÖKMEN, 2006b). O branqueamento de carotenóides catalisado pela LOX pode ocorrer em duas etapas: anaeróbica e aeróbica.

Cohen *et al.* (1985) propuseram uma hipótese do esquema de branqueamento de pigmentos durante a fase aeróbica (Figura 15) onde o radical enzima-peroxila ( $\text{LOX-Fe}^{2+}\cdots\text{LOO}\cdot$ ) pode oxidar diretamente o pigmento, formando carbonilas e pigmentos branqueados (Figura 15a). Este mesmo radical  $\text{LOX-Fe}^{2+}\cdots\text{LOO}\cdot$  pode também sofrer clivagem homolítica formando enzima-alcoxila ( $\text{LO}\cdot$ ) e um radical enzima-oxigênio ( $\text{LOX-Fe}^{2+}\cdots\text{O}\cdot$ ), oxidando indiretamente os pigmentos.

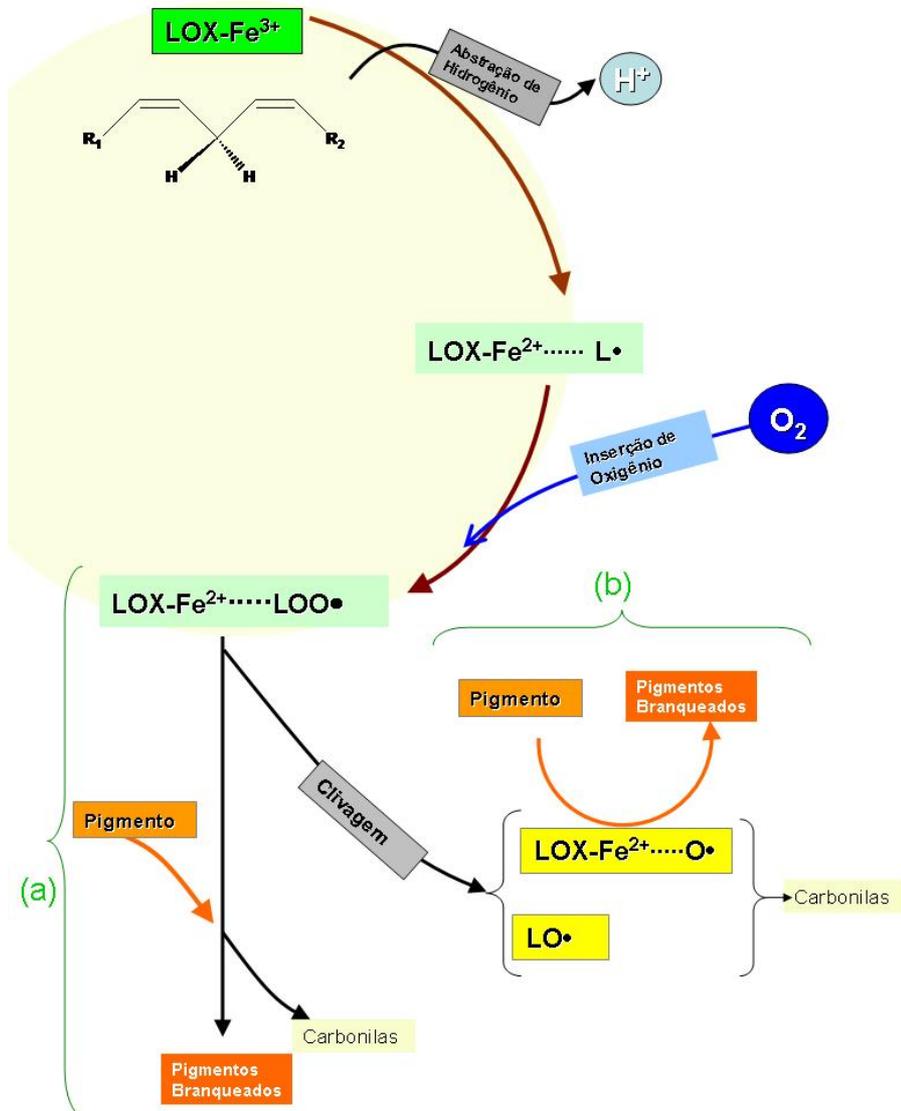


Figura 15. Mecanismo proposto para o branqueamento aeróbico de pigmentos carotenóides.

Fonte: Cohen *et al.* (1985) [adaptado].

No entanto, Klein *et al.* (1984) propuseram que o branqueamento de carotenóides também ocorre, e de forma mais eficiente, durante a fase anaeróbica da reação da LOX (neste caso, LOX1). Dois possíveis sítios de oxidação são propostos (Figura 16): (a) onde radicais alcóxila ( $LO\cdot$ ) são formados a partir da decomposição de hidroperóxidos (Figura 16a) ou (b) onde os carotenóides são oxidados diretamente por radicais livres formados pela

lipoxigenase (Figura 16b). Esta hipótese da via anaeróbica veio a ser posteriormente confirmada por Serpen e Gökmen (2006) que demonstraram a inibição da formação de dienos conjugados pela LOX no ácido linoléico com a adição de crescentes concentrações de  $\beta$ -caroteno.

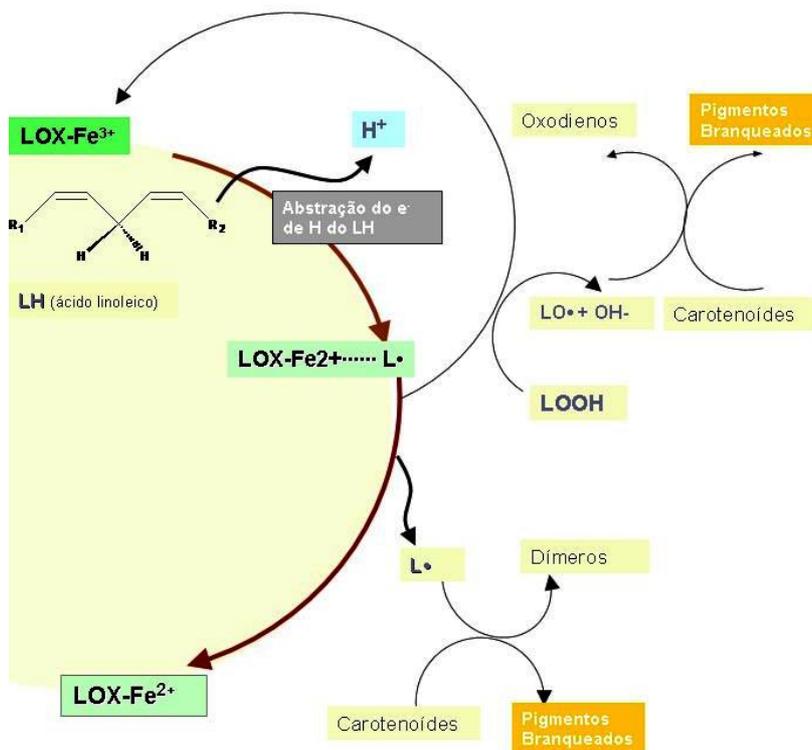


Figura 16. Mecanismo proposto para branqueamento anaeróbico de carotenóides durante a oxidação de ácidos graxos pela Lipoxigenase.

Fonte: Klein *et al.* (1984) [adaptado].

## Mecanismo de fortalecimento da matriz do glúten

Tsen e Hlynka (1962), Faubion e Hoseney (1981) e Nicolas e Potus (1994) demonstraram que a farinha enzimaticamente ativa da soja não apenas branqueia pigmentos da farinha de trigo, mas também oxida ácidos graxos durante o processo da mistura. A peroxidação de lipídios insaturados é o alvo primário, enquanto que o branqueamento dos pigmentos é uma reação secundária e simultânea ocorrendo durante o ataque enzimático ao lipídio na fase aeróbica e anaeróbica. Esta oxidação, principalmente de lipídios livres

(TSEN; HLYNKA, 1962; FRAZIER *et al.*, 1977), promove a alteração de propriedades reológicas da massa tal como o aumento do tempo de tolerância à mistura, resultando em um aumento no volume do pão (FRAZIER *et al.*, 1977; CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992; ADDO *et al.*, 1993; ARAÚJO; CIACCO; CAMARGO, 1995; DELCROS *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 2000).

De acordo com Dong e Hosney (1995), a premissa principal tem sido que os grupamentos sulfidril da massa panificável são potencialmente capazes de submeter-se a uma reação de troca dissulfeto-sulfidril, envolvendo a cisão e reformulação de pontes dissulfeto mediada pelos grupos sulfidril na farinha de trigo. Ou seja, pontes dissulfeto (S-S) do glúten são quebradas durante a mistura da massa criando radicais tiol (-S) (OKADA; NEGISHI; NAGAO, 1987). Desta forma, as propriedades reológicas da massa e sua matriz tri-dimensional são dependentes do arranjo e do número de pontes dissulfeto e grupos sulfidril da proteína. A contribuição vital das pontes dissulfeto à estabilidade da massa foi demonstrada em estudos reológicos pela adição de compostos bloqueadores de sulfidril (DONG; HOSENEY, 1995).

A farinha enzimaticamente ativa de soja altera consideravelmente as propriedades reológicas de massas panificáveis (FRAZIER *et al.*, 1973). A perda de grupos sulfidril (-SH) é uma evidência de que a melhora causada pela farinha de soja enzimaticamente ativa é devida à oxidação desses grupos durante a formação da rede de glúten (TSEN; HLYNKA, 1962; FRAZIER *et al.*, 1977; HOSENEY; RAO; FAUBION; SIDHU, 1980; ADDO *et al.*, 1993; DELCROS *et al.*, 1998).

Carr, Daniels e Frazier (1992) relataram também que a presença de farinha ativa de soja durante o batimento da massa promoveu uma substancial liberação de lipídios ligados. A formação de produtos intermediários da oxidação lipídica, causada pela ação da lipoxigenase, altera a conformação, através da inversão da micela lipoprotéica (glúten ligado a lipídios por forças hidrofóbicas). Esta mudança causa a subsequente liberação de lipídios ligados, que por sua vez, promovem a melhora na reologia da massa. De acordo com Frazier (2006), este mecanismo também pode expor resíduos sulfidril adicionais que podem ser oxidados por compostos radicais gerados pela oxidação lipídica, causando a formação de mais pontes dissulfeto.

## A lipoxigenase e a soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) contém pelo menos 8 tipos de LOXs, sendo que três são expressas principalmente nas sementes (LOX1, 2 e 3). As outras cinco estão presentes em diferentes tecidos vegetativos (DUBBS; GRIMES, 2000; CASEY *et al.*, 1999), sendo que algumas delas agem como proteínas de armazenamento. A maioria das LOX de nosso conhecimento na enzimologia e biologia estrutural se origina da fração 1 da soja descoberta há 70 anos (KUHN; BORCHERT, 2002), sendo que a soja é a fonte mais rica e conhecida de LOX (FAUBION; HOSENEY, 1981; RUTH; ROOZEN; MOEST, 1992).

Existe ampla evidência de que as lipoxigenases são elementos cruciais nas estratégias de defesa da planta. O mecanismo de resistência é ainda tema de estudos, mas a lipoxigenase é claramente parte essencial. Muitas plantas respondem à injúria por insetos ou às lesões pela produção de jasmonatos. Experimentos que causaram inibições da atividade da lipoxigenase em folhas de batatas eliminaram a produção de jasmonatos, aumentando a suscetibilidade da planta ao ataque de insetos (CASEY *et al.*, 1999). Esta conhecida função fisiológica da LOX consiste na formação de ácido jasmônico, uma substância de regulação do crescimento, e fito-hormônios relacionados. Vários estudos sustentam o papel deste composto como uma “chave geral” no desenvolvimento e adaptação da planta ao estresse, sendo que leguminosas têm grande quantidade de LOX nas sementes e tecidos vegetativos (FEUSSNER; WASTERNAK, 2002).

Na semente da soja três isoformas distintas de LOX foram descritas com base nas diferenças de pH ótimo, especificidade de substrato e produtos formados. A LOX1 tem um pH ótimo de 9,0 e ponto isoelétrico (pI) igual a 5,65; LOX2 tem um pH ótimo de 6,1 e pI de 6,25 e a LOX3 tem um pH ótimo de 6,5 com pI de 6,15. Para efeito de comparação, a faixa de pH da massa do pão após o batimento é entre 5,3 e 5,5. Após a fermentação a faixa situa-se entre 4,5 e 4,7 (PYLER, 1998). O ácido araquidônico é o substrato preferido pela LOX2, apesar de não ser um constituinte comum de ácidos graxos em plantas. No entanto, LOX1 e LOX2 são mais ativas com o ácido linoléico (C<sub>18:2</sub>). Com relação aos produtos formados, usando o C<sub>18:2</sub> como substrato, foi observado

que LOX1 forma em maiores quantidades o 13—hidroperóxido (13-HPOD) do que 9-HPOD, numa proporção de 95:05. A LOX2 gerou 80% de seus hidroperóxidos na forma de 13-HPOD e 20% na forma de 9-HPOD (alguns autores relatam 50:50 para esta isoforma) e a LOX3 gerou 40% de 13-HPOD e 60% de 9-HPOD (KLAJN, 1991; FUKUSHIGE *et al.*, 2005). Na semente de soja madura, a LOX3 é a mais abundante das isoenzimas em base protéica. A LOX1 é também abundante representando aproximadamente 1% da proteína da semente enquanto LOX2 corresponde a aproximadamente 0,1 a 1% (HILDEBRAND, 1996).

Um dos efeitos principais da LOX na qualidade dos alimentos se dá através da formação de compostos voláteis de aroma e sabor. O aumento da LOX na massa panificável pode promover a melhora de diversas características reológicas e vida-de-prateleira, mas pode afetar adversamente o sabor, causando o conhecido *beany flavour* (sabor amargo de grão). Apesar de 74 compostos voláteis terem sido identificados durante a autooxidação do ácido linoléico (GROSCH, 1987), os principais compostos associados ao *beany flavour* são: hexanal, Z-3-hexenal e hexanol, sendo que o hexanal é o composto volátil mais abundante e está associado à LOX-2 (ADDO *et al.*, 1993; DELCROS *et al.*, 1998). A melhora na qualidade reológica em panificação e a oxidação de carotenóides estão associadas à LOX1 (KLEIN *et al.*, 1984; CUMBEE; HILDEBRAND; ADDO, 1997; SERPEN; GÓKMEN, 2006).

O trigo também contém LOX, mas em menor quantidade em comparação com a soja. A principal diferença é que a LOX do trigo só oxida ácidos graxos livres e monoglicerídeos, enquanto a LOX da soja oxida todos os principais lipídios da farinha que contenham ácido linoléico e linolênico (MORRISON; PANPAPRAI, 1975; CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992).

## 2.5 A metodologia de superfície de resposta

A modelagem de regressões é a técnica estatística que permite ajustar equações polinomiais à variação expressa por uma variável dependente ( $y_i$ ) em função de alterações impostas às variáveis independentes ou fatores ( $x_i$ ).

Desta forma, é possível estimar o valor de uma resposta em função de valores assumidos pelos fatores ( $x_i$ ), dentro da faixa experimental estabelecida para a realização dos ensaios. O modelo estatístico descreve as respostas em termos dos efeitos por unidade de variação dos fatores:

$$y(x_i) = n(x_i) + \epsilon(x_i),$$

Onde  $\epsilon(x_i)$  representa o erro aleatório com que as respostas flutuam em torno da média definida pelos valores  $x_i$  (BARROS NETO et al., 2001). A partir de um modelo bem ajustado aos dados experimentais, é possível estimar o valor da resposta de acordo com as variações dos fatores com excelente nível de confiança, e otimizar o modelo buscando a combinação de fatores que resulte na máxima desejabilidade para a resposta de interesse.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) representa a associação dessas técnicas estatísticas para ajuste de modelos aos planejamentos fatoriais, permitindo que além do efeito linear de cada fator na variação da resposta também sejam incluídos os efeitos não lineares e as interações. Essa técnica, introduzida na década de cinquenta por G. Box (BOX; WILSON, 1951) permite que através de um número reduzido de ensaios experimentais, modelos polinomiais possam ser ajustados com objetivo de descrever reações bioquímicas que estejam ocorrendo, por exemplo, dentro de um sistema complexo como uma matriz alimentícia. A resposta pode ser apresentada graficamente através da construção de superfícies apoiadas em três eixos ( $y_{ij}$ ,  $x_i$  e  $x_j$ ) ou através de curvas de contorno onde as superfícies são projetadas no plano bidimensional, fixando-se o valor das outras variáveis independentes. A visualização das curvas contempla todas as infinitas combinações possíveis entre os fatores ( $x_i$ ) que resultem na mesma isoresposta ( $y_i$ ). Planejamentos experimentais baseados nas técnicas de MSR são muito mais eficientes que procedimentos empíricos na busca do entendimento de como variações conjuntas nos fatores selecionados alteram reações bioquímicas de interesse no alimento.

### 3. OBJETIVOS [PARTE 1]

#### Objetivos gerais

O objeto deste estudo foi de investigar a interação entre a lipoxigenase da soja, o ácido ascórbico e o peróxido de benzoíla, utilizando-se técnicas estatísticas que permitam a modelagem dessas reações e a futura otimização das propriedades de interesse.

#### Objetivos específicos

1. Modelar o efeito combinado dos três oxidantes nas características de cor da farinha, reologia da massa, reologia, cor e aspectos sensoriais dos pães;
2. Otimizar as regressões significativas buscando maximizar as propriedades de interesse na farinha, na massa e nos pães;
3. Validar as regressões através da avaliação da proporção otimizada dos oxidantes;
4. Buscar hipóteses que justifiquem as interações observadas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS [PARTE I]

*“A theory is something nobody believes, except the person who made it. An experiment is something everybody believes, except the person who made it.”*  
Albert Einstein (1879-1955).

### 4.1 Material

Foi utilizada farinha de trigo nacional sem aditivos e recém-moída do tipo comum marca Soberana fornecida pela empresa Lapa Alimentos S.A. (Salvador, Brasil). Ferro quelato (Ferrochel Lote 231481) adquirido da Albitech Coml. Dist. Suplementos Minerais Ltda., ácido fólico (Merck & Co. Inc), ácido ascórbico (Cargill Food Ingredients Latin America), peróxido de benzoíla (La Lux 1, a 32%, Granotec do Brasil), maltodextrina (MorRex-1920, Corn Products Brasil), farinha de soja integral ativa não submetida a tratamento térmico (Multsoy Ind. e Com. Ltda.) e farinha de soja inativa obtida da moagem de soja grão sem lipoxigenase (não-transgênica) variedade UFV-TN105 fornecida pela COOPADAP (São Gotardo, MG) foram utilizadas no preparo das misturas avaliadas neste estudo.

### 4.2 Delineamento experimental das massas

A Figura 17 apresenta o delineamento experimental “centróide-simplex” proposto para este estudo, considerando-se uma mistura com 3 variáveis, onde  $x_1$  = farinha integral de soja ativa (FIS),  $x_2$  = peróxido de benzoíla (PBZ) e  $x_3$  = ácido ascórbico (AA), representaram as misturas puras, binárias e terciárias das variáveis. Nas misturas contendo menos que 100% de FIS a diferença foi completada com FIS inativa (CORNELL, 1990).

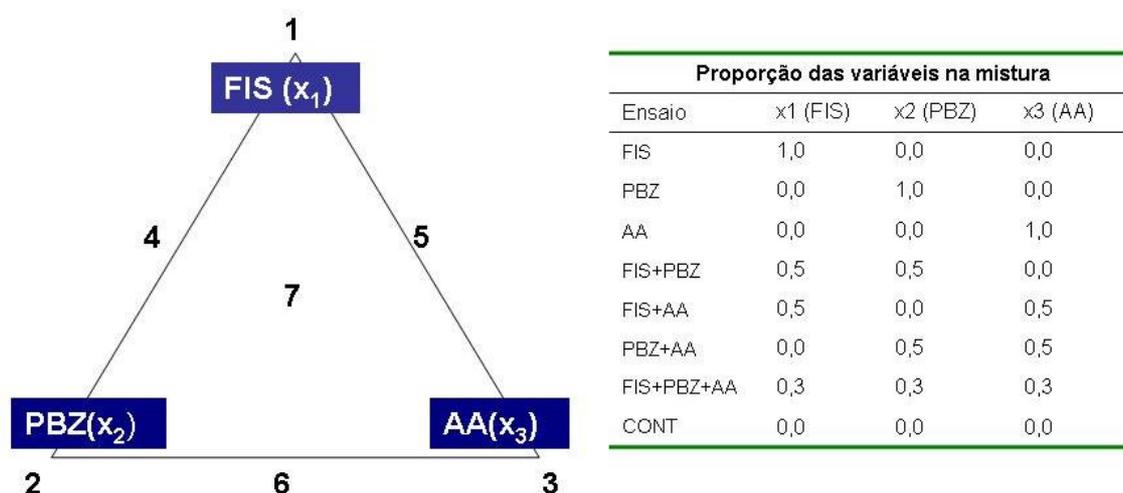


Figura 17. Delineamento experimental “centróide-simplex”

A faixa de variação de cada ingrediente na mistura foi proporcional aos valores máximos permitidos pela legislação:  $x_1$  (FIS) ➔ de 0 a 1 g/100 g em cumprimento à Portaria nº 354, de 18 de julho de 1996;  $x_2$  (PBZ) ➔ de 0 a 0,006 g/100 g em cumprimento à Resolução nº 385, de 5 de agosto de 1999 e  $x_3$  (AA) ➔ de 0 a 0,05 g/100 g em cumprimento à Resolução nº 385, que dispõe sobre o uso de aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções (BRASIL, 1996; BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b). Embora a legislação norte-americana imponha um limite de 0,5 g/100 g para o uso da farinha de soja como agente ‘branqueador’ e 0,02 g/100 g para ácido ascórbico como ‘melhorador’ em farinhas (UNITED STATES, 2003a; UNITED STATES, 2003b), a faixa de variação aplicada a este estudo foi mais ampla em função da menor limitação imposta pela legislação brasileira e pelo fato da metodologia de superfície de resposta possibilitar a otimização sob restrição de fatores. Os ensaios e análises foram executados em até 30 dias da moagem da farinha de trigo.

### 4.3 Delineamento experimental dos pães

Com base nos resultados obtidos com a massa, quatro pães foram formulados com a mesma farinha usada no delineamento anterior (4.2). Pães adicionados com 1 g de farinha ativa de soja/100 g de farinha de trigo (FIS),

0,05 g de ácido ascórbico (AA), 0,5 g de farinha ativa de soja + 0,5g de farinha inativa de soja/100 g de farinha de trigo + 0,025 g de ácido ascórbico (FIS+AA) e CONTROLE (1,0 g de farinha de soja inativa + 0 g de ácido ascórbico) foram preparados de forma aleatória.

#### 4.4 Métodos

##### Preparo das misturas

##### Fortificação da farinha de trigo

A farinha de trigo comum foi adicionada de 4,2 mg de ferro (21 mg de Ferrochel) e 150 µg de ácido fólico (Merck & Co., Inc.) em 100 g, garantindo dessa forma, o aporte desses nutrientes segundo a legislação vigente (BRASIL, 2002), que torna obrigatória a adição de ferro e de ácido fólico nas farinhas de trigo pré-embaladas na ausência do cliente e prontas para oferta ao consumidor, as destinadas ao uso industrial, incluindo as de panificação e as farinhas adicionadas nas pré-misturas, devendo cada 100 g de farinha de trigo e de farinha de milho fornecerem no mínimo 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (BRASIL, 2002).

##### Determinação da composição centesimal

A umidade da farinha de trigo foi determinada através dos métodos AACC (44-15A) (AACC, 2000) em estufa a 130° C, enquanto para farinha de soja foi utilizado o método AOAC (955.04) em estufa a 105 °C. A proteína foi determinada através do método de microKjeldahl, AACC (46-11A) (AACC, 2000) com fator de 5,70 e 6,25 para quantificação da proteína no trigo e na soja, respectivamente. As cinzas da farinha de trigo e de soja foram determinadas pelo método AACC (2000). Os lipídios da farinha de trigo foram extraídos e quantificados pelo método AOAC (940.22), enquanto que os lipídios da farinha de soja foram determinados pelo método AOAC (1995), sendo os carboidratos obtidos por diferença (AACC, 2000; AOAC, 1995). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## Determinação da atividade da lipoxigenase

A atividade da lipoxigenase (fração 1) na farinha integral de soja ativa na farinha inativa e na farinha de trigo foram determinadas de acordo com Axelrod, Cheesbrought e Laakso (1981), com modificações propostas por Oliveira *et al.* (1998). O linoleato de sódio (10 mM) foi utilizado como substrato e preparado com a adição de 156 µL de ácido linoléico 99% (SIGMA L1376-5G, SIGMA, St. Louis, MO, USA) e 180 µL de Tween 20 em 40 mL de água deionizada. Gotas de NaOH 2 N foram adicionadas até a solução ficar translúcida, sendo completada com água destilada fervida e resfriada em balão volumétrico coberto com papel alumínio para o volume de 50 mL .

A solução do substrato foi dividida em porções de 1 mL e transferida para vidros âmbar ventilados com N<sub>2</sub> antes do fechamento. Os vidros foram lacrados e guardados no freezer a -18° C até a sua utilização. 20 mg de amostras (farinhas) foram misturadas com 1,2 mL de tampão de extração (TRIS 60 mM (SIGMA 7-9) , CaCl<sub>2</sub> 15 mM e sacarose 13%, pH 8,2) em recipientes resfriados, transferidos para tubos 'eppendorf' de 1,5 mL e centrifugados em uma micro centrífuga refrigerada Hitachi CF-15R (Hitachi Koki Ltd., Tokyo, Japão) a 13.000 rpm (18178 x g) por 20 min a 4°C. A atividade da LOX1 foi determinada pela adição de 2,5 µL do sobrenadante do extrato centrifugado a 6,0 µL do substrato e 1,0 mL de tampão de borato de sódio 0.1 M (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O; pH 9,5). Após cada adição do extrato, a mistura era rapidamente agitada em uma cubeta de quartzo de volume reduzido e a absorção medida a 234 nm a cada 10 s por 5 min utilizando um módulo de cinética *Shimadzu Program Pack Kinetics* Ver. nr. 1.00 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) ligado a um espectrofotômetro SHIMADZU UV1240 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão). Antes das leituras, o espectrofotômetro tinha seu ponto de absorção "zero" fixado na mistura do tampão borato com o substrato após 5 s de agitação no vortex. Cada unidade de atividade de LOX1 foi medida como sendo um incremento de 0,001 de absorbância no comprimento de onda de 234 nm a cada 1 min a 25 °C quando o substrato fosse o ácido linoléico (SIGMA-ALDRICH, 2005). A atividade da amostra foi determinada após 2 min. A atividade específica foi expressa como unidade/mg de proteína determinada no extrato. O método de Lowry (LOWRY; ROSEBROUGH; FARR; RANDALL;

1951) foi utilizado para quantificar a proteína do extrato durante a determinação de atividade enzimática de acordo com o seguinte procedimento: uma mistura alcalina foi preparada contendo 2 mL de sulfeto cúprico 2%, 2 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio 4%. Carbonato de sódio anidro 2% em NaOH 0,1 N foi adicionado até completar o volume de 100 mL. Três tubos de ensaio para cada amostra foram adicionados com 50 µL da amostra, 950 µL de H<sub>2</sub>O destilada e 2,5 mL da mistura alcalina. As misturas foram agitadas no vortex por 15 segundos, e adicionados de 300 µL de solução Follin Ciocalteau após 5 min de repouso. As soluções foram novamente agitadas, repousadas por 30 min e a absorção medida a 660 nm.

Para os cálculos da dosagem de proteína, foi utilizada uma regressão linear ajustada para uma curva padrão obtida a partir de diferentes alíquotas dissolvidas em 1000 µL de H<sub>2</sub>O de 50 mg de soro albumina bovina (BSA - Sigma A8022) dissolvida em 100 ml de H<sub>2</sub>O. A curva padrão utilizada nos cálculos foi: mg/ml = -0,08 + 0,60 abs, apresentado um coeficiente de correlação de 0,97.

### Determinação do conteúdo de ferro nas farinhas de soja

A concentração de ferro nas amostras de farinha de soja ativa e inativa foi determinada pelo método de Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA), segundo as normas da AOAC (1985).

Uma curva padrão de ferro foi preparada com padrão de Cloreto Férrico 9972 Titrisol - Merck contendo 1000 mg de Fe/L diluído em água deionizada, nas seguintes concentrações: 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 µg Fe/mL. A absorbância das soluções foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica Hitachi Z5000, com lâmpada de cátodo ôco, calibrado nas seguintes condições: região ultra-violeta, comprimento de onda 248,3 nm, fenda 0,2 nm e chama oxidante de ar/acetileno, após digestão das amostras com HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> – [5:1].

## Análise sensorial da cor das farinhas

As misturas de farinhas de trigo preparadas de acordo com o delineamento experimental descrito na Figura 17, acrescido de um ensaio controle, foram sensorialmente avaliadas usando um teste de “ordenação diferença” com 18 provadores não treinados em cabine *Macbeth Spectral light* com luz do dia (6770 °K) (Figura 18). As oito misturas foram codificadas com três dígitos e apresentadas numa única sessão a cada provador. Os julgadores ordenaram as amostras do mais branco ao mais amarelo. Os resultados foram primeiramente avaliados por ANOVA não paramétrica (Friedmann) seguido de teste de contraste  $LSD_{rank}$  com um valor  $\alpha$  de 5%, conforme recomendado por Meilgaard *et al.* (1999). Os testes começaram 72 horas após a adição das misturas, permitindo a ação completa do peróxido de benzoíla.



Figura 18. Avaliação sensorial da cor das farinhas.

## Análise instrumental da cor das farinhas e dos pães

A cor da farinha e do miolo dos pães foi analisada utilizando um colorímetro Hunter Color Lab (modelo Color Quest XE, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, Virginia, USA). Foi utilizado o software *Universal Software 4.10* para calibrar a iluminação D65 com um ângulo de 10°. Para os pães, a parte central de cada fatia de 25 mm foi colocada contra a abertura de

9 mm utilizando-se um cubeta de quartz de 1 polegada. O mesmo procedimento foi utilizado para as farinhas que foram inseridas dentro da cubeta. Neste colorímetro, a cor das amostras é representada por três dimensões  $L$ ,  $a$  e  $b$ , correspondente ao sistema XYZ CIE lab system (Figura 19). O valor  $L$  denota a medida de luminosidade do produto de 100 para o branco perfeito ao zero para o preto, assim como o olho humano avaliaria. As tonalidades vermelho/verde são determinadas pela letra  $a$  e as tonalidades amarelo/azul pela letra  $b$  (FERREIRA,1981). Neste estudo o código “ $L_c$ ” foi utilizado no lugar de “ $L$ ”, pelo fato que esta sigla foi aplicada à medida reológica de extensibilidade da massa.

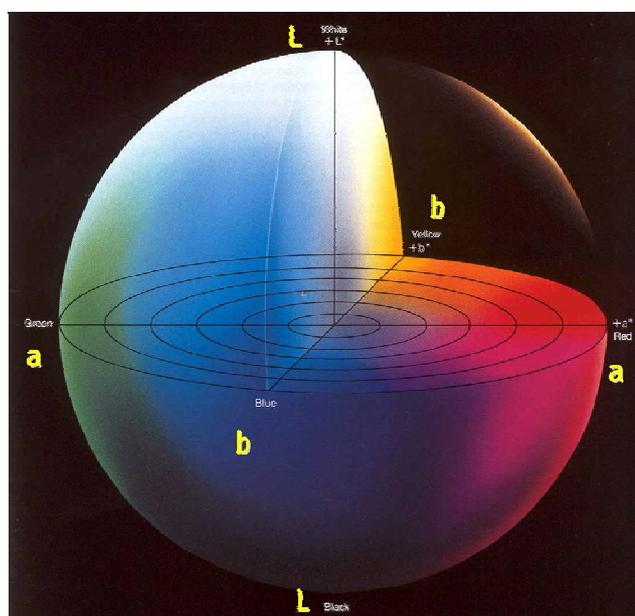


Figura 19. Sistema de cores CIE Lab.

Fonte: Konica Minolta, (1998) [adaptado].

## Propriedades reológicas

As determinações no alveógrafo foram efetuadas sob condições de umidade constante e períodos de misturas de acordo com o método padronizado 54-30 (AACC, 2000). Os seguintes parâmetros de alveografia foram medidos automaticamente por um software: pressão máxima necessária para romper a bolha da massa (resistência à extensão ( $P$ , mm H<sub>2</sub>O x 1.1)),

abscissa média no rompimento da bolha (extensibilidade da massa ( $L$ , mm)), proporção da deformação da curva ( $P/L$ ) e a energia de deformação relacionada a 1 g de massa ( $W \times 10^{-4}$  J).

Duas curvas foram consideradas para cada amostra e a análise foi conduzida em um alveógrafo Chopin modelo MA95 (Chopin, Villeneuve-la-Garenne, França) a uma temperatura de 18 a 22 °C e umidade relativa de  $65 \pm 15\%$  com uma solução salina 2,5% (Figura 20).



Figura 20. Alveógrafo Chopin

### Preparo dos pães

A formulação utilizada para a “massa-controle” constou de: 2 g de sal (1,77%), 1,75 g (1,55%) de levedura, 3 g (2,66%) de gordura vegetal hidrogenada e 6 g (5,32%) de açúcar para 100 g (88,69%) de farinha de trigo, sendo que 100 g da mistura resultam em aproximadamente 144 g de produto final (pão de forma). Foi adicionado 1,04 L para 2 kg de farinha de trigo. A mistura foi feita em misturador de massas marca Suprema SR-15 (Suprema, Sumaré, SP) a uma velocidade inicial “lenta” de 150 rpm durante 5 minutos e velocidade secundária “rápida” de aprox. 300 rpm durante 8 a 12 min. A massa resultante de 3,27 kg foi dividida em 7 pedaços redondos ( $\approx 464,20$  g) e permaneceu em repouso em uma bancada à temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, foram achatadas, enroladas manualmente, acondicionadas

em formas metálicas de 30 mm x 10 mm x 11 mm (Figura 21) e levadas à câmara de fermentação Suprema (Suprema, Sumaré, SP) por 120 min a 30 °C, com umidade relativa de 90 a 95% (período de tempo padrão da indústria para fermentações curtas). A seguir, as formas foram acondicionadas em forno elétrico semi-industrial de lastro marca Suprema modelo MSE-2.2D (Suprema, Sumaré, SP) padronizado à temperatura de 230 °C no topo e 218 °C na base. Após 24 minutos, os pães foram esfriados à temperatura ambiente por 1 hora em carrinhos com prateleiras metálicas para os testes de volume. Cada pão foi posteriormente embalado em sacos de polietileno e congelado a -25 °C para futuras avaliações.



Figura 21. Forma para fermentação e forneamento de pão tipo americano.

### Análise de volume dos pães

O volume dos pães ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) foi determinado através da medida de deslocamento de sementes de painço 15 minutos depois da saída do forno, através do medidor volumétrico para pães Vondel, modelo VDMV 02 com divisões mínimas de  $25 \text{ cm}^3$  (Vondel Ind. e Com de Máquinas e Componentes, São José dos Pinhais, Paraná).

## Propriedades de textura

Os pães foram descongelados à temperatura ambiente e a firmeza do miolo foi determinada instrumentalmente utilizando-se o Texture Analyser (TA-XT2i, Stable Micro Systems Ltd, Surrey, Reino Unido) com o software *Texture Expert* v.1.20 (Figura 22) com cinco repetições para cada amostra, de acordo com os procedimentos recomendados no método 74-09 (AACC, 2000). Uma sonda cilíndrica de alumínio com 35 mm de diâmetro, modelo P/36R, foi utilizada para o teste de compressão única. A força da sonda durante o teste foi de 5 g e a distância da compressão foi de 30 mm com velocidade e  $1 \text{ mm seg}^{-1}$ . Cinco amostras com espessura de 25 mm cortadas do centro dos pães foram avaliadas para cada mistura. A força em Newtons foi computada como sendo a força necessária para fazer penetrar a sonda.



Figura 22. Texturômetro Texture Analyser TA-XT2i

## Avaliação sensorial dos pães

As fatias dos pães tiveram os seguintes atributos avaliados: brancura do miolo, uniformidade das bolhas, elasticidade (avaliação se a fatia retém ou não o formato após dobra) (Figura 23), sabor característico de pão e maciez. Os atributos foram escolhidos previamente baseados na opinião de profissionais do setor e as avaliações sensoriais foram realizadas por 12 provadores, consistindo de alunos e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

da USP, treinados no uso de uma escala de intensidade com 9 pontos (MEILGAARD *et al.*, 1999). A escala foi ancorada por produtos comerciais previamente definidos representando as amostras extremas. Após o treinamento, os provadores foram submetidos a um teste contendo 3 amostras (duas iguais e uma diferente). Este teste foi repetido 3 vezes para cada provador, que foi selecionado baseado na sua capacidade de separar as diferentes amostras de acordo com os 5 critérios descritos e medidos pelo valor da probabilidade ( $p < 0,05$  e  $p > 0,05$  para as amostras e repetições, respectivamente) obtido pelo teste de variância (ANOVA) usado nos testes. Uma descrição completa da escala se encontra nos resultados (Tabela 10). Quatro amostras (FIS, AA, FIS+AA e CONT) foram codificadas com 3 dígitos e apresentadas numa única sessão para cada provador. Todas as amostras foram apresentadas simultaneamente em 24 combinações (4!) de ordem. As avaliações foram conduzidas em laboratório e cada provador avaliou 2 combinações separadas em duas sessões diferentes. Entre cada avaliação, os provadores tomaram água (20°C) para limpar a boca. Os resultados foram submetidos a um teste de normalidade e homogeneidade de variâncias e tratados por two way ANOVA (provadores e testes).

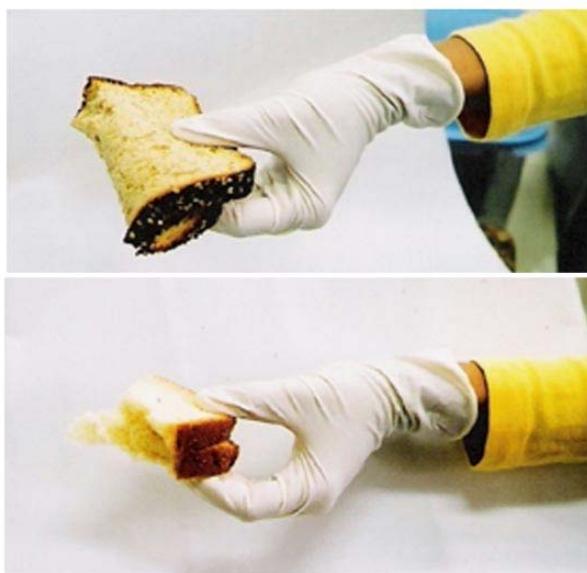


Figura 23. Teste sensorial da elasticidade do pão.

## Modelagem e otimização das regressões

Os resultados experimentais obtidos das avaliações sensoriais e reológicas para os sete ensaios foram ajustados a um modelo linear, quadrático ou cúbico para obtenção dos coeficientes de regressão e tratados estatisticamente na modelagem das variáveis respostas ( $y_i$ ):

$$\hat{y}_i = \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + \beta_3 * x_3 + \beta_{12} * x_1 x_2 + \beta_{13} * x_1 x_3 + \beta_{23} * x_2 x_3 + \beta_{123} * x_1 x_2 x_3,$$

onde  $\hat{y}_i$  = função da estimativa da resposta de interesse,  $\beta_i$  = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados,  $x_i$  = variáveis dependentes,

sendo  $1 > x_i > 0$  e  $\sum_{i=1}^n x_i = 1,0$  (ERIKSSON; JOHANSSON; WIKSTROM, 1998). Gráficos tridimensionais de superfície de resposta foram gerados para cada parâmetro de qualidade.

A qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi verificada através da análise de variância (ANOVA) da regressão e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na qual as repetições forneceram graus de liberdade para a obtenção do erro puro e conseqüentemente, análise da falta de ajuste.

O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para comparação entre os valores estimados e observados obtidos para a combinação aleatória das 3 variáveis (FIS, AA e PBZ). A otimização simultânea das respostas ( $\hat{y}_i$ ) foi obtida de acordo com os procedimentos propostos por Derringer e Suich (1980). Todos os cálculos e gráficos foram realizados com auxílio do programa STATISTICA v.7 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

## Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm DP$ , e todos os dados experimentais foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias (Hartley) seguido de análise de variância (ANOVA), e teste de contrastes (Tukey HSD), adotando-se um valor  $\alpha$  de 0,05.

## 5. RESULTADOS [PARTE 1]

### 5.1 Composição química

A Tabela 3 apresenta a composição química da farinha de soja e de trigo utilizadas neste estudo. A composição química da farinha de trigo suplementada com 1% das diferentes misturas, de acordo com o delineamento experimental, está apresentada na Tabela 4, enquanto que a composição química média dos pães pode ser verificada na Tabela 5.

Tabela 3. Composição química da farinha de soja e farinha de trigo.

Nutrientes <sup>1</sup>	Farinha Integral de Soja	Farinha de Trigo
Umidade	5,2 ± 0,1	13,8 ± 0,4
Proteína	40,6 ± 0,9 (N x 6,25)	11,9 ± 0,6 (N x 5,70)
Lipídios	23,5 ± 0,6	1,4 ± 0,1
Cinzas	5,0 ± 0,1	0,6 ± 0,0
Carboidratos <sup>2</sup>	25,7	72,2

<sup>1</sup>Valores em g /100 g expressos pela média ± DP (n=3).

<sup>2</sup>Valores obtidos por diferença.

Tabela 4. Composição química das farinhas de trigo preparadas de acordo com o delineamento experimental.

Ensaio	(X <sub>1</sub> ,X <sub>2</sub> ,X <sub>3</sub> )	Proteína	Nutrientes <sup>1</sup>		
			Lipídios <sup>2</sup>	Cinzas	Carboidratos <sup>4</sup>
FIS	(1,0,0)	11,4 ± 0,0	1,6	0,7 ± 0,0	71,7
PBZ	(0,1,0)	11,1 ± 0,3	1,4	0,7 ± 0,0	73,9
AA	(0,0,1)	11,7 ± 0,9	1,4	0,6 ± 0,0	73,4
FIS+PBZ	(½,½,0)	11,1 ± 0,4	1,5	0,8 ± 0,1	72,2
FIS+AA	(½,0,½)	11,7 ± 0,7	1,5	0,8 ± 0,1	72,0
PBZ+AA	(0,½,½)	11,1 ± 0,2	1,4	0,7 ± 0,0	73,0
FIS+PBZ+AA	(⅓,⅓,⅓)	10,9 ± 0,1	1,5	0,6 ± 0,1	73,2
CONT	(0,0,0)	11,2 ± 0,0	1,4	0,6 ± 0,1	73,0
p <sup>3</sup>	-	0,61	-	0,34	-

<sup>1</sup>Valores em g /100 g expressos pela média ± DP (n=3).

<sup>2</sup>Valores estimados a partir da concentração de lipídios determinados na Tabela 1.

<sup>3</sup>Valor de probabilidade (p) para a diferença entre as 8 misturas, obtidas por ANOVA e teste Tukey HSD.

<sup>4</sup>Valores obtidos por diferença.

Tabela 5. Composição química dos pães utilizados nos experimentos

Nutrientes <sup>1</sup>	Pães
Umidade	37,5 ± 1,5
Proteína	10,8 ± 0,2
Lipídios	4,1 ± 0,2
Cinzas	1,9 ± 0,0
Carboidratos <sup>2</sup>	47,6
VCT	270,5 kcal

<sup>1</sup>Valores em g /100 g expressos pela média ± DP (n=24).

<sup>2</sup>Valores obtidos por diferença.

## 5.2 Atividade de lipoxigenase da farinha de soja

A Figura 24 apresenta a atividade de lipoxigenase fração 1 (LOX1) na farinha integral ativa de soja (71 unidades/μg proteína) induzida por oxidação do ácido linoléico a 234 nm (LOX1), onde 1 unidade corresponde ao incremento de 0,001 de absorvância no comprimento de onda de 234 nm a cada 1 min no pH

9,0 a 25 °C quando o substrato for o ácido linoléico. A alta atividade de LOX1 confirmou que a farinha integral de soja não foi submetida a nenhum tratamento térmico. Foi escolhida para os ensaios a variedade de soja que apresentou a maior atividade da enzima lipoxigenase que foi obtida após uma triagem com 35 variedades. Não foi encontrada atividade de LOX1 na farinha de trigo e na farinha de soja inativa.

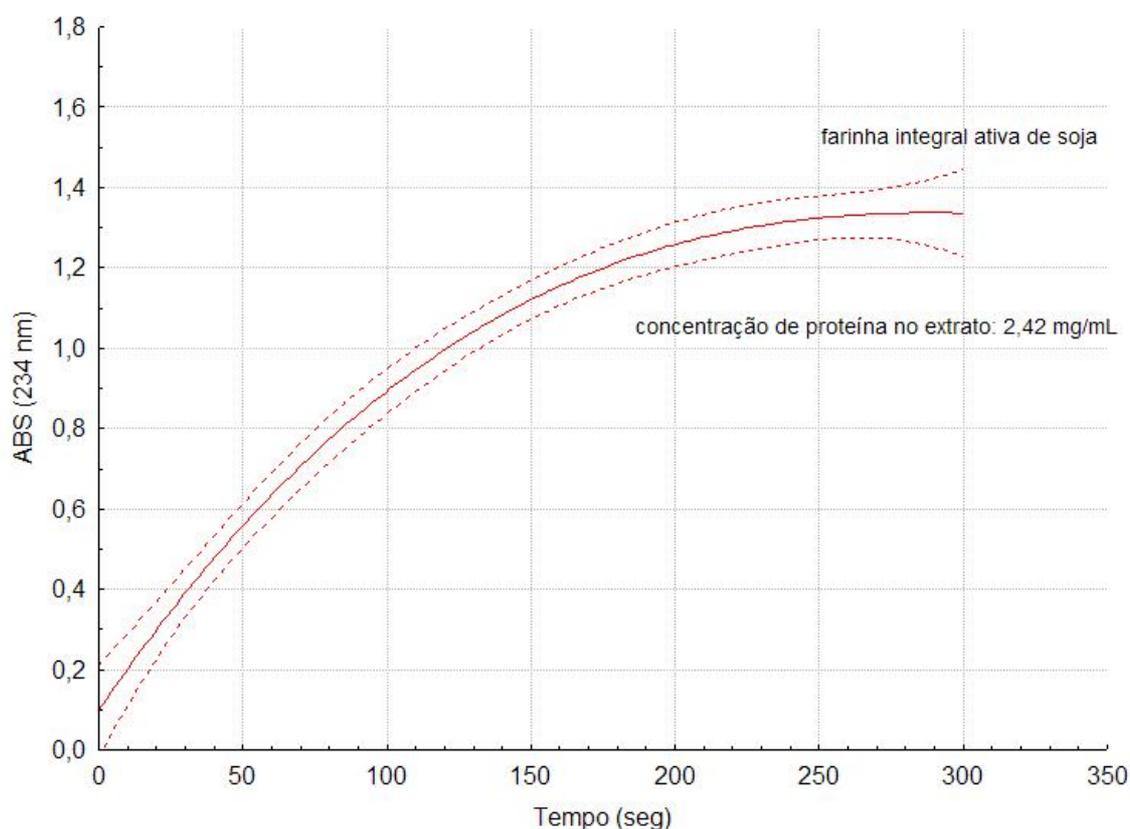


Figura 24. Atividade da lipoxigenase acompanhada por espectrofotometria na faixa do ultravioleta.

O conteúdo de ferro foi determinado nas duas amostras de farinha de soja e os seguintes resultados foram encontrados:  $66,39 \pm 4,23 \mu\text{g Fe/g}$  para a farinha de soja com lipoxigenase (ativa) e  $52,30 \pm 0,40 \mu\text{g Fe/g}$  para a farinha de soja sem lipoxigenase (inativa).

### 5.3 Propriedades reológicas da massa

A mistura FIS+AA, que representa a mistura contendo 250 ppm de ácido ascórbico mais 0,5% de farinha integral de soja ativa mostrou um índice  $P$  significativamente mais elevado que as demais misturas (Figura 25)

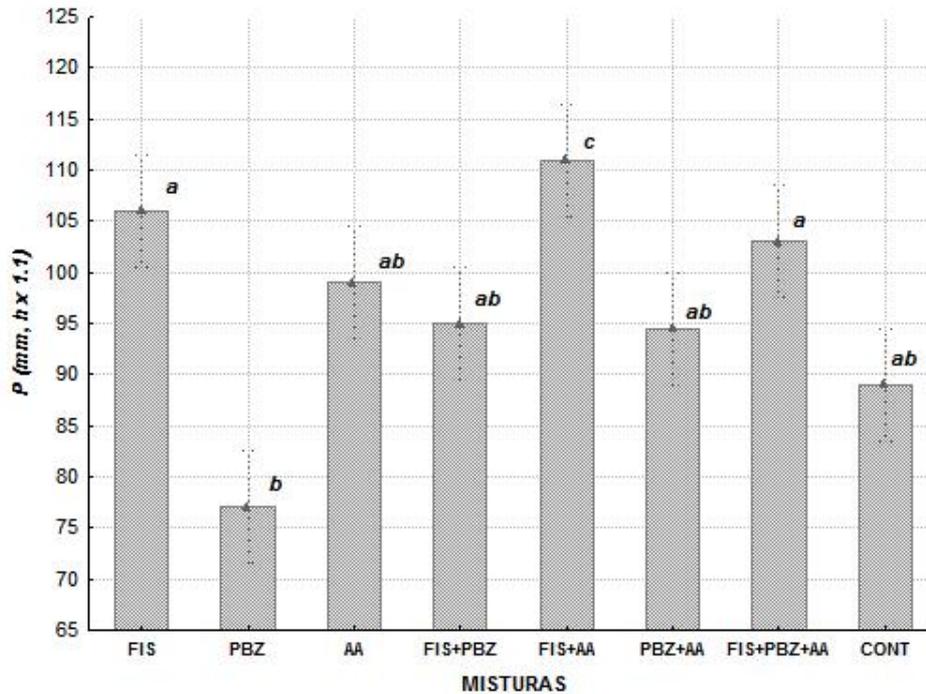


Figura 25. Resistência à extensão ( $P$ ) das diferentes misturas.

Médias com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A extensibilidade da massa (Figura 26) foi alterada apenas pela máxima concentração de PBZ. Neste estudo, a adição de 60 ppm de PBZ causou um aumento significativo de extensibilidade da massa, seguido por uma redução significativa da elasticidade.

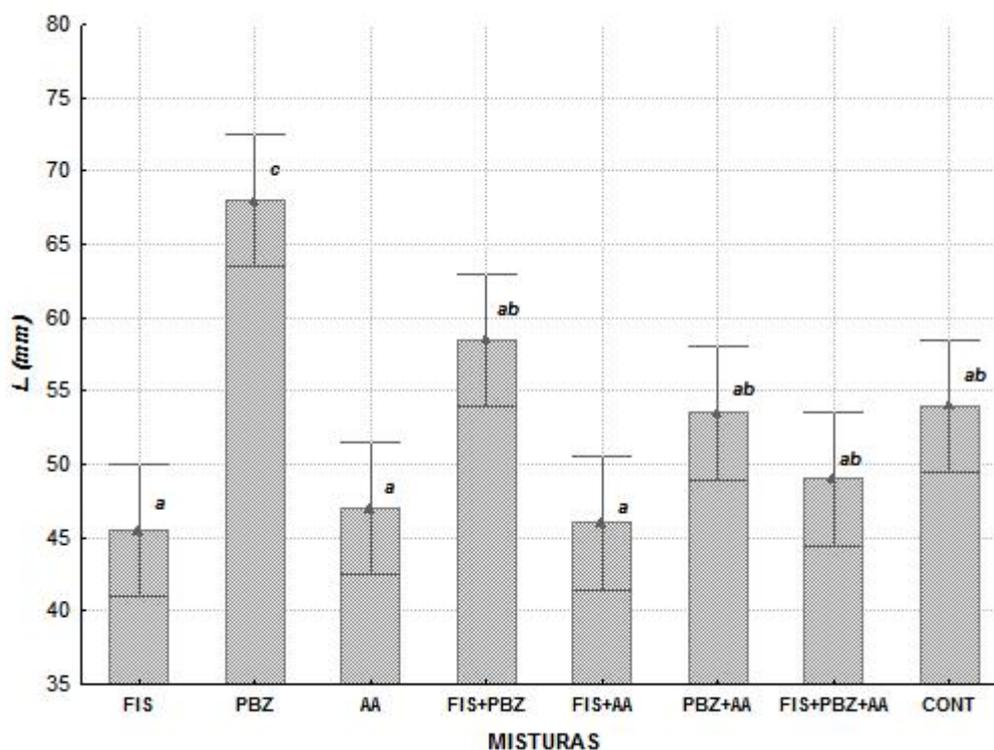


Figura 26. Extensibilidade da massa ( $L$ ) das diferentes misturas.

As médias com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

O índice  $W$  das misturas, que é normalmente utilizado para estimar o comportamento da massa durante o processo de panificação, não mostrou nenhuma alteração estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as misturas ( $W = 204,8 \pm 13,9$ ). Massas com elevado índice  $W$  normalmente apresentam boas propriedades de elasticidade e extensibilidade, ideais à panificação. Como o índice  $W$  é obtido pela área sobre a curva  $P/L$  no alveograma, massas com alto índice  $P$  e baixo índice  $L$ , resultam em um mesmo  $W$  que outras com baixo  $P$  e alto  $L$ . Esta pode ser a razão porque não foi observada nenhuma diferença significativa nesse parâmetro entre as misturas avaliadas.

## 5.4 Cor das misturas com farinha de trigo

Os resultados instrumentais (Hunter Lab) da avaliação da cor das misturas estão apresentados na Figura 27. A mistura contendo farinha integral de soja (FIS) apresentou luminosidade ( $L_c$ ) significativamente menor que as demais misturas. Esse resultado confirma o fato que a lipoxigenase só apresenta atividade catalítica na presença de água. A Figura 27 mostrou que a luminosidade aumentou com o aumento do PBZ de forma linear. A máxima concentração de PBZ (60 ppm) também promoveu uma redução significativa de  $b$  (amarelo/azul) na farinha de trigo. Os resultados sensoriais (Tabela 6) mostraram uma correlação linear e significativa ( $p = 0,034$ ;  $r^2=0,46$ ) com o parâmetro instrumental  $b$  indicando uma percepção visual humana maior para as variações do 'amarelo/azul' que para luminosidade (correlação não significativa).

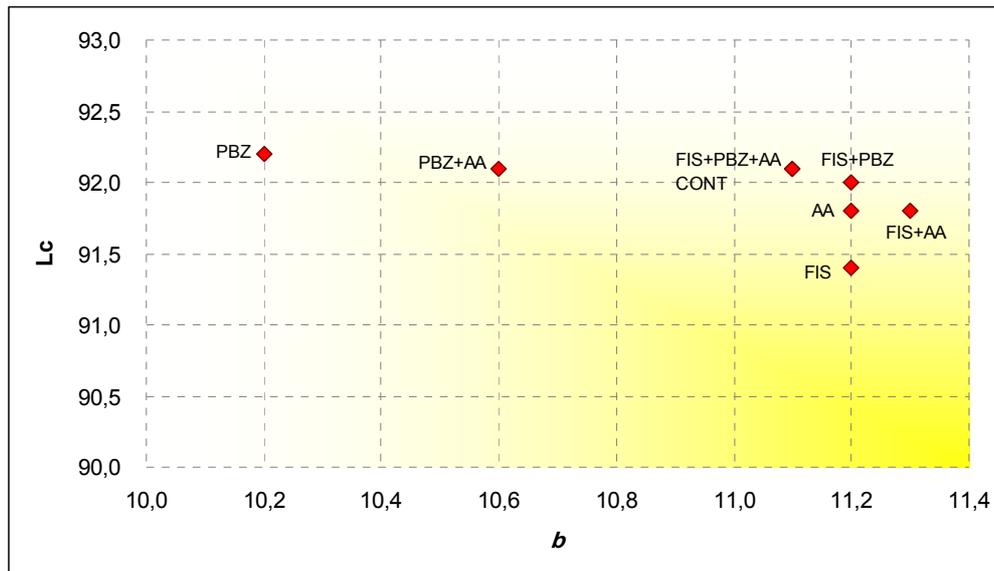


Figura 27. Cor instrumental das misturas de farinha de trigo.

Tabela 6. Avaliação sensorial de cor das misturas.

Ensaio (misturas)	Escore sensorial <sup>1,2</sup>
FIS	7,28 ±1,8 <sup>c</sup>
PBZ	1,17 ±0,5 <sup>a</sup>
AA	4,17 ±1,9 <sup>b</sup>
FIS+PBZ	4,61 ±2,0 <sup>b</sup>
FIS+AA	5,00 ±1,7 <sup>b</sup>
PBZ+AA	4,22 ±2,4 <sup>b</sup>
FIS+PBZ+AA	4,44 ±2,4 <sup>b</sup>
CONT	8,06 ±1,4 <sup>c</sup>
<i>p</i> <sup>3</sup>	<0,01

<sup>1</sup>Valores expressos como média ±DP (n=18)

<sup>2</sup>Escala: 1=farinha mais branca e 9=farinha mais amarelada.

<sup>3</sup>Valor da Probabilidade (*p*) para a diferença entre os oito tratamentos. Resultados da análise sensorial foram tratados pela análise não paramétrica de Friedman.

## 5.5 Cor dos pães

A Tabela 7 mostra os resultados da avaliação instrumental de cor. Todos os ensaios promoveram aumento da luminosidade quando comparados ao controle. Sinergismo entre o ácido ascórbico e a farinha integral de soja (Tabela 7) foi observado na redução da tonalidade amarela (*b*).

Tabela 7. Cor instrumental (luminosidade e tonalidade amarela) dos pães.

Ensaio <sup>1</sup>	FIS	AA	FIS+AA	CONT	<i>p</i>
Luminosidade ( <i>Lc</i> )	78,7±1,7 <sup>b</sup>	82,2±0,8 <sup>c</sup>	79,4±0,9 <sup>bc</sup>	75,2±0,7 <sup>a</sup>	0,01
Tonalidade amarela ( <i>b</i> )	13,4 ±0,2 <sup>b</sup>	14,6±0,2 <sup>c</sup>	12,6±0,3 <sup>a</sup>	15,1±0,1 <sup>c</sup>	<0,01

<sup>1</sup>Valores expressos como média ±DP (n=12). As médias seguidas pela mesma letra na não são significativamente diferentes (*p*<0,05).

## 5.6 Volume dos pães

Os dados da Tabela 8 mostram que o ácido ascórbico parece ter sido o composto responsável pelo aumento de volume específico dos pães.

Tabela 8. Volume específico dos pães.

	FIS	AA	FIS+AA	CONT
Volume (cm <sup>3</sup> /g) <sup>1</sup>	501	600	561	501

<sup>1</sup>Valores obtidos sem replicatas.

## 5.7 Textura (maciez) dos pães

A Tabela 9 mostra os dados de textura das fatias dos pães obtidos pelo texturômetro TA-XT2. A mistura contendo ácido ascórbico promoveu um aumento significativo na maciez do pão, quando comparada ao controle.

Tabela 9. Firmeza (maciez) dos pães medidos por texturômetro.

	FIS	AA	FIS+AA	CONT	p <sup>2</sup>
Firmeza (Maciez) (N) <sup>1</sup>	2,1±0,9 <sup>ab</sup>	1,2±0,2 <sup>a</sup>	1,3±0,5 <sup>ab</sup>	2,4±0,7 <sup>b</sup>	0,016

<sup>1</sup> Médias de cinco determinações. As médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>2</sup> Valor da probabilidade ( $p$ ) para a diferença entre os ensaios.

## 5.8 Avaliação sensorial dos pães

Conforme demonstrado na Tabela 10, observou-se que a cor do miolo foi considerada mais branca para todas as amostras contendo farinha integral ativa de soja e ácido ascórbico. Nenhuma diferença foi observada para porosidade e sabor. Assim como foi observado na Tabela 9 que a adição de ácido ascórbico resultou em pães mais macios que o controle. A elasticidade das amostras contendo farinha integral ativa de soja e ácido ascórbico mostrou um resultado superior ao observado no controle.

Tabela 10. Escore sensorial da análise dos pães.

Escores <sup>1</sup>	Descrição da escala	FIS	AA	FIS+AA	CONTROLE	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>
Cor do miolo	1= mais branco 9= mais amarelo	3.9±1.3 <sup>ab</sup>	3.0±0.9 <sup>a</sup>	3.3±1.2 <sup>a</sup>	4.8±1.2 <sup>b</sup>	0.002	0.411
Porosidade (uniformidade)	1= uniforme 9 = irregular	7.3±2.0	8.2±1.5	7.3±2.0	7.3±2.1	0.647	0.480
Elasticidade	1 = fatias retêm formato após dobra. 9 = fatias quebram após dobra.	6.0±1.3 <sup>c</sup>	3.9±2.2 <sup>ab</sup>	3.3±1.7 <sup>a</sup>	5.3±1.9 <sup>bc</sup>	0.003	0.377
Sabor	1 =característico 9 = não característico	3.2±1.5	2.9±1.9	2.5±1.4	2.3±1.2	0.604	0.946
Maciez	1 = pouca pressão com os dedos. 9 = muita pressão com os dedos.	3.1±1.3 <sup>ab</sup>	2.3±0.9 <sup>a</sup>	2.3±1.6 <sup>ab</sup>	3.7±1.6 <sup>b</sup>	0.028	0.327

<sup>1</sup>Valores expressos como média ±DP (n=12) As médias seguidas pela mesma letra na linha não são significativamente diferentes (p<0.05).

<sup>2</sup>Valor da probabilidade (p) para a diferença entre os tratamentos.

<sup>3</sup> Valor da probabilidade (p) para a diferença entre os provadores.

## 5.9 Modelos polinomiais das misturas de farinha de trigo

Dois modelos foram ajustados para os índices *P* e *L* das massas uma vez que o índice *W* não apresentou variação significativa entre as farinhas de trigo.

$$\hat{y}_P = 107,27x_1 + 78,27x_2 + 98,84x_3 + 34,36x_1x_3 + 26,36x_2x_3$$

(±1,93)
(±1,93)
(±2,11)
(±9,69)
(±9,69)

$$\hat{y}_L = 45,77x_1 + 66,77x_2 + 44,97x_3$$

(±1,90)
(±1,90)
(±1,90)

Onde  $\hat{y}_P$  e  $\hat{y}_L$  representam a estimativa para os parâmetros *P* e *L* quando os valores  $x_i$  são alterados dentro da faixa experimental ( $1 \geq x_i \geq 0$  e  $\sum_{i=1}^n x_i = 1.0$ ),

sendo  $b_i$  o coeficiente de modelo estimado pelo método dos mínimos quadrados. Os valores entre parênteses representam o erro padrão dos coeficientes.

Para os resultados de cor da farinha, só foi possível ajustar um modelo para luminosidade ( $L_c$ ).

$$\hat{y}_{Lc} = 91,44x_1 + 92,16x_2 + 91,80x_3 + 0,80x_1x_2 + 0,90x_1x_3 + 0,72x_2x_3 + 2,61x_1x_2x_3$$

$(\pm 0,03)$      $(\pm 0,03)$      $(\pm 0,03)$      $(\pm 0,15)$      $(\pm 0,15)$      $(\pm 0,15)$      $(\pm 1,09)$

A análise de variância e determinação da qualidade do ajuste dos três modelos propostos neste estudo para as misturas das farinhas está apresentada na Tabela 11 e as curvas de contorno apresentadas na Figura 28, Figura 29 e Figura 30.

Tabela 11. Análise da variância dos modelos aplicada aos dados experimentais.

Parâmetros	GL	p(modelo)	GL (falta de ajuste)	p (falta de ajuste)	R <sup>2</sup>
<i>P elasticidade</i>	4	0,01	2	0,321	0,92
<i>L extensibilidade</i>	2	<0,01	4	0,252	0,87
<i>Lc luminosidade</i>	6	<0,01	0	-	0,96

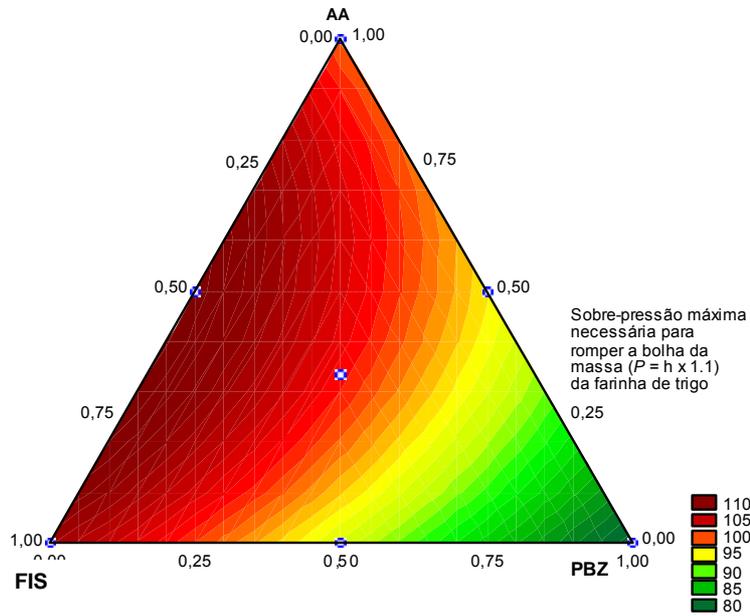


Figura 28. Curvas de contorno obtidas pelo modelo polinomial ajustado à elasticidade da massa ( $P$ ) em mm.

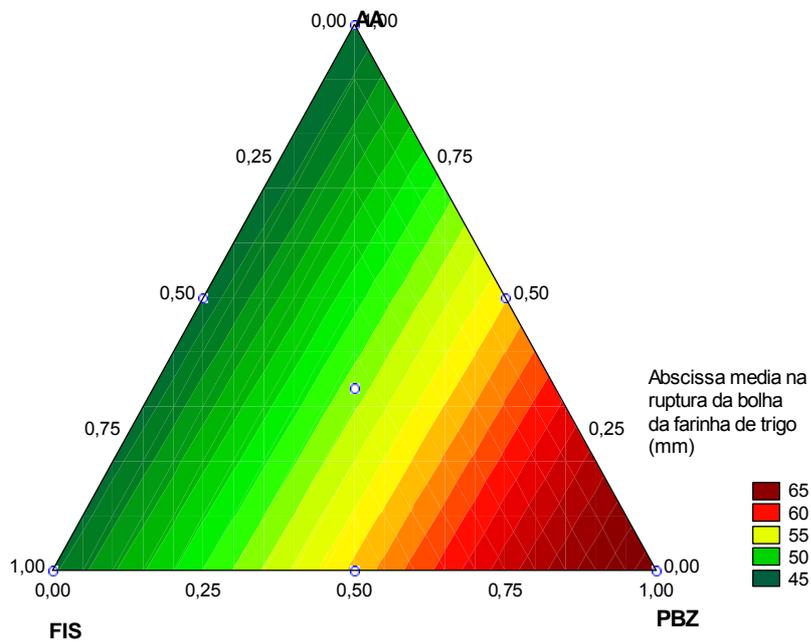


Figura 29. Curvas de contorno obtidas pelo modelo polinomial ajustado à extensibilidade da massa ( $L$ ) em mm.

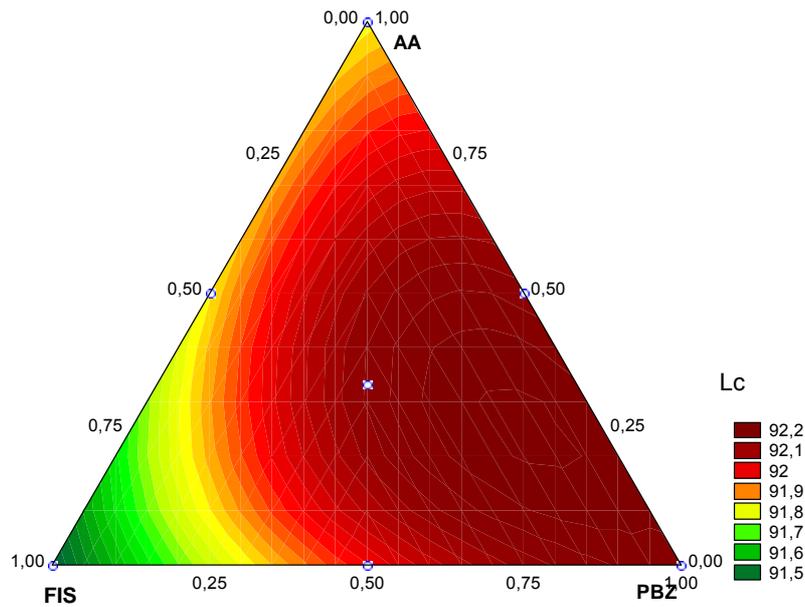


Figura 30. Curvas de contorno obtidas pelo modelo polinomial ajustado à luminosidade ( $L_c$ ) da farinha.

Pode ser observado que a variação de 92%, 87% e 96% de  $P$ ,  $L$  e  $L_c$  podem ser explicados pelos respectivos modelos e a falta de ajuste não foi significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.10 Otimização e validação do modelo das misturas de farinha de trigo

Além de explicar o comportamento das variáveis pelas curvas de contorno, os modelos obtidos neste estudo também podem ser aplicados com a finalidade de otimização. Portanto, uma proposta de otimização foi conduzida com o propósito de maximizar as três variáveis ( $P$ ,  $L$  e  $L_c$ ) simultaneamente através dos procedimentos descritos por Derringer e Suich (1980). O resultado final desta otimização sugere que a combinação de 0,27% de farinha integral ativa de soja (FIS), 4,8 ppm de peróxido de benzoíla (PBZ) e 325 ppm de ácido ascórbico (AA) na farinha de trigo, pode ser uma opção de mistura desses três oxidantes para se atingir a máxima elasticidade e extensibilidade com a maior brancura da farinha. Esta mistura foi submetida ao mesmo procedimento

experimental analítico realizado no início deste estudo e os valores observados foram comparados aos valores estimado da Tabela 12. Não foi observada diferença significativa entre os dois valores, sugerindo um bom ajuste dos modelos aos dados experimentais. A mistura otimizada ( $L_c$  de  $92.0 \pm 0,1$ ) foi tão branca quanto o controle ( $L_c$  de  $92,1 \pm 0,0$ ) e a resistência à extensão da estrutura do glúten apresentado pela mistura otimizada ( $P=108,5 \pm 2,1$ ) representou um aumento de 22% em comparação com o ensaio controle ( $P=89,0 \pm 5,7$ ).

Tabela 12. Avaliação entre valores estimados dos modelos polinomiais e os valores determinados experimentalmente nas farinhas e respectivas massas.

Parâmetros	Valor Estimado <sup>1</sup>	Valor Observado <sup>1</sup>	$p$ <sup>2</sup>
$L_c$	91,9 (91,9 -92,0)	92,0 (91,7 – 92,3)	0,99
$P$	106,9 (103,5 -110,2)	108,5 (89,4 – 127,6)	0,76
$L$	46,9 (44,2 – 49,6)	44,5 (25,4 – 63,6)	0,55

<sup>1</sup>Valores expressos pela média (95% IC).

<sup>2</sup>Valores de probabilidade pelo teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

Com base nos resultados da primeira parte desse estudo, se mostrou necessário efetuar os ensaios com farinhas de trigo de diferentes forças para validar os resultados que foram inicialmente baseados apenas em farinhas com baixo índice  $W$  (farinhas fracas).

Além disso, foi decidido aprofundar os estudos na atuação da enzima lipoxigenase e sua atividade frente a diferentes forças de farinha assim como em diferentes tempos de fermentação para se analisar sua velocidade de atuação.

Desta forma, a segunda parte deste estudo procurou avaliar quais as variações reológicas e de cor quando a atividade da enzima, a força da farinha e o tempo de fermentação variam simultaneamente.

## 6. OBJETIVOS [PARTE 2]

### Objetivos gerais

O objetivo da segunda parte deste estudo foi de avaliar o efeito da lipoxigenase da soja nas propriedades sensoriais, reológicas e de cor de pães, variando a qualidade tecnológica da farinha de trigo e o tempo de fermentação da massa.

### Objetivos específicos

1. Modelar regressões capazes de explicar como propriedades sensoriais, reológicas e de cor variam em função da atividade enzimática, tempo de fermentação e qualidade tecnológica da farinha de trigo.
2. Avaliar a velocidade de ação da lipoxigenase da soja.
3. Buscar hipóteses que justifiquem as interações observadas.

## 7. MATERIAL E MÉTODOS [PARTE 2]

### 7.1 Material

Duas farinhas comerciais de trigo foram obtidas do MOINHO ANACONDA S.A. (São Paulo, SP). As farinhas de soja integral enzimaticamente ativa e inativa utilizadas nos ensaios desta 2ª parte do estudo foram as mesmas descritas na 1ª parte.

### 7.2 Delineamento experimental

Um delineamento tipo Box-Behnken com 3 fatores (BOX; DRAPER, 1987) foi utilizado neste estudo contendo um bloco e três variáveis independentes ou fatores (Tabela 13), aqui designados por atividade de lipoxigenase ( $x_1$ ), força da farinha de trigo expressa como energia de deformação ( $W$ ) ( $x_2$ ) e tempo de fermentação ( $x_3$ ) em três níveis de variação, totalizando 15 ensaios. Os ensaios foram conduzidos de forma aleatória e em duplicata. Os delineamentos do tipo Box-Behnken são econômicos e portanto, particularmente úteis quando é muito custoso executar os ensaios experimentais necessários. Tipicamente, o ponto central é repetido várias vezes (não menos que três) para fornecer uma estimativa independente do erro experimental.

Tabela 13. Delineamento com três fatores em três níveis do tipo Box-Behnken.

Ensaio	Variáveis codificadas (fatores)			Níveis de variação		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	LOX <sup>1</sup>	W <sup>2</sup>	TEMPO <sup>3</sup>
1	-1	-1	0	0,0	231	4
2	1	-1	0	71,0	231	4
3	-1	1	0	0,0	258	4
4	1	1	0	71,0	258	4
5	-1	0	-1	0,0	245	2
6	1	0	-1	71,0	245	2
7	-1	0	1	0,0	245	6
8	1	0	1	71,0	245	6
9	0	-1	-1	35,5	231	2
10	0	1	-1	35,5	258	2
11	0	-1	1	35,5	231	6
12	0	1	1	35,5	258	6
13	0	0	0	35,5	245	4
14	0	0	0	35,5	245	4
15	0	0	0	35,5	245	4

<sup>1</sup> atividade da enzima Lipoxigenase (Unidades/ $\mu\text{g}$  de proteína). Valor estimado para a mistura foi de 35,5 unidades/ $\mu\text{g}$  de proteína. O valor medido foi de 33,5 Unidades/ $\mu\text{g}$  de proteína devido a variações inerentes à análise.

<sup>2</sup> força da farinha (índice W) obtido pelos respectivos alveogramas ( $\times 10^{-4}$  Joules). Valor estimado para a mistura foi de  $245 \times 10^{-4}$  Joules. O valor observado foi de  $252 \times 10^{-4}$  Joules. Variação inerente à análise.

<sup>3</sup> tempo de fermentação (horas).

### 7.3 Métodos

#### Determinação da composição centesimal

Os valores de umidade, proteína, cinzas e lipídios da farinha de trigo e das farinhas de soja foram determinados através dos métodos descritos no item 4.4.

#### Determinação da atividade da lipoxigenase

A atividade da LOX na farinha integral de soja foi determinada de acordo com Materiais e Métodos (item 4.4)

## Análise instrumental da cor dos pães

A cor do miolo dos pães foi analisada utilizando um colorímetro Minolta Chromameter (modelo CR-410 equipado com processador de dados DP400, Minolta, Osaka, Japão). Os pães foram cortados diagonalmente na metade e a parte central de cada metade foi colocada contra a abertura do colorímetro (Figura 31). Neste colorímetro, assim como no Hunter Lab utilizado na 1ª parte, a cor das amostras é representada por três dimensões  $L$ ,  $a$  e  $b$ , correspondente ao sistema CIE lab.



Figura 31. Determinação de cor em pães usando um colorímetro tipo Minolta.

## Propriedades reológicas

Os farinogramas foram realizados utilizando um Farinógrafo (Brabender, modelo 8-101-6, Duisberg, Alemanha) equipado com software versão 2.3.2, de acordo com o método AACC 54-21 (AACC, 2000). Os parâmetros determinados foram: absorção de água (WA%), tempo de desenvolvimento da massa (min), índice de tolerância (BU) e estabilidade (min). Testes de força da massa foram realizados em um Alveoconsistógrafo Chopin (Chopin, modelo NG, Villeneuve la Garenne, França) de acordo com o método AACC 54-30A (AACC, 2000). Os seguintes parâmetros foram automaticamente registrados: resistência à extensão ( $P$ , mm H<sub>2</sub>O x 1.1), extensibilidade da massa ( $L$ , mm),

proporção da deformação da curva ( $P/L$ ) e a força da farinha relacionado a 1 g de massa ( $W \times 10^{-4} J$ ).

### Preparo dos pães

O tipo de pão escolhido nesta segunda parte do estudo foi o “Francês”, um pão em forma de rolo de 50 g que representa 85% do consumo no Brasil (SINDIPAN, 2006b), e é altamente suscetível à força do trigo. A massa foi feita usando os seguintes ingredientes: 3 kg de farinha de trigo, 60 g de sal e 15 g de uma mistura melhoradora de panificação contendo 100 ppm de ácido ascórbico (Granotec Ltda., Curitiba, PR), 160 ppm de azodicarbonamida 25% (Granotec Ltda., Curitiba, PR), 5 ppm de endo-1,4,xilanase (Granotec Ltda., Curitiba, PR), 5 ppm de alfa-amilase fúngica (Granotec Ltda., Curitiba, PR) e 20 ppm de lipase (Granotec Ltda., Curitiba, PR). Os compostos foram adicionados principalmente porque testes de panificação realizados sem os mesmos produziram pães de baixa qualidade, não refletindo a realidade dos pães oferecidos no Brasil (Figura 32), e também porque na prática a lipoxigenase é adicionada à pré-mistura já contendo essa proporção básica de compostos.



Figura 32. Pães Franceses preparados sem melhoradores de panificação.

Três níveis diferentes (0,4%, 0,6% e 1%) de fermento seco instantâneo (AB Brasil, Pederneiras, SP) foram adicionados à farinha de trigo de acordo

com os três períodos de fermentação propostos no delineamento experimental. Desta forma, 12 g, 18 g e 30 g de fermento foram adicionados à massa para as fermentações de 6, 4 e 2 horas, respectivamente. A massa foi preparada em masseiras integradas e computadorizadas do tipo planetária com gancho, modelo SP-12 equipada com software Diosna v.3.00.06 (Diosna Dierks & Söhne GmbH, Osnabruck, Alemanha) por 2 min a 145 rpm, depois por 3 min a 105 rpm (com adição de água a 12,5 °C) e a 5 min com 228 rpm (Figura 33).



Figura 33. Masseiras computadorizadas

Depois, as massas foram modeladas em formas redondas de 2 kg (Figura 34), divididas com um divisor (modelo 30P, Progresso, Colombo, PR) em 30 pedaços ( $\approx 66,66$  g cada) e deixadas em repouso por 10 min à temperatura ambiente (24 °C) (Figura 35).



Figura 34. Massas modeladas a mão em 2 kg.



Figura 35. Massa de 2 kg dividida em 30 pedaços ( $\approx 66,66$  g)

Os pedaços foram então modelados em rolos por uma modeladora (Perfecta, Curitiba, PR) e transferidas a uma câmara de fermentação (Haas Technik CFS, Haas do Brasil, Curitiba, PR) a 23 °C e 92 % UR (Figura 36).



Figura 36. Pedaços modelados e transferidos à câmara de fermentação.

Cada teste teve um tempo diferente de fermentação (Tabela 13). Após a fermentação, as massas foram assadas por 20 min em um forno elétrico modular (Haas Technik FP3, Haas do Brasil, Curitiba, PR) com temperatura de 200 °C em cima e 210 °C na base e com injeção de vapor durante os primeiros 15 seg do forneamento. Os pães foram resfriados em temperatura ambiente

por 1 hora em prateleiras metálicas para as determinações de volume, cor e avaliações sensoriais.

### Análise de volume dos pães

O volume específico ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) foi calculado depois que as amostras foram pesadas (g) e o volume medido pelo método de deslocamento de sementes (Vondel VDMV 02, São Jose dos Pinhais, PR).

### Avaliação sensorial dos pães

Os pães tiveram os seguintes atributos avaliados: Cor da Casca, Pestana (abertura no topo do pão - Figura 37), uniformidade, crocância, simetria e tamanho. A avaliação sensorial foi conduzida por três padeiros experientes de acordo com os critérios definidos na Tabela 14, usando uma escala de 9 pontos. Não houve treinamento prévio, por se tratarem de pessoas qualificadas e experientes para a tarefa.

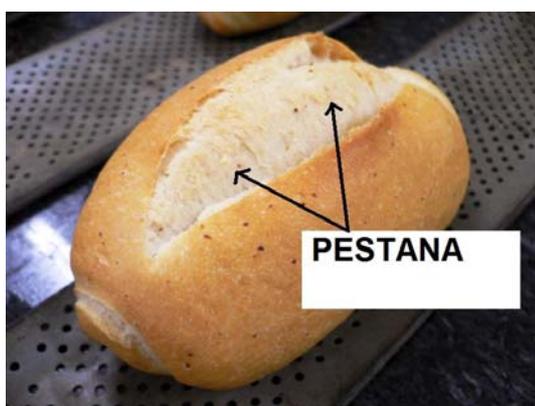


Figura 37. Caracterização da pestana no pão francês.

Tabela 14. Descrição da avaliação sensorial dos pães com escala de 9 pontos

Avaliação	Descrição Sensorial	Exemplo
Excelente (9)	Cor uniforme da casca Boa crocância Boa abertura de pestana Simetria Bom Volume	
Médio (5)	Características intermediárias	
Ruim (1)	Cor da casca não uniforme Pouca crocância Pequena abertura de pestana Formato irregular Volume pequeno	

## Análise estatística

Os resultados experimentais obtidos pelas determinações sensoriais e instrumentais foram expressos como média  $\pm$  DP e submetidos ao teste de homogeneidade da variância (Hartley). Os tratamentos foram inicialmente tratados por ANOVA, seguidos por Tukey HSD, considerando significativos valores de  $p < 0,05$ .

Os dados experimentais foram submetidos à modelagem baseados no delineamento experimental com 3 fatores, os modelos gerais usados na superfície de resposta foram:

(primeira ordem)

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$$

(segunda ordem)

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

(efeitos lineares)

(efeitos quadráticos)

(interação)

onde  $\hat{y}_i$  = resposta de interesse,  $\beta_i$  = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados,  $x_i$  = nível codificado dos fatores k do ensaio. Os efeitos lineares, quadráticos (não-lineares) e efeito de interação foram avaliados comparando os coeficientes estimados aos seus erros padrão, obtidos por replicatas através de teste t.

A qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi verificada através da análise de variância (ANOVA) da regressão e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na qual as repetições forneceram graus de liberdade para a obtenção do erro puro e conseqüentemente, análise da falta de ajuste.

As superfícies de resposta bi-dimensionais puderam ser geradas para cada parâmetro de qualidade. O teste t (Student) para variáveis independentes contra um valor fixo foi utilizado para determinar a validade dos valores estimados e observados obtidos para uma combinação aleatória das três variáveis ( $x_1=-0,25$ ,  $x_2=0,34$  e  $x_3=0,83$ ). O software STATISTICA v.7 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) foi utilizado nos cálculos e elaboração das superfícies de resposta.

## 8. RESULTADOS [PARTE 2]

### 8.1 Composição química da farinha de trigo

A Tabela 15 apresenta a composição química das farinhas de trigo utilizadas nesta 2ª parte do estudo.

Tabela 15. Composição química das farinhas de trigo codificadas.

Nutrientes <sup>1</sup> (g/100g)	Farinha de Trigo (-1) <sup>2</sup>	Farinha de Trigo (0) <sup>2</sup>	Farinha de Trigo (+1) <sup>2</sup>	$p^3$
Umidade	13,0 ± 0,1	13,1 ± 0,3	12,7 ± 0,0	0,310
Proteína	12,4 ± 0,7	13,1 ± 0,3	12,8 ± 0,3	0,464
Lipídios	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,0	0,010
Cinzas	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,342

<sup>1</sup>Valores são expressos como média ±DP (n=3)

<sup>2</sup>Amostras (-1) (0) e (+1) correspondem à farinha de trigo classificadas como fraca, média e forte, respectivamente

<sup>3</sup>Valor da probabilidade obtido por ANOVA

### 8.2 Atividade de lipoxigenase nas farinhas

Os valores experimentais da atividade enzimática da lipoxigenase (LOX1) obtidos nas farinhas integrais de soja usadas neste estudo estão exibidos na Figura 38, observando que a concentração protéica similar foi extraída em cada amostra (aproximadamente 2,40 mg de proteína por mL). A mistura LOX0 foi obtida através da mistura entre a LOX1 e LOX-1 na proporção de 50%/50%.

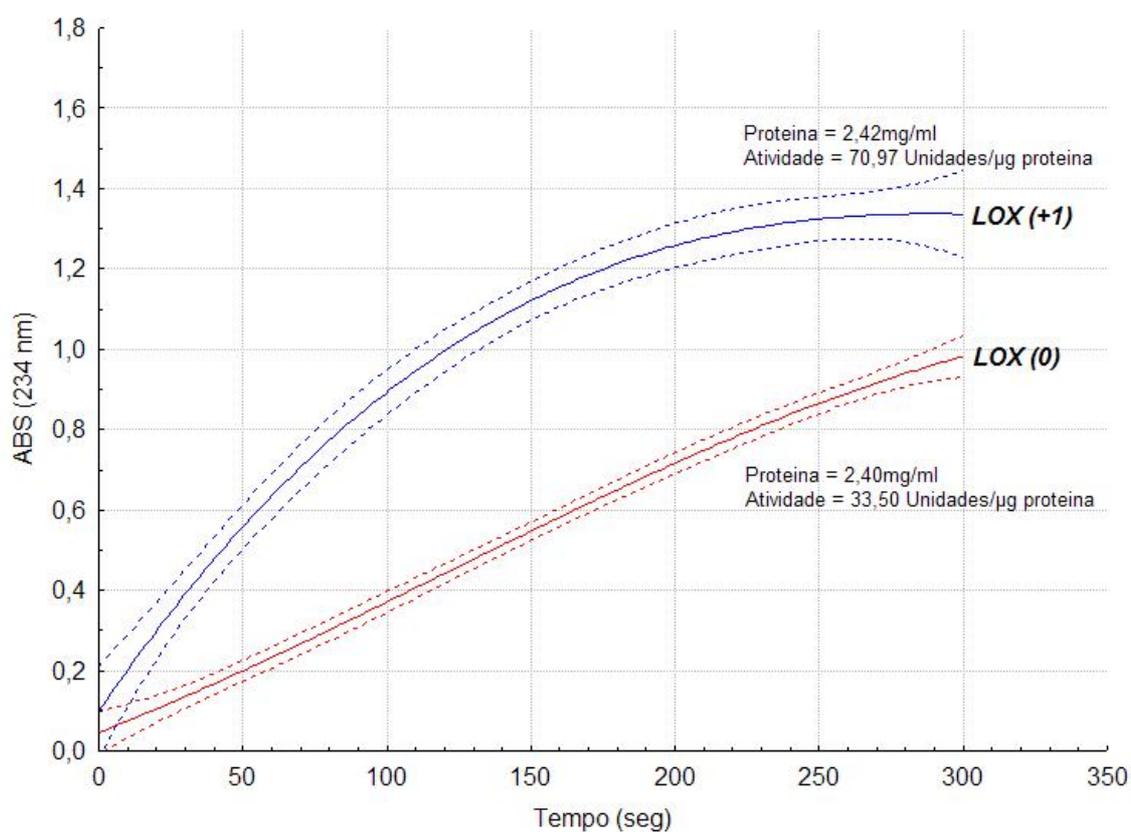


Figura 38. Atividade de lipoxigenase medida em amostras de farinha de soja. 1 unidade =  $\Delta$  de 0,001/min.

### 8.3 Propriedades reológicas

As informações obtidas no Farinógrafo para as três farinhas de trigo são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros do farinógrafo para as amostras de farinha de trigo

Características da Farinha	Farinha de Trigo	Farinha de Trigo	Farinha de Trigo
	(-1)	(0)	(+1)
<b>Classificação</b>	<b>fraca</b>	<b>média</b>	<b>forte</b>
Umidade (%)	13,0	13,1	12,7
Absorção de água (corrigido para 500 BU)	59,9	60,2	60,0
Absorção de água (corrigido para 14%)	58,7	59,1	58,5
Tempo de desenvolvimento da massa (min)	2,0	2,2	11,5
Estabilidade (min)	10,2	12,0	19,8
Índice de tolerância (BU)	43,0	34,0	16,0
Tempo para 'quebra' (breakdown) (min)	3,8	4,4	19,6

Essas informações podem contribuir para estimar o desempenho de panificação das farinhas e devem ser discutidas em conjunto com as curvas do alveógrafo apresentadas na Figura 39.

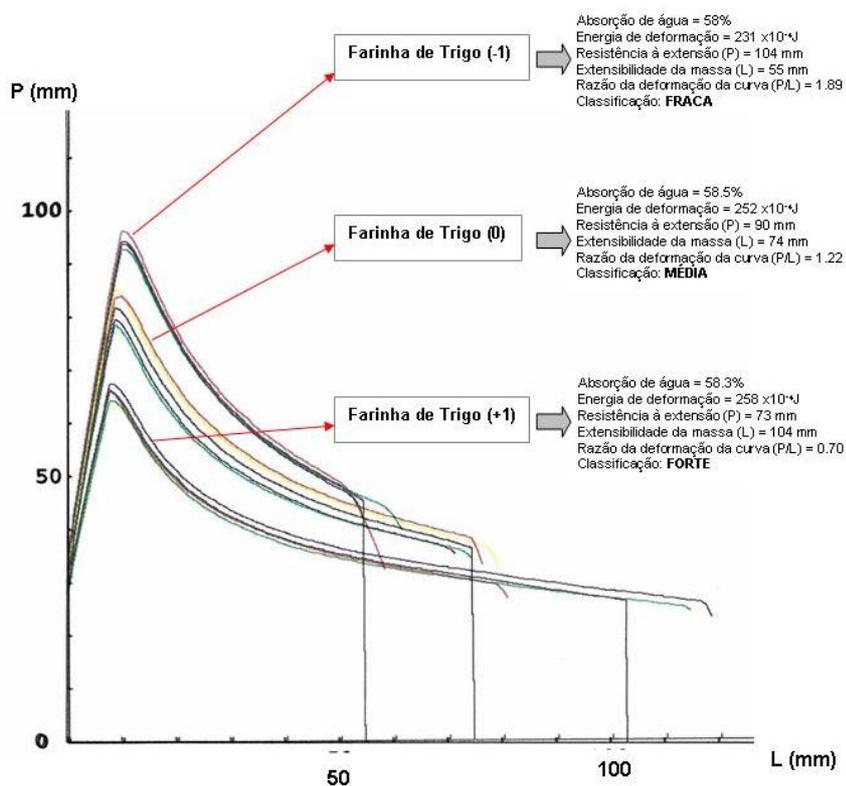


Figura 39. Alveograma das amostras de farinha de trigo aplicada no delineamento experimental.

A composição química associada às determinações farinográficas e alveográficas fornece uma indicação de desempenho das farinhas de trigo em panificação. Com base nessa indicação, as farinhas foram classificadas neste estudo como: (-1) fraca (0) média e (+1) forte.

#### 8.4 Avaliação sensorial, cor e volume dos pães

A Tabela 17 mostra que houve uma diferença significativa entre os ensaios ( $p < 0,01$ ) quando foi medido o volume específico dos pães ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ), qualidade sensorial e o parâmetro instrumental de cor (tonalidade amarela *b*). Essa é uma condição essencial para o ajuste dos modelos polinomiais.

Tabela 17. Volume específico, qualidade sensorial e tonalidade amarela dos pães.

ENSAIO	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Volume específico ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Qualidade sensorial	Tonalidade amarela <i>b</i>	n
1	-1.0	-1.0	0.0	6,4±0,6	6,9±0,42	15,9±0,4	9
2	1.0	-1.0	0.0	6,2±0,4	6,61±1,1	14,1±0,3	9
3	-1.0	1.0	0.0	8,7±0,3	8,1±0,5	15,8±0,5	9
4	1.0	1.0	0.0	9,0±0,3	8,3±0,6	12,6±0,5	9
5	-1.0	0.0	-1.0	6,0±0,3	7,2±1,0	16,2±0,3	9
6	1.0	0.0	-1.0	6,2±0,2	7,3±0,7	13,8±0,3	9
7	-1.0	0.0	1.0	8,3±0,3	7,2±1,0	15,5±0,4	9
8	1.0	0.0	1.0	8,8±0,4	7,2±0,8	13,1±0,5	9
9	0.0	-1.0	-1.0	5,8±0,4	7,1±0,7	14,4±0,5	9
10	0.0	1.0	-1.0	6,7±0,3	7,3±0,4	13,4±0,2	9
11	0.0	-1.0	1.0	7,2±0,6	5,2±0,8	14,4±0,3	9
12	0.0	1.0	1.0	9,9±0,4	7,6±0,8	12,9±0,3	9
13	0.0	0.0	0.0	7,7±0,5	7,8±0,7	13,5±0,6	27
$p^2$	-	-	-	< 0,01	< 0,01	< 0,01	-

<sup>1</sup>Variáveis codificadas onde  $x_1$ =atividade da enzima lipoxigenase na farinha integral de soja (LOX),  $x_2$ = força da farinha de trigo e  $x_3$ =tempo de fermentação.

<sup>2</sup>Valor da probabilidade (*p*) para a diferença entre os treze tratamentos.

#### 8.5 Modelos polinomiais

A Tabela 18 apresenta os coeficientes obtidos na modelagem dos dados experimentais apresentados na Tabela 17. Observa-se que não houve falta de ajuste significativa e que os valores experimentais obtidos a partir da

formulação de um ponto aleatório ( $x_1 = -0,25$ ,  $x_2 = 0,34$  e  $x_3 = 0,83$ ) não diferiram estatisticamente dos valores estimados pelos respectivos modelos

Baseado nos modelos polinomiais apresentados na Tabela 18, a variação observada da lipoxigenase foi significativa somente para a resposta da tonalidade amarela (*b*).

Tabela 18. Regressão linear, coeficientes de interação quadrática e interação linear-linear para os modelos polinomiais de segunda ordem.

Fatores	Volume	Qualidade	Tonalidade ( <i>b</i> )
	específico	Sensorial	
Constante ( $\beta_0$ )	7,5 ± 0,04	7,8 ± 0,1	13,6 ± 0,1
LOX ( $\beta_1$ )	-	-	-1,2 ± 0,1
W ( $\beta_2$ )	0,9 ± 0,07	0,7 ± 0,1	-0,5 ± 0,1
Tempo ( $\beta_3$ )	1,2 ± 0,05	-0,2 ± 0,1	-0,2 ± 0,1
LOX x LOX ( $\beta_{11}$ )	-	-	0,9 ± 0,1
W x W ( $\beta_{23}$ )	-	-0,4 ± 0,1	-
T x T ( $\beta_{33}$ )	-	-0,6 ± 0,1	-
LOX x W ( $\beta_{12}$ )	-	-	-0,3 ± 0,1
LOX x T ( $\beta_{13}$ )	-	-	-
W x T ( $\beta_{23}$ )	0,5 ± 0,07	0,5 ± 0,1	-
<i>p</i> (falta de ajuste)	0,100	0,491	0,184
$^1R^2$	0,88	0,46	0,87
Valor previsto <sup>2</sup>	8,40	8,12	12,65
Valor observado <sup>2</sup>	8,4 ± 0,3	8,2 ± 0,6	13,00 ± 0,22
$p^3$	0,79	0,89	0,26

<sup>1</sup> $R^2$  é a proporção da variação explicada pelo modelo ajustado.

<sup>2</sup>Valor aleatório para as variáveis codificadas.

<sup>3</sup>Probabilidade obtido pelo teste *t* para variáveis independentes contra um valor fixo.

A Figura 40 e a Figura 41 mostram a variação do efeito do branqueamento da lipoxigenase, satisfatoriamente descrito pela regressão de segunda ordem, quando o tempo de fermentação varia de 2 a 6 h e quando a força da farinha varia de 231 a 258 x 10<sup>-4</sup> Joules. Observa-se o efeito da lipoxigenase na tonalidade amarela (*b*) de acordo com diferentes tempos de fermentação (2 a 6 h), usando uma farinha de força média (245 x 10<sup>-4</sup> Joules) para formular os pães ( $x_2 = 0$ ).

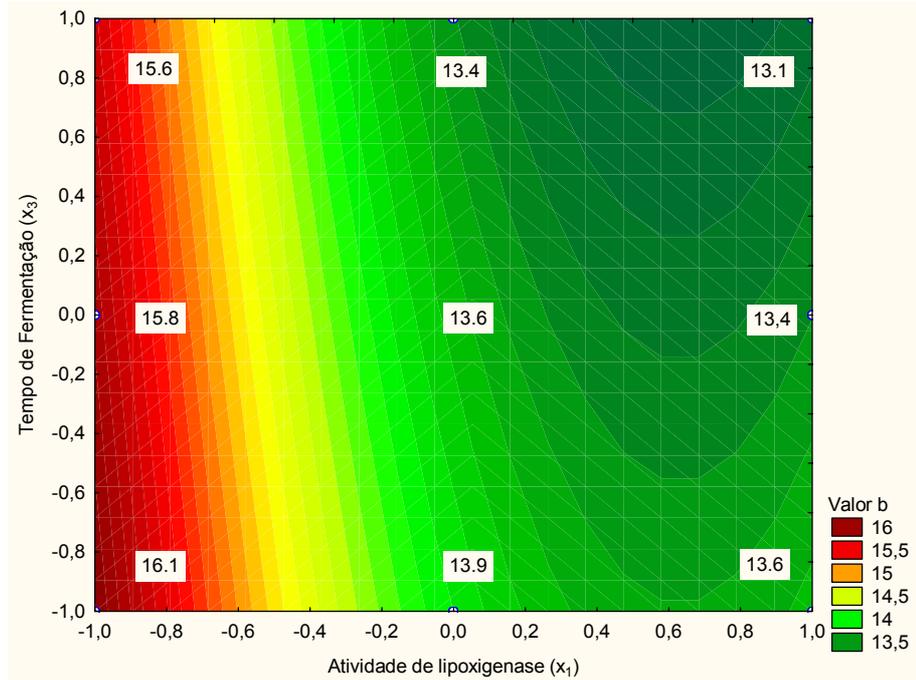


Figura 40. Curvas de contorno relativas ao efeito de branqueamento no miolo do pão (valor  $b$ ) resultante da variação da atividade da lipoxigenase ( $x_1$ ) e o do tempo de fermentação ( $x_3$ ), adotando-se a força média da farinha de trigo ( $x_2 = 0$ ).

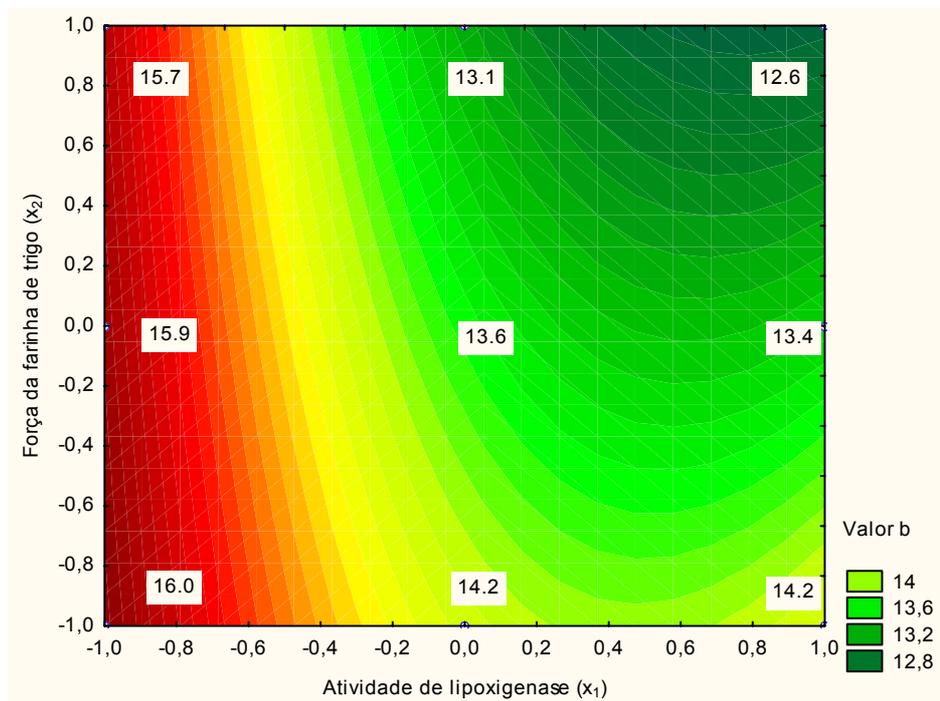


Figura 41. Curvas de contorno relativas ao efeito de branqueamento no miolo do pão (valor  $b$ ) resultante da variação da atividade da lipoxigenase ( $x_1$ ) e o da força da farinha ( $x_2$ ), adotando-se o tempo médio de fermentação ( $x_3 = 0$ ).

Observa-se o efeito da variação de atividade da lipoxigenase na tonalidade amarela (b) de acordo com a variação da força da farinha (231 a 258 x 10<sup>-4</sup> Joules), submetida a 4 h de fermentação (x3=0).

## 9. DISCUSSÃO

*“Your theory is crazy, but it's not crazy enough to be true.”*  
Niels Bohr (1885-1962). Prêmio Nobel de Física (1922).

O presente trabalho procurou estudar como a lipoxigenase da soja interage com outros compostos habitualmente usados na indústria de panificação em duas etapas:

1<sup>a</sup>) como proporções diferentes de cada composto promoveriam modificações de cor e de reologia na farinha de trigo, e posteriormente, quais alterações físico-químicas, sensoriais e reológicas poderiam ser observadas nos pães formulados com essas farinhas;

2<sup>a</sup>) procurou-se também, identificar uma proporção otimizada entre os três compostos que explorasse o sinergismo funcional e sensorial, buscando branqueamento de carotenóides com as melhores propriedades reológicas.

A seguir, buscou-se uma melhor compreensão de como a ação da enzima lipoxigenase pode ser alterada em função da força da farinha e do tempo de fermentação da massa. Com base nos resultados obtidos os seguintes tópicos foram levantados para a discussão:

- **Pode-se afirmar que a farinha de soja ativa integral utilizada neste estudo apresentou alta atividade de lipoxigenase fração 1 (LOX1)?**

A atividade enzimática da farinha de soja utilizada neste estudo (71 unidades/ µg/ml de proteína) foi considerada alta mediante a comparação com determinações de atividade em diversas variedades de soja (CD216, BR36, BRS184, CD201, BRS133, entre outras). A fração 1 da lipoxigenase foi escolhida para o presente estudo porque está mais associada à qualidade reológica e de cor em panificação que as demais frações encontradas na soja (KLEIN *et al.*, 1984; CUMBEE; HILDEBRAND; ADDO, 1997; SERPEN; GÓKMEN, 2006) e a atividade desta fração na farinha de trigo foi ausente, eliminando assim a possibilidade de interferência.

É importante ressaltar a dificuldade em comparar os valores de atividade enzimática para LOX1 na literatura porque os autores costumam

expressá-la de formas diferentes. Por exemplo: unidades/g de amostra; nmol de oxigênio consumido/segundo;  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido/min;  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido/g de farinha; nmols de dienos conjugados/segundo/mg de proteína.

A decisão de se usar farinha de soja sem lipoxigenase (não-transgênica) como padrão negativo de atividade e não simplesmente a inativação térmica dos grãos usados para processar a farinha ativa foi baseada no seguinte ensaio: farinha de soja integral ativa contendo alta atividade de LOX1, caracterizada neste estudo como LOX +1 foi submetida a tratamento térmico (150 °C/3 min), de acordo com Ribotta *et al.* (2004). No entanto, nenhuma proteína foi extraída quando aplicado o mesmo método para medir a atividade da lipoxigenase nas amostras originais. Este fato pode ter sido devido a mudanças estruturais causadas pela desnaturação da proteína, que por sua vez, influencia propriedades funcionais como a solubilidade. Modificações no pH tampão e concentrações de sal não alteraram os resultados. Por essa razão, foi escolhido utilizar uma farinha integral obtida de grãos de soja sem lipoxigenase como padrão (-1), sendo o ponto central (0) resultado de uma mistura 50%/50% de ambas as amostras. Foi interessante observar que essa mistura das duas farinhas produziu uma atividade enzimática média linear, não apresentando interações que pudessem favorecer ou inibir a atividade da enzima.

- **Porque a mistura de lipoxigenase a ácido ascórbico apresentou sinergia na resistência à extensão da massa?**

Os resultados reológicos iniciais na farinha de trigo sugeriram que a lipoxigenase poderia ter favorecido o efeito do ácido ascórbico no aumento da elasticidade da massa ( $P$ ) conforme pode ser visto na Figura 25. A mistura FIS+AA, contendo 250 ppm de ácido ascórbico e 0,5% de lipoxigenase promoveu um aumento na elasticidade na massa maior que aquele observado na presença de 500 ppm de ácido ascórbico e 1% de FIS isoladamente, sugerindo que a lipoxigenase poderia contribuir para oxidação do ácido ascórbico em ácido desidroascórbico.

Nas avaliações sensoriais dos pães, aqueles formulados com a mesma proporção de farinha integral de soja e ácido ascórbico mostraram maior elasticidade e maciez que o controle. As evidências encontradas nesse estudo sugerem que a lipoxigenase da soja seria capaz de participar como um catalisador na oxidação do ácido ascórbico para ácido desidroascórbico que é o melhorador efetivo na reologia dos pães. Essa hipótese foi sugerida anteriormente em uma publicação de Cherdkiatgumchai e Grant (1986), porém sem detalhamento do mecanismo bioquímico.

A base teórica para essa hipótese é dada pelo papel catalítico dos íons de metais de transição na oxidação do ácido ascórbico para ácido desidroascórbico (STAUFFER, 1990; LARSON, 1997a). Segundo Eberhardt (2001), o íon metálico ( $Fe^{+2}$ ) pode facilitar a transferência de um elétron do ascorbato ( $AH^-$ ), que é a forma tautomérica predominante do ácido ascórbico:  $[AH_2 \rightleftharpoons AH^- + H^+]$  (BENDICH; MACHLIN; SCANDURRA, 1986; WIRSTA *et al.*, 2003) para o oxigênio, de acordo com as seguintes etapas:



A oxidação consiste basicamente de duas etapas de transferência de um elétron. O primeiro passo é a transferência de um elétron do  $Fe^{2+}$  para o  $O_2$  que se torna um anion superóxido reativo (equação 3). O segundo passo é a transferência de um elétron do ascorbato para o íon férrico, tornando-o  $Fe^{3+}$  e o próton ( $H^+$ ) para o anion superóxido (equação 4). Na etapa 5, o ascorbato radical perde um elétron para a molécula de  $O_2$ , tornando-se um ácido desidroascórbico (Figura 42).

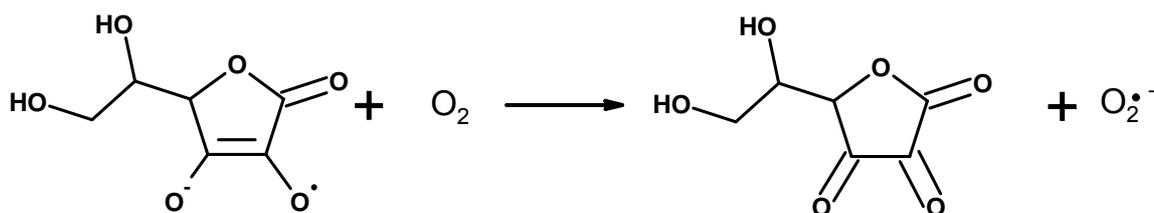


Figura 42. Oxidação do ascorbato radical para ácido desidroascórbico na presença de oxigênio, correspondente à etapa (5) da reação acima descrita.

Fonte: Eberhardt (2001) [adaptado].

Uma questão importante acerca dessa hipótese é que, para ser aceita seria necessário que íons de ferro estivessem livres para reagir com o ascorbato. Neste caso, existiriam duas possíveis fontes do ferro: o ferro presente na soja e o ferro suplementado na mistura. O tipo de ferro escolhido para ser suplementado na mistura foi o ferro quelato em função de sua maior biodisponibilidade no pH fisiológico e também porque, segundo informação do fabricante (NAME, 2007), não haveria liberação do íon no pH 5,5, que é o pH da massa. Os resultados obtidos das amostras controle, em relação às misturas, evidenciaram que o ferro presente no ferro quelato não participou da reação proposta.

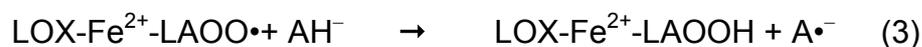
O ferro presente na soja também pode ter duas fontes: uma seria o próprio ferro endógeno da semente, que normalmente está ligado à fitatos (LYNCH, 1997), e o outro seria o ferro presente nas moléculas de lipoxigenase, que por sua vez estaria extremamente protegido por complexação e portanto, não disponível (SPITELLER, 2005).

Uma possível resposta para essa pergunta foi apresentada por Spitteller (2005). O autor afirma que durante a homogeneização (processo que ocorre durante o método de determinação da atividade da enzima, assim como durante o processo de moagem da soja), ocorre o rompimento e dano celular severo, destruindo a proteção da proteína que blinda os íons de ferro, resultando em liberação parcial dos íons metálicos. Um outro subproduto da homogeneização é que esse dano também ative as fosfolipases que clivam fosfolipídios gerando grandes

quantidades de ácidos graxos polinsaturados livres que são substrato para a ativação da enzima de  $\text{Fe}^{+2}$  para  $\text{Fe}^{+3}$ .

A análise da concentração de ferro mostrou que a farinha de soja proveniente de soja com lipoxigenase tinha mais ferro do que a farinha da soja sem lipoxigenase. Desta forma, não foi possível confirmar se a reação catalítica com o ácido ascórbico foi causada pela maior concentração de ferro naturalmente presente na farinha de soja com lipoxigenase, ou pela presença da enzima, que contém ferro.

Uma hipótese semelhante também foi proposta por Roy e Kulkarni (1996) que vem a se somar e reforçar a hipótese central da sinergia entre a lipoxigenase e o ácido ascórbico. Estes autores concluíram que o ácido ascórbico poderia agir como um substrato a ser cooxidado na presença de ácidos graxos polinsaturados pela lipoxigenase de acordo com as seguintes etapas:



ou



É interessante observar que apesar dos autores proporem a síntese do ácido desidroascórbico através da reação com  $\text{H}^+$  (equação 5) é possível que esta etapa também ocorra, pela reação com o oxigênio (equação 4) conforme sugerido por Eberhardt (2001).

Além destas etapas de transformação do ácido ascórbico para o ácido desidroascórbico, Roy, Sajan e Kulkarni (1995) observaram que a lipoxigenase da soja pode também co-oxidar GSH para GSSH, contribuindo diretamente para a melhora da massa, uma vez que a oxidação do GSH é responsável por minimizar a despolimerização das proteínas do glúten (GROSCH; WIESER, 1999).

Considerando como estes estudos se entrelaçam, há evidências a partir dos resultados do presente trabalho de que a lipoxigenase da soja possa participar da ação reológica melhoradora do ácido ascórbico. A interação entre a lipoxigenase e o ácido ascórbico pode ser proposta de duas formas: 1ª) de acordo com a primeira hipótese, conforme Eberhardt (2001) onde o Ferro da LOX é o elemento que reage com o ácido ascórbico (Figura 43), ou 2ª) de acordo com a segunda hipótese, proposta por Roy, Sajan e Kulkarni (1995) onde a lipoxigenase ligado ao peróxido radical reage diretamente com o ácido ascórbico (Figura 44).

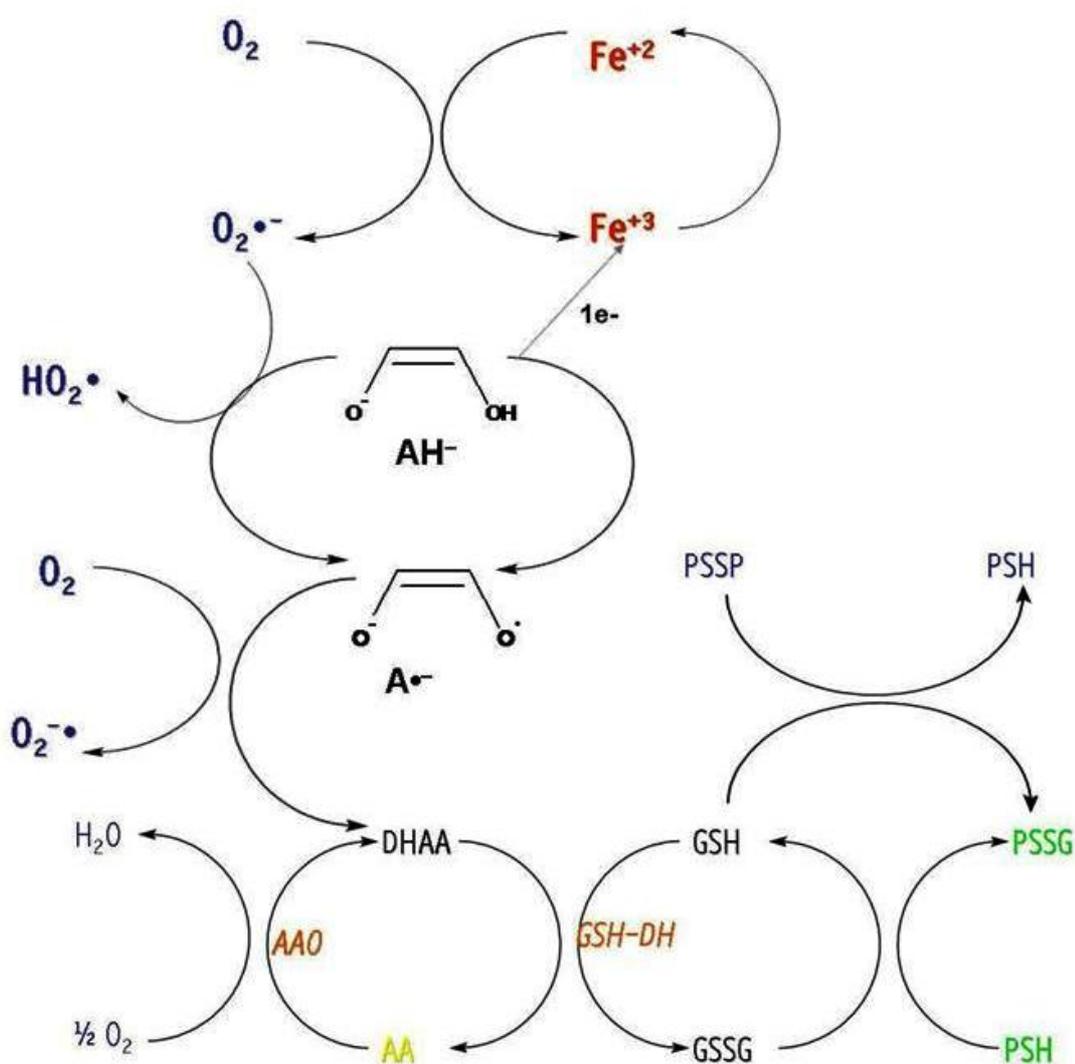


Figura 43. Mecanismo proposto para a interação entre o ferro e o ácido ascórbico na panificação.

Fonte: Eberhardt (2001) [adaptado].

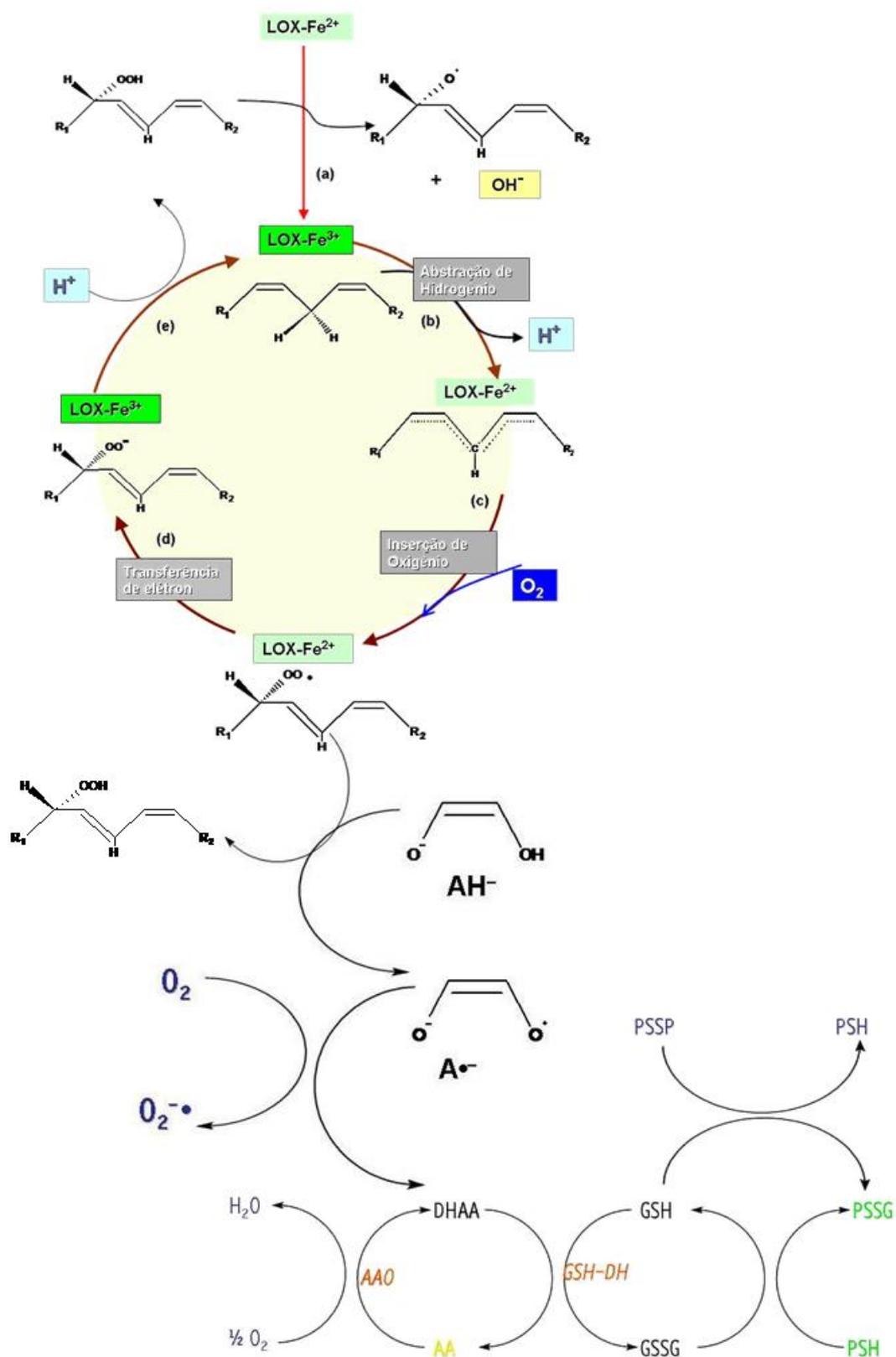


Figura 44. Mecanismo proposto para a interação entre a LOX e o ácido ascórbico na panificação.

Fonte: Roy, Sajjan e Kulkarni (1995) [adaptado].

- **Quais foram os efeitos causados pelo peróxido de benzoíla?**

Um resultado inesperado foi que o oxidante peróxido de benzoíla alterou negativamente a reologia, aumentando significativamente a extensibilidade da massa e diminuindo sua elasticidade. Uma das hipóteses está nos estudos de Visschers e Jongh (2005) que verificaram que resíduos cisteína nas proteínas ocorrem na forma de sulfidrilas livres (CSH) ou oxidadas (CSSC), formando pontes SS. Os resíduos de cisteína podem exibir grande reatividade química a um elevado número de compostos, diretamente relacionada ao  $pK_a$  (em torno de 8,3), o que implica que a reatividade é fortemente reduzida em condições ácidas. Já foi demonstrado que para a panificação, a reatividade química de proteínas contendo cisteína estabiliza as células gasosas na matriz protéica do glúten (MOREL *et al.*, 2002). O metabólito mais estável na decomposição do peróxido de benzoíla é o ácido benzóico (SAIZ; MANRIQUE; FRITZ, 2001) que, produzido na reação com os carotenóides, pode ter sido suficiente para promover condições levemente ácidas, diminuindo a elasticidade da massa.

O efeito de branqueamento, com redução da cor amarela na farinha, foi causado pela adição de peróxido de benzoíla, uma vez que a atividade de água nessa matriz é insuficiente para a ação da lipoxigenase. Os provadores identificaram o efeito do peróxido de benzoíla medido instrumentalmente e esse fato justifica a aplicação desse aditivo nas farinhas comerciais obtidas com alto grau de extração. No entanto, um dos produtos da sua reação é o ácido benzóico que pode causar danos à saúde (INCHEM, 2007), justificando-se a necessidade da redução desse aditivo artificial nos produtos processados.

- **Por que a farinha de soja e o ácido ascórbico branquearam o miolo dos pães?**

Os ensaios com pães relativos à tonalidade amarela indicaram que a presença da lipoxigenase na mistura foi responsável por valores mais baixos de cor (*b*) devido a sua capacidade de oxidar carotenóides, tanto pela via aeróbica como anaeróbica. A interação com ácido ascórbico está

associada ao aumento de volume dos pães, e que leva à diluição dos carotenóides na superfície iluminada analisada pelo colorímetro, apontando valores menores de pigmentos amarelos.

- **Efeito do ácido ascórbico, força da farinha e tempo de fermentação nas características reológicas dos pães.**

Como já esperado, o ácido ascórbico foi a principal variável responsável pelo aumento do volume específico. O volume dos pães depende de dois principais fatores: o aumento do gás produzido e a capacidade de retenção de gás da massa, este último sendo regido pela matriz do glúten (Clarke *et al.*, 2003) que é reforçada pela ação melhoradora do ácido ascórbico conforme já discutido. Os resultados instrumentais e sensoriais também evidenciaram que o ácido ascórbico melhora a textura dos pães, mas também demonstraram que os pães com a mistura de farinha de soja com ácido ascórbico resultaram na melhora destes parâmetros comparados ao controle.

A força da farinha de trigo e o tempo de fermentação foram as principais variáveis para as respostas de volume específico e qualidade sensorial. A interação positiva observada entre a força da farinha e volume específico está de acordo com os resultados obtidos por Boggini, Tusa e Pogna (1995) e Rao, Mulvany e Dexter (2000) que correlacionaram positivamente o volume específico com o índice *W*. No entanto, as informações sobre tempo de fermentação e volume dos pães são ainda controversas. Os autores Zghal, Scanlon e Sapisten (2001) observaram que o tempo de fermentação aumentou significativamente o volume dos pães assim como alterou as propriedades mecânicas e de estrutura, devido principalmente à grande redução na densidade do miolo. Entretanto, Gómez *et al.* (2004) observaram que, com tempo mais longo de fermentação, a matriz do glúten perdeu estabilidade nos pães normais, produzindo pães de menor volume. Neste estudo, os resultados mostraram que tempo de fermentação mais extensos tiveram efeitos positivos no volume, mas contribuíram negativamente para a qualidade sensorial, confirmando que

volume é apenas um atributo notado entre outros parâmetros avaliados pelos provadores.

- **Por que a Lipoxigenase não alterou a reologia?**

Muito embora a lipoxigenase seja conhecida por promover melhor reologia da massa e maior volume (HOSENEY *et al.*, 1980; ADDO *et al.*, 1993; DELCROS *et al.*, 1993; MOREL; REDL; GUILBERT, 2002; JUNQUEIRA *et al.*, 2007), os pães com lipoxigenase ativa neste trabalho não exibiram esse efeito. Os autores Kerr, Faubion e Hosenev (1992) demonstraram que o efeito da lipoxigenase ocorreu durante a mistura na presença de oxigênio. Talvez essa seja uma das questões mais polêmicas sobre os resultados, porque apesar de ter sido observado uma melhora no parâmetro alveográfico *P*, o volume não se alterou. Entre as possíveis hipóteses pode-se citar: 1º) a presença de fortes compostos que na panificação agem como oxidantes (ácido ascórbico e azodicarbonamida) na formulação dos pães pode ter mascarado o efeito da lipoxigenase que produz variações reológicas menores quando comparadas aos compostos pró-oxidantes tradicionais. A decisão de se utilizar uma mistura de composto pró-oxidantes na formulação dos pães foi devido ao fato de massas sem esses compostos produzirem pães franceses disformes, sem volume e descaracterizados, não refletindo a realidade para o consumo regular (Figura 32) e também porque na prática a lipoxigenase seria adicionada às farinhas já contendo esses compostos. 2º) a decisão de se fazer pães do tipo 'francês'. Ao contrário do pão de forma utilizada como modelo na primeira etapa deste estudo, o pão do tipo francês não tem sustentação física para o crescimento da massa, exigindo farinhas fortes e/ou oxidantes para obtenção de volume. Como no Brasil a força da farinha apresenta grande variabilidade, o uso de oxidantes para se fazer pães franceses se torna uma prática regular e quase obrigatória frente os hábitos da população. Ou seja, é possível que o efeito da ação da lipoxigenase no volume tivesse sido evidenciado caso o pão de forma tivesse sido produzido em lugar do pão francês.

Desta forma, a hipótese reológica na segunda parte deste estudo não pode ser verificada, uma vez que a lipoxigenase não teve efeito no volume e nas respostas de qualidade sensorial.

- **Por que a lipoxigenase interagiu com o tempo de fermentação e com a força da farinha na redução da tonalidade amarela (valor *b*)?**

Houve uma interação positiva nos pães entre a adição de lipoxigenase e a força das farinhas. Esse efeito pode ser explicado pelo fato de que altos índices de extração normalmente praticados pelos moinhos de trigo incorporam mais casca e fragmentos de aleurona, acrescentando assim pigmentos carotenóides, glutatona e lipases, causando a típica cor amarela (FORTMANN; JOINER, 1971) e reduzindo o desempenho de panificação (GROSCH; WIESER, 1999; CARR; DANIELS; FRAZIER, 1992).

Portanto, estes fatos sugerem que farinhas obtidas com índices de extração baixos são fortemente correlacionadas com maior brancura e índices *W* altos, produzindo pães com miolo mais branco. Na presença de lipoxigenase, essas farinhas produzem pães com valores *b* acentuadamente reduzidos devido ao efeito de branqueamento da enzima tornar-se mais visível em um ambiente com menor quantidade de carotenóides. Isto nos leva a ponderar que, mesmo usando farinhas fortes com alto índice *W*, a suplementação com lipoxigenase proporciona uma vantagem adicional na oxidação de carotenóides.

Ainda analisando o efeito da lipoxigenase na cor, vimos que embora menos expressiva que as outras duas variáveis, o tempo de fermentação reduziu levemente os valores da tonalidade amarela (*b*), efeito que se torna muito mais relevante na presença de lipoxigenase, sugerindo a ação rápida da enzima; um dado novo, sem estudos conhecidos que tragam essa medida. A queda subsequente durante o tempo de fermentação pode ser explicada devido à oxidação natural dos pigmentos carotenóides, causada pelo efeito combinado do oxigênio e do calor, e pela diluição desses pigmentos na superfície iluminada analisada pelo colorímetro, diluição esta resultante do aumento do volume dos pães.

## 10. CONCLUSÕES

A partir dos ensaios realizados neste estudo pode-se concluir que:

- Através do uso de técnicas estatísticas como a MSR, foi possível modelar respostas reológicas e sensoriais em pães resultantes da alteração da atividade da lipoxigenase da soja, presença de compostos que agem como oxidantes como ácido ascórbico e peróxido de benzofila, força da farinha e tempo de fermentação.
- Houve sinergismo entre a atividade da lipoxigenase da soja e o ácido ascórbico no reforço da cadeia do glúten, evidenciado pela elasticidade da massa, em farinhas de trigo obtidas com elevado grau de extração.
- A lipoxigenase da soja é uma enzima de ação rápida no branqueamento dos pigmentos carotenóides presentes na farinha de trigo, exibindo interação positiva com a força da farinha e com o tempo de fermentação.
- Desta forma, a aplicação de lipoxigenase da soja associada às técnicas de MSR pode ser considerada como uma excelente alternativa à redução do atual volume de aditivos adicionadas na formulação de pré-misturas usadas em panificação.

---

## 11. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

A partir das conclusões obtidas neste estudo, algumas questões precisariam ser ainda pesquisadas.

- Qual a fonte do ferro que pode estar atuando como catalisador da oxidação do ácido ascórbico nas propriedades reológicas dos pães? Seria o ferro endógeno da soja ou o ferro da lipoxigenase?
- Qual fração da lipoxigenase é efetivamente responsável pelas alterações reológicas nas massas e nos pães? Essa fração é a mesma que promove as alterações de cor? Existe interação?
- Mais estudos também podem ser conduzidos para esclarecer qual a diferença de atuação entre a lipoxigenase proveniente da farinha de soja e a lipoxigenase microbiana aplicada em conjunto com ácido linoléico.

## 12. REFERÊNCIAS \*

AACC INTERNATIONAL. Table of Contents: 44-15A, 46-11A, 54-30A, 08-01, 54-21. In: \_\_\_\_\_. **Approved Methods Online. Approved Methods AACC**. 10.ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 2000. Disponível em: <http://www.aaccnet.org/ApprovedMethods/top.htm>. Acesso em 21 jul. 2006.

AAMODT, A.; MAGNUS, E.; FÆRGESTAD, E. Effect of flour quality, ascorbic acid, and DATEM on dough rheological parameters and hearth loaves characteristics. **Journal of Food Science**, v.68, n.7, p.2201-2210, 2003.

ABIP. Padarias de todo o Brasil realizam megacampanha de doação de pães. **21.09.2005**. Disponível em: [www.abip.org.br/pt/dia\\_mundial\\_pao/Noticia1.asp](http://www.abip.org.br/pt/dia_mundial_pao/Noticia1.asp). Acesso em 21.jul.2006.

ADDO, K.; BURTON, D.; STUART, M.R.; BURTON, H.R.; HILDEBRAND, D.F. Soybean flour lipoxygenase isozyme mutant effects on bread dough volatiles. **Journal of Food Science**, v.58, n.3, p.583-585, 1993.

AMERICAN INGREDIENTS COMPANY. **Benzoyl Peroxide Technical Bulletin B060**, Kansas, 1998. 1p.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. Champaign: AOCS, 1995. met.955.04, 940.22.

ARAÚJO, W.M.C.; CIACCO, C.F.; CAMARGO, C.R. Efeito da adição de farinha de soja desengordurada como fonte de lipoxigenase ativa nas características reológicas da massa de farinha de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.3, p.288-293, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. Champaign: AOAC, 1985. p.505

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. Champaign, IL, 1995.

AUTIO, K.; LAURIKAINEN, T. Relationship between flour/dough microstructure and dough handling and baking properties. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.181-185, 1997.

AXELROD, B.; CHEESBROUGHT, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods in Enzymology**, v.71, p.441-451, 1981.

---

\* As referências estão de acordo com a norma NBR 6023/2002, preconizada pela associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Andando na superfície de resposta. In:\_\_\_\_\_. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. São Paulo: Editora da Unicamp, 2001. p.251-300.

BELITZ, H.D.; KIEFFER, R.; SEILMEIER, W.; WIESER, H. Structure and functions of gluten proteins. **Cereal Chemistry**, v.63, n.4, p.336-341, 1986.

BENDICH, A.; MACHLIN, L.; SCANDURRA, O. The antioxidant role of vitamin-C. **Advances in Free Radical Biology and Medicine**, v.2, n.2, p.419-444, 1986.

BLOKSMA, A.H. Thioland disulfide groups in dough rheology. **Cereal Chemistry**, v.52, p.170R-183R, 1975.

BOGGINI, G.; TUSA, P.; POGNA, N.E. Breadmaking quality of durum wheat genotypes with some novel glutenin subunit composition. **Journal of Cereal Science**, v.22, p.105-113, 1995.

BOX, G.E.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.13, n.1, p.1-45, 1951.

BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley, 1987. 688p. (Wiley series in probability and mathematical statistics. Applied probability and statistics).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.354, de 18 de julho de 1996**. Aprovar a norma técnica referente a farinha de trigo. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=69&word=>. Acesso em: 10 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n.385, de 5 de agosto de 1999a**. Aprova o "Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a Categoria de Alimentos 6 - Cereais e Produtos de ou a Base de Cereais". Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=119&word=>. Acesso em: 10 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.386, de 5 de agosto de 1999b**. Aprova o "Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções", contendo os Procedimentos para Consulta da Tabela e a Tabela de Aditivos Utilizados Segundo as Boas Práticas de Fabricação. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11541&word=>. Acesso em: 10 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.344, de 13 de dezembro de 2002**. Aprova o Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante do anexo desta Resolução. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679&word=>. Acesso em: 10 set. 2003.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comercio Exterior. **Sistema de análise das informações de comércio exterior via Internet**. Disponível em: <http://alicesweb.mdic.gov.br>. Acesso em: 12 mar. 2005.

BRENDA: THE COMPREHENSIVE ENZYME INFORMATION SYSTEM. **glutathione-disulfide**. Disponível em: [www.brenda.uni-koeln.de](http://www.brenda.uni-koeln.de). Acesso em: 18 set. 2005.

CARR, N.O.; DANIELS, N.W.R.; FRAZIER, P.J. Lipid interactions in breadmaking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, n.3, p.237-258, 1992.

CASEY, R.; WEST, S.I.; HARDY, D.; ROBINSON, D.S.; WU, Z.; HUGHES, R.K. New frontiers in food enzymology: recombinant lipoxygenases. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.297-302, 1999.

CHELLQUIST, E.; GORMAN, W. Benzoyl peroxide solubility and stability in hydric solvents. **Pharmaceutical Research**, v.9, n.10, p.1341-1346, 1992.

CHEN, X.; SCHOFIELD, J.D. Determination of protein-glutathione mixed disulfides in wheat flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.9, p.2362-2368, 1995.

CHERDKIATGUMCHAI, P.; GRANT, R. Enzymes that contribute to the oxidation of L-ascorbic acid in flour/water systems. **Cereal Chemistry**, v.63, n.3, p.197-200, 1986.

CHUNG, K.C. Cereal lipids. In: LORENZ, K.J.; KULP, K., eds. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap.13, p.497-554. (Food science and technology, 41).

CHUNG, O.; POMERANZ, Y.; FINNEY, K. Wheat flour lipids in breadmaking. **Cereal Chemistry**, v.55, n.5, p.598-618, 1978.

CLARKE, C.I.; SCHOBER, T.J.; ANGST, E.; ARENDT, E.K. Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat bread quality. **European Food Research and Technology**, v.217, n.1, p.23-33, 2003.

COFFA, G.; IMBER, A.N.; MAGUIRE, B.C.; GURUNATHAN, L.; SCHNEIDER, C.J. GAFFNEY, B.J.; BRASH, A.R. On the relationships of substrate orientation, hydrogen abstraction, and product stereochemistry in single and

double dioxygenations by soybean Lipoxygenase-1 and its Ala542Gly mutant. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.46, p.38756-38766, 2005.

COHEN, B.; GROSSMAN, S.; KLEIN, B.; PINSKY, A. Pigment bleaching by soybean lipoxygenase type-2 and the effects of specific chemical modifications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.837, p.279-287, 1985.

CONAB. **Informação pessoal dada por Gustavo Bracale, técnico de planejamento**. Brasília, 2006. [Comunicação pessoal].

CORNELL, H.J.; HOVELING, A.W. **Wheat: chemistry and utilization**. Lancaster: Technomic, 1998. p.1-43.

CORNELL, J.A. **Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data**. 2.ed. New York: John Wiley, 1990. p.60-61. (Wiley series in probability and mathematical statistics. Applied probability and statistics section).

CUMBEE, B.; HILDEBRAND, D.F.; ADDO, K. Soybean flour lipoxygenase isozymes effects on wheat flour dough rheological and breadmaking properties. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.281-294, 1997.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides and proteins. In: FENNEMA, O.R., ed. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.6, p.321-429. (Food science and technology).

DELCROS, J.; RAKOTOZAFY, L.; BOUSSARD, A.; DAVIDOU, S.; PORTE, C.; POTUS, J.; NICOLAS, J. Effect of mixing conditions on the behavior of lipoxygenase, peroxidase and catalase in wheat flour doughs. **Cereal Chemistry**, v.75, n.1, p.85-93, 1998.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, p.214-219, 1980.

DOBRSZCZYK, B.; MORGENSTERN, M. Rheology and the breadmaking process. **Journal of Cereal Science**, v.38, p.229-245, 2003.

DONG, W.; HOSENEY, C. Effects of certain breadmaking oxidants and reducing agents on dough rheological properties. **Cereal Chemistry**, v.72, n.1, p.58-64, 1995.

DUBBS, W.; GRIMES, H. Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybeans pod walls and mark a unique cell layer. **Plant Physiology**, v.123, p.1269-1279, 2000.

EBERHARDT, M.K. Antioxidants. In: \_\_\_\_\_. **Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences**. Boca Raton: CRC Press, 2001. cap.8, p.274.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; WIKSTROM, C. Mixture design generation, PLS analysis, and model usage. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.43, p.1-24, 1998.

ESTELLER, M.S. **Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento**. São Paulo, 2004. 248p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

EWART, J.A. Changes in flour thiols during storage, and improver action. **Food Chemistry**, v.30, p.231-240, 1988.

FAOSTAT. Production. Production of cereals and share in world. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 21 jul. 2006.

FAUBION, J.M.; HOSENEY, R.C. Lipoxygenase: it's biochemistry and role in breadmaking. **Cereal Chemistry**, v.58, n.3, p.175-180, 1981.

FERREIRA, V.L.P. **Princípios e aplicações da colorimetria em alimentos**. Campinas: ITAL, 1981. 85p. (Instruções técnicas n.19).

FEUSSNER, I.; KUHN, H. Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In: BORNSCHEUER, U.T. **Enzymes in lipid modification**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. cap.15, p.309-338.

FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v.53. p.275-297, 2002.

FONTOURA, C.; MARTINEZ, C. Grupo Bimbo vai às compras para se tornar líder mundial. In: McCANN ERICKSON. CIM. Ver todas as notícias. **11.05.2006**. Disponível em: [http://www.mccann.com.br/site/img/pdf\\_ci/Grupo%20Bimbo%20vai%20as%20compras%20para%20se%20tornar%20lider%20mundial.pdf](http://www.mccann.com.br/site/img/pdf_ci/Grupo%20Bimbo%20vai%20as%20compras%20para%20se%20tornar%20lider%20mundial.pdf). Acesso em: 21 jul. 2006.

FORTMANN, K.; JOINER, R. Wheat pigments and flour color. In: POMERANZ, Y., ed. **Wheat: chemistry and technology**. 2.ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1971. cap.10, p.493-501. (Monograph series, v.3).

FRANKEL, E.N. **Lipid oxidation**. 2.ed. Bridgewater: Oily Press, 2005. p.25-30. (Oily press lipid library, v.18).

FRAZIER, P. Coupled Oxidation [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por rjunqueira@exin.com.br. em 10 janeiro de 2006.

FRAZIER, P. Lipid-protein interactions during dough development. In: BARNES, P.J., ed. **Lipids in cereal technology**. New York, London: Academic, 1983. cap.9, p.189-196. (Food science and technology).

FRAZIER, P.; BRIMBLECOMBE, F.; DANIELS, N.; EGGITT, P. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of doughs from fat-extracted and reconstituted wheat flours. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.28, p.247-254, 1977.

FRAZIER, P.; LEIGH-DUGMORE, F.; DANIELS, N.; EGGITT, P.; COPPOCK, B. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of wheat flour doughs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.24, p.431-436, 1973.

FRIMER, A.A.; GILINSKY-SHARON, P. Reaction of superoxide with ascorbic acid derivatives: insight into the superoxide-mediated oxidation of dehydroascorbic acid. **Journal of Organic Chemistry**, v.60, p.2796-2801, 1995.

FUKUSHIGE, H.; WANG, C.; SIMPSON, T.; GARDNER, H.; HILDEBRAND, D. Purification and identification of linolenic acid hydroperoxides generated by soybean seed lipoxygenases 2 and 3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.5691-5694, 2005.

GARCIA, R.; KAID, N.; VIGNAUD, C.; NICOLAS, J. Purification and some properties of Catalase from wheat germ (*Triticum aestivum* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1050-1057, 2000.

GARDNER, H.W.; TAKAMURA, H.; HILDEBRAND, D.; CROFT, K.P.C.; SIMPSON, T.D.; SALCH, Y.P. Oxylin pathway in soybeans and its physiological significance. In: PIAZZA, G.J., ed. **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes**. Champaign: AOCS Press, 1996. cap.9, p.162-175.

GELINAS, P.; POITRAS, E.; MCKINNON, C.M.; MORIN, A. Oxido-reductases and lipases as dough-bleaching agents. **Cereal Chemistry**, v.75, n.6, p.810-814, 1998.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W.S.; COURTIN, C.M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J.A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, n.1/3, p.12-30, 2005.

GÓMEZ, M.; DEL REAL, S.; ROSELL, C.; RONDA, F.; BLANCO, C.A.; CABALLERO, P.A. Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread quality. **European Food Research and Technology**, v.219, p.145-150, 2004.

GROSCH, W. Low-MW products of hydroperoxide reactions. In: CHAN, H.W.-S., ed. **Autoxidation of unsaturated lipids**. London, Orlando: Academic Press, 1987. cap.4, p.104.

GROSCH, W.; WIESER, H. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. **Journal of Cereal Science**, v.29, p.1-16, 1999.

GROSSMAN, S.; ZAKUT, R. Determination of the activity of LOX (lipoxygenase). In: GLICK, D., ed. **Methods of biochemical analysis**. New York: John Wiley, 1979. p.303-329.

GUTKOWSKI, L.C.; PAVANELLI, A.P.; MIRANDA, M.Z.; CHANG, Y.K. Efeito de melhoradores nas propriedades reológicas e de panificação da massa de farinha de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.1, p.11-16, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defences. In: \_\_\_\_\_. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press; New York: Clarendon Press, 1999a. cap.3, p.141. (Oxford science publications).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defences. In: \_\_\_\_\_. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press; New York: Clarendon Press, 1999b. cap.2, p.83. (Oxford science publications).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defences. In: \_\_\_\_\_. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press; New York: Clarendon Press, 1999c. cap.1, p.53. (Oxford science publications).

HE, H.; HOSENEY, C. Gas retention of different cereal flours. **Cereal Chemistry**, v.68, p.334-336, 1991.

HILDEBRAND, D. Genetics of soybean lipoxygenase. In: PIAZZA, G.J., ed. **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes**. Champaign: AOCS Press, 1996. cap.2, p.33-55.

HOSENEY, R.C. **Principles of cereal science and technology**. 2.ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1996. p.201-202.

HOSENEY, R.C.; RAO, H.; FAUBION, J.; SIDHU, J.S. Mixograph studies. IV. The mechanism by which lipoxygenase increases mixing tolerance. **Cereal Chemistry**, v.57, n.3, p.163-166, 1980.

IACAZIO, G.; MARTINI-IACAZIO, D. Properties and applications of lipoxygenases. In: BORNSCHEUER, U.T. **Enzymes in lipid modification**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. cap.16, p.338-359.

INCHEM: International Programme on Chemical Safety. **Concise international chemical assessment document no. 26**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad26.htm>. Acesso em: 2 abr. 2007.

JEREZ, A.; PARTAL, P.; MARTÍNEZ, I.; GALLEGOS, C.; GUERRERO, A. Rheology and processing of gluten based bioplastics. **Biochemical Engineering Journal**, v.26, n.2/3, p.131-138, 2005.

JONES, G.D.; RUSSELL, L.; DARLEY-USMAR, V.D.; STONE, D.; WILSON, M.T. Role of lipid hydroperoxides in the activation of 15-lipoxygenase. **Biochemistry**, v.35, p.7197-7203, 1996.

JUNQUEIRA, R.M.; CASTRO, I.A.; ARÊAS, J.A.G.; SILVA, A.C.C.; SCHOLZ, M.B.S.; MENDES, S.; OLIVEIRA, K.C. Application of response surface methodology for the optimization of oxidants in wheat flour. **Food Chemistry**, v.101, p.131-139, 2007.

KASARDA, D.; NIMMO, C.; KOHLER, G. Proteins and the amino acid composition of wheat fractions. In: POMERANZ, Y., ed. **Wheat: chemistry and technology**. 2.ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1971. cap.6, p.227-250. (Monograph series, v.3).

KAUFMANN, S.P.; FENNEMA, O. Evaluation of sulfhydryl oxidase as a strengthening agent for wheat flour doughs. **Cereal Chemistry**, v.64, p.172-176, 1987.

KERR, C.L.; FAUBION, J.M.; HOSENEY, R.C. Effects of lipoxygenase and yeast on the rheological properties of dough. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v.25, n.3, p.244-247, 1992.

KLAJN, V.M. **Avaliação de lipoxigenases em soja pela cooxidação do  $\beta$ -caroteno e ação destas enzimas no branqueamento de farinha de trigo**. Viçosa, 1991. 47p. Dissertação de Mestrado – Curso de Agroquímica – Universidade Federal de Viçosa.

KLEIN, B.P.; GROSSMAN, S.; KING, D.; COHEN, B.; PINSKY, A. Pigment bleaching, carbonyl production and antioxidant effects during the anaerobic lipoxygenase reaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.793, p.72-79, 1984.

KOEHLER, P. Concentration of low and high molecular weight thiols in wheat dough AS affected by different concentrations of ascorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.4948-4953, 2003.

KOEHLER, P. Effect of ascorbic acid in dough: reaction of oxidized glutathione with reactive thiol groups of wheat glutenin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.4954-4959, 2003.

KONICA MINOLTA. **Precise color communications**. 1998. 59p. Disponível em:  
[http://se.konicaminolta.us/support/product\\_applications/pdf/colorcommunications\\_app.pdf](http://se.konicaminolta.us/support/product_applications/pdf/colorcommunications_app.pdf). Acesso em: 21 jul. 2006.

KONOPKA, I.; FORMAL, L.; ABRAMCZYK, D.; ROTHKAEHL, J.; ROTKIEWICZ, D. Statistical evaluation of different technological and rheological tests of Polish wheat varieties for bread volume prediction. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.11-30, 2004.

KUHN, H.; BORCHERT, A. Serial review: regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, n.2, p.154-172, 2002.

LARSON, R.A. Autooxidation mechanisms. In: \_\_\_\_\_. **Naturally occurring antioxidants**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997b. cap.2, p.33.

LARSON, R.A. Phenolic and enolic antioxidants. In: \_\_\_\_\_. **Naturally occurring antioxidants**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997a. cap.5, p.98-100.

LÁSZTITY, R. **The chemistry of cereal proteins**. 2.ed. Boca Raton, London: CRC Press, 1996. p.19-117.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.93, p.47-56, 2005.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LYNCH, S. Interaction of iron with other nutrients. **Nutritional Review**, v.55, n.4, p.102-110, 1997.

MARTÍNEZ-ANAYA, M.A. Enzymes and bread flavor. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, n.9, p.2469-2480, 1996.

MATTERN, P.J. Wheat. In: LORENZ, K.J.; KULP, K., eds. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap.1, p.1-54. (Food science and technology, 41).

MATUDA, T. **Análise térmica da massa de pão francês durante os processos de congelamento e descongelamento**: otimização do uso de aditivos. São Paulo, 2004. 162p. Dissertação de Mestrado - Escola Politécnica - Universidade de São Paulo.

MCDONALD, C.E. Lipoxygenase and lutein bleaching activity of durum wheat semolina. **Cereal Chemistry**, v.56, n.2, p.84-89, 1979.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Advanced statistical methods. In: \_\_\_\_\_. **Sensory evaluation techniques**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.330-334.

MERCIER, M.; GÉLINAS, P. Effect of lipid oxidation on dough bleaching. **Cereal Chemistry**, v.78, n.1, p.36-38, 2001.

MOREL, M.; REDL, A.; GUILBERT, S. Mechanism of heat mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. **Biomacromolecules**, v.3, p.388-497, 2002.

MORRISON, W.; PANPAPRAI, R. Oxidation of free and esterified linoleic and linolenic acids in bread doughs by wheat and soya lipoxygenases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, p.1225-1236, 1975.

NAME, D.C. Dissociação do Ferrochel [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por robertoj@usp.br. em 01 março de 2007.

NELSON, M. Fatty acid radicals and the mechanism of lipoxygenase. In: PIAZZA, G.J., ed. **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes**. Champaign: AOCS Press, 1996. cap.5, p.80-94.

NICOLAS, J.; DRAPRON, R. Lipoxygeanse and some related enzymes in breadmaking. In: BARNES, P.J., ed. **Lipids in cereal technology**. New York, Londres: Academic Press, 1983. cap.10, p.213-235. (Food science and technology).

NICOLAS, J.; POTUS, J.; Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydations: exemples du role de la lipoxygenase en panification et de la polyphénoloxydase en technologie des fruits. **Sciences des Aliments**, v.14, p.627-642, 1994.

OKADA, K.; NEGISHI, Y.; NAGAO, S. Factors affecting dough breakdown during overmixing. **Cereal Chemistry**, v.64, n.6, p.428-434, 1987.

OLIVEIRA, D.A.; PIOVESAN, N.D.; MORAES, R.M.A.; ROCHEBOIS, G.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of three genotypic classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymic activity. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.1, p.71-74, 1998.

POMERANZ, Y. **Modern cereal science and technology**. New York: VCH, 1987. 486p.

PRIGGE, S.T.; BOYINGTON, J.C.; FAIG, M.; DOCTOR, K.S.; GAFFNEY, B.J.; AMZEL, L.M. Structure and mechanisms of lipoxygenases. **Biochimie**, v.79, p.629-636, 1997.

PRIGGE, S.T.; BOYINGTON, J.C.; GAFFNEY, B.J.; AMZEL, L.M. Lipoxygenases: structure and function. In: PIAZZA, G.J., ed. **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes**. Champaign: AOCS Press, 1996. cap.1, p.1.

PYLER, E.J. **Baking Science and Technology**. Kansas City: Sosland Publishing Company, 1998. p. 638.

RAO, V.K.; MULVANY, S.J.; DEXTER, J.E. Rheological characterization of long and short mixing flours based on stress-relaxation. **Journal of Cereal Science**, v.31, p.159-171, 2000.

RIBOTTA, P.; AUSAR, S.; MORCILLO, M.; PÉREZ, G.; BELTRAMO, D.; LÉON, A. Effect of storage of a soya-containing bread-improver on lipoxygenase activity, bleaching action and composition of volatiles in bread. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.14, p.1969-1974, 2004.

ROY, P.; KULKARNI, A. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: Effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, v. 34, p.563 -570, 1996.

ROY, P.; SAJAN, M.; KULKARNI, A. Lipoxygenase-Mediated Glutathione Oxidation and Superoxide Generation. **Journal of Biochemical Toxicology**, v. 10 n.2, p.111-120, 1995.

RUTH, S.M.; ROOZEN, J.P.; MOEST, R.A.F.J. Effect of storage of a soya-containing bread-improver on lipoxygenase activity, bleaching action and

composition of volatiles in bread. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v.25, n.1, p.1-5, 1992.

SAIZ, A.; MANRIQUE, G.; FRITZ, R. Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid levels by HPLC during wheat flour bleaching process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.98-102, 2001.

SCHILSTRA, M.J.; VELDINK, G.A.; VLIEGENTHART, J.F.G. The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron (III) lipoxygenase in solution. **Biochemistry**, v.33, n.13, p.3974-3979, 1994.

SCHOFIELD, J.D.; CHEN, X. Analysis of free reduced and free oxidized glutathione in wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v.21, p.127-136, 1995.

SERPEN, A.; GÖKMEN, V. Effects of  $\beta$ -carotene on soybean lipoxygenase: kinetic studies. **European Food Research and Technology**, v.224, p.743-748, 2006.

SERPEN, A.; GÖKMEN, V. A proposed mechanism for the inhibition of soybean lipoxygenase by  $\beta$ -carotene. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.401-406, 2006b.

SIGMA-ALDRICH. Product Search: **L6632**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail?ProdNo=L6632&Brand=SIGMA>. Acesso em: 17 jun. 2005.

SINDIPAN – AIPAN - SÃO PAULO. Amigo panificador, seja bem-vindo! Análise Setorial. **Números da panificação**. Disponível em: <http://www.sindipan.org.br/analise/numeros.htm>. Acesso em: 04 maio 2006a.

SINDIPAN – AIPAN - SÃO PAULO. **Análise setorial**. Disponível em: <http://www.sindipan.org.br/analise/aditivos.htm>. Acesso em: 04 maio 2006b.

SLUSARENKO, A.J. The role of lipoxygenase in plant resistance to infection. In: PIAZZA, G.J., ed. **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes**. Champaign: AOCS Press, 1996. cap.10, p.176-197.

SPITELLER, G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, p.999-1013, 2005.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, v.52, p.353-360, 1995.

STAUFFER, C.E. **Functional additives for bakery foods**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. cap.1, p.1-40.

THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR CROP & RESEARCH. **The wheat grain**. Disponível em: [www.bakeinfo.co.nz/cyberguide/wheat/grain.htm](http://www.bakeinfo.co.nz/cyberguide/wheat/grain.htm). Acesso em: 21 ago. 2005.

TIECKELMANN, R.E.; STEELE, R.E. Higher-assay grade of calcium peroxide improves properties of dough. **Food Technology**, v.45, n.1, p.106-112, jan. 1991.

TRONSMO, K.; MAGNUS, E.M.; BAARDSETH, P.; SCHOFIELD, J.D.; AADMOT, A.; FAERGESTAD, E.M. Comparison of small and large deformation rheological properties of wheat dough and gluten. **Cereal Chemistry**, v.80, n.5, p.587-595, 2003.

TRONSMO, K.; MAGNUS, E.M.; FAERGESTAD, E.M.; SCHOFIELD, J.D. Relationships between gluten rheological properties and hearth loaf characteristics. **Cereal Chemistry**, v.80, n.5, p.575-586, 2003b.

TSEN, C.C.; HLYNKA, I. The role of lipids in the oxidation of dough. **Cereal Chemistry**, v.39, p.209-219, 1962.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations**. Title 21 – Food and Drugs. Chapter I – Food and Drug Administration, Department of Health and Bakery Products. Subpart 136.110. Subsection 12. 2003. Disponível em: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_03/21cfr136\\_03.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/21cfr136_03.html). Acesso em: 30 set. 2003a.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations**. Title 21 – Food and Drugs. Chapter I – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Subpart 137.105. 2003. Disponível em: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_03/21cfr137\\_03.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/21cfr137_03.html). Acesso em: 30 set. 2003b.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations**. Title 21 – Food and Drugs. Chapter I – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Subpart 137.105. Subsection (14). 2003. Disponível em: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_03/21cfr136\\_03.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/21cfr136_03.html). Acesso em: 30 set. 2003c.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Grains: World Market and Trade**. 2005a. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/grain/circular/2005/09-05/graintoc.htm>. Acesso em: 19 set. 2005.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture. **National Nutrient Database for Standard Reference**. 2005b. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/>. Acesso em: 29 jun. 2005.

VISSCHERS, R.W.; DE JONGH, H.H. Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. **Biotechnology Advances**, v.23, p.75-80, 2005.

WADE Jr., L.G. **Organic chemistry**. 3.ed. Englewood Cliffs, London: Prentice Hall, 1995. 1233p.

---

WHITAKER, J.R. Lipoxygenases. In: ROBINSON, D.S.; ESKIN, A.M. **Oxidative enzymes in foods**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1991. cap.5, p.175-215.

WIRSTA, P.; LE DIZES, C.; L'HUILLIER, V.; LECORNU, C.; BOUSSARD, A. Le dosage de l'acide ascorbique dans des pains. **Industries des Céréales**, v.135, pt.1, p.2-6, 2003.

ZGHAL, M.C.; SCANLON, M.G.; SAPISTEN, H.D. Effects of flour strength, baking absorption and processing conditions on the structure and mechanical properties of bread crumb. **Cereal Chemistry**, v.78. p.1-7, 2001.

---

## 13. ANEXOS

ANEXO 1	Aprovação do Comitê de Ética	106
ANEXO 2	Artigo publicado no periódico <i>Food Chemistry</i> entitulado <i>Application of response surface methodology for the optimization of oxidants in wheat flour</i>	107
ANEXO 3	Artigo enviado para publicação no periódico <i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i> entitulado <i>Synergism between lipoxygenase-active soybean flour and ascorbic acid on rheological ad sensory properties of wheat bread</i>	108
ANEXO 4	Artigo enviado para publicação no periódico <i>Cereal Chemistry</i> entitulado <i>Proofing time influences the soybean lipoxygenase bleaching effect in breads prepared with weak and strong flours</i>	109
ANEXO 5	Aprovação FAPESP.	110
ANEXO 6	Cópia da ficha do aluno (histórico escolar parcial)	111

## ANEXO 1

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 052/2004

São Paulo, 02 de junho de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).  
Profa. Inar Alves de Castro  
FBA

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de maio p.p., **APROVOU** o projeto "Otimização de compostos oxidantes na degradação de pigmentos e melhoras nas propriedades reológicas da farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico" (Protocolo nº 248), apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser alterado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para uma linguagem mais acessível ao público leigo, sem jargões técnicos.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Dulcineia Saes Parra Abdalla**  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa da FCF/USP,

## ANEXO 2

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Food Chemistry 101 (2007) 131–139

---

**Food  
Chemistry**

---

[www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Application of response surface methodology for the optimization of oxidants in wheat flour

R.M. Junqueira<sup>a</sup>, I.A. Castro<sup>a,\*</sup>, J.A.G. Arêas<sup>b</sup>, A.C.C. Silva<sup>b</sup>, M.B.S. Scholz<sup>c</sup>, S. Mendes<sup>d</sup>, K.C. Oliveira<sup>a</sup><sup>a</sup> Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes 580 B14, 05508-900 São Paulo, Brazil<sup>b</sup> Department of Nutrition, Faculty of Nutrition, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715, 05508-900 São Paulo, Brazil<sup>c</sup> Paraná Agriculture Institute IAPAR/PR, Brazil<sup>d</sup> Cargill Food Ingredients Latin America, Rod. SP 141, KM 26/B 18270-000, Tatuí, SP, Brazil

Received 21 April 2005; received in revised form 3 January 2006; accepted 3 January 2006

---

**Abstract**

The objective of this study was to apply the statistical technique known as response surface methodology (RSM) to optimize the proportion between three oxidant compounds compromising lipoxygenase enzymes ( $x_1$ ), benzoyl peroxide ( $x_2$ ) and ascorbic acid ( $x_3$ ) on wheat flour colour and some rheological characteristics of the dough.  $P$ ,  $L$  and  $W$  parameters were obtained using a “Chopin” alveograph. Flour colour, characterized by brightness ( $L_c$ ) and hue ( $b$ ), was measured using a HunterLab colorimeter and was ranked visually by selected judges. Three regression models were fitted to the dependent variables  $P$ ,  $L$  and  $L_c$  and showed non-significant lack of fit ( $p > 0.114$ ) with an elevated determination coefficient (0.92, 0.84 and 0.94, respectively). A mixture containing 0.27% of  $x_1$ , 4.80 ppm of  $x_2$  and 325 ppm of  $x_3$  was obtained from the regression optimization and used for validating the models. These results suggest that, instead of the empirical methods, RSM can be applied to determine the optimal proportion between oxidant compounds normally used to improve colour and rheological parameters in wheat flour.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Optimization; Dough; Lipoxygenase; Ascorbic acid; Wheat flour

---

**1. Introduction**

Wheat flour protein quantity and quality constitute principal factors responsible for bread-making functionality by providing visco-elasticity to dough (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003; Tronsmo et al., 2003; Veraverbeke & Delcour, 2002). Prolamins are responsible for the viscosity and extensibility in a dough system whereas the glutelins provide elasticity. The prolamins and glutelins combine through covalent and non-covalent bonds to form the gluten complex, resulting in viscoelastic dough that has the ability to retain gas and produce a light baked product

(Linsay & Skerritt, 1999; Veraverbeke & Delcour, 2002). During bread-making, the polypeptide chains present in the gluten develop a viscoelastic matrix able to support the pressure from the gas produced by the fermentation process (Doxastakis, Zafiriadis, Irakli, Marlani, & Tananaki, 2002). Studies have demonstrated that these characteristics mainly result from the disulphide bonds formed by the oxidation of gluten sulphhydryl residues. This oxidation can lead to rearrangement of intra/inter chain disulphide bonds, resulting in better dough rheology (viscoelasticity), and improving stability of gluten matrix (Morel, Redl, & Guilbert, 2002). Peroxidation of lipid can also reduce its binding to gluten, resulting in more “free” polar lipids, beneficial for increased loaf volume and soft crumb (Xu, 2001). Natural aging during storage

---

\* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913652; fax: +55 11 38154410.  
E-mail address: [inar@usp.br](mailto:inar@usp.br) (I.A. Castro).

## ANEXO 3

Manuscript Central



The screenshot shows the Manuscript Central interface. At the top, there are navigation links: "Edit Account", "Instructions & Forms", "Log Out", and "Get Help Now". The journal logo "Journal of the Science of Food and Agriculture" and the Wiley logo are on the left. The ScholarOne Manuscript Central logo is on the right. Below the journal name, there is a breadcrumb trail: "Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation". A user login message states "You are logged in as Inar Castro". The main heading is "Submission Confirmation". A thank-you message reads: "Thank you for submitting your manuscript to *Journal of the Science of Food and Agriculture*." The submission details are as follows:

- Manuscript ID: JSFA-07-0250
- Title: Synergism between lipoxygenase-active soybean flour and ascorbic acid on rheological and sensory properties of wheat bread
- Authors: Junqueira, Roberto; Colli, Celia; Cocato, Maria; Castro, Inar
- Date Submitted: 21-Mar-2007

At the bottom of the details, there are two icons: "Print" and "Return to Dashboard".

Manuscript Central™ v3.52 (patent pending). © ScholarOne, Inc., 2006. All Rights Reserved.  
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.  
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The interaction between lipoxygenase-active soybean flour (LOX) and ascorbic acid (AA), on colour, rheological and sensory properties of wheat bread were studied with the aim of reducing the applied quantity of each in bread formulations. **RESULTS:** Ascorbic acid and lipoxygenase mixture improved bread crumb colour by increasing lightness (L) and lowering yellow hue (b) compared with CONTROL in a higher proportion than those expressed by the components alone, characterizing a synergist mechanism. No alterations were observed in rheological properties and flavour. Crumb colour of the LOX+AA bread measured by panelists was whiter than CONTROL. Also, LOX+AA bread showed higher springness and lower hardness than CONTROL. The iron content of active soybean flour was greater than the inactive one. Thus, it was not possible to know if the synergistic effect observed in this study was caused by soybean lipoxygenase or by the additional iron content of active flour. **CONCLUSIONS:** As LOX+AA breads contained half the amount of each ingredient, the results suggest that ascorbic acid added to active soybean flour can be an alternative to reduce additives for used in bread-mix formulations.

**Keywords:** Lipoxygenase, ascorbic acid, bread, synergy, rheology.

## ANEXO 4



Proofing time influences the soybean lipoxygenase bleaching effect in breads prepared with weak and strong flours.

Journal:	<i>Cereal Chemistry</i>
Manuscript ID:	CC-02-07-0043
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	28-Feb-2007
Complete List of Authors:	Junqueira, Roberto; Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Department of Food and Experimental Nutrition ROCHA, FABRICIO; Granotec do Brasil Moreira, Maurilio; Universidade Federal de Viçosa, BIOAGRO CASTRO, INAR; Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Department of Food and Experimental Nutrition
Area of Expertise:	Baking, Bread, Color, Dough, Enzyme, Rheology

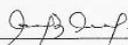


## ABSTRACT

Soybean lipoxygenase addition in wheat bread doughs is widely used to improve crumb color and rheology, but little is known about the variability of the activity of lipoxygenase under diverse breadmaking conditions. The objective of this study was to evaluate if shorter (2h) and longer (6h) proofing time varies soybean lipoxygenase effect in bleaching, sensory and rheological characteristics of breads prepared with weak and strong wheat flours. To investigate, the Response Surface Methodology was applied using a factorial design in three levels containing three factors designated as: exogenous lipoxygenase activity ( $x_1 = 0 - 71$  unit/ $\mu\text{g}$  of protein), wheat flour deformation energy ( $x_2 = 231 - 258 \times 10^{-4}$  J) and proofing time ( $x_3 = 2-6$  hr). Breads were randomly prepared and all assays were repeated three times to estimate the pure error of the models. Specific volume, sensory quality and yellowness were determined in all bread samples. Lipoxygenase activity had no significant effect on bread specific volume and sensory quality, however showed bleaching effects at all proofing times and flour strength assays. The best effect of lipoxygenase was observed after longer proofing times (6h) than shorter (2h) and in stronger flours than weaker flours. These results justify lipoxygenase addition in different extraction grade flours and in different baking conditions.

**Keywords:** Lipoxygenase, wheat strength, proofing time, bread, interaction.

## ANEXO 5 – Aprovação FAPESP

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO	
ADITIVO AO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO PROCESSO Nº 2003/13184-0	
O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada <b>OUTORGANTE</b> , resolveu alterar o Termo de Outorga inicial conforme segue, mantidas as "Condições Gerais de Concessão de Benefícios" do Termo de Outorga inicial.	
OUTORGADO - INAR ALVES DE CASTRO CPF: 949.188.568-53	
INSTITUIÇÃO 01 001 016 - FAC CIENCIAS FARMACEUTICAS/USP	
LINHA DE FOMENTO AUXILIO PESQUISA - REGULAR	
PROJETO OTIMIZAÇÃO DE COMPOSTOS OXIDANTES NA DEGRADAÇÃO DE PIGMENTOS E MELHORA NAS PROPRIEDADES REOLOGICAS DA FARINHA DE TRIGO ENRIQUECIDA COM FERRO E ACIDO FOLICO.	
ÁREA 05070000 - CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	PERÍODO 01/06/2004 a 31/03/2006
RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ: 30/05/2005 30/03/2006	PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ: 30/05/2005 30/03/2006
Pelo Conselho Técnico-Administrativo: 	
OBSERVAÇÕES - Qualquer alteração na destinação dos recursos concedidos, inclusive a utilização de saldos resultantes de diferença entre os preços previstos no projeto e os preços efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante. - Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que não sejam manifestamente necessários a realização deste projeto, a Outorgante poderá impugnar as despesas correspondentes na prestação de contas. - Imediatamente após a apresentação do relatório científico estabelecido pela FAPESP como relatório final, o saldo acaso existente será automaticamente cancelado. - O Outorgado reconhece que o auxílio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execução do projeto, salvo circunstâncias imprevisíveis no ato da assinatura. Solicitações de qualquer alteração de orçamento, exceto em casos emergenciais, poderão ser apresentadas por ocasião da apresentação do(s) relatório(s) científico(s). - Em se tratando de projetos da área de arqueologia, o Outorgado deverá adequar-se ao que determina a Constituição Federal e a Lei número 3924/61, devendo contactar o IPHAN (www.iphan.gov.br). - A aquisição de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega a FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da instituição na CENEN. - "A aquisição de bens ou pagamento de serviço de terceiros no exterior, realizados em moeda estrangeira, somente serão efetuados respeitada a disponibilidade orçamentaria da FAPESP".	

(08/06/2005) - 2

Página 1

**FAPESP**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
Formulário para parecer de Acompanhamento de Assessoria Científica  
Auxílio a Pesquisa  
(Este formulário está disponível em formato eletrônico no endereço [www.fapesp.br](http://www.fapesp.br))

Processo **03/13184-0 R**

Interessado(a): **Inar Alves de Castro**

**Parecer**  
(Comentários, críticas e sugestões têm se mostrado úteis para o aprimoramento de projetos.)

Esse relatório final consiste, basicamente, na compilação de 3 (três) artigos encaminhados a revistas internacionais de renome. São trabalhos consistentes, fortemente embasados em análise estatística e que refletem muito bem a otimização das formulações obtidas na pesquisa.

**RELATÓRIO APROVADO**

**ANEXO 6****Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial****9131 - 5034185/3 - Roberto de Moraes Junqueira Junior**

**Email:** [roberto@usp.br](mailto:roberto@usp.br)  
**Data de Nascimento:** 30/09/1966  
**Cédula de Identidade:** RG - 15.969.565 - SP  
**Local Nascimento:** Estado do Rio de Janeiro  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharel em Administração - Escola de Administração de Empresas de São Paulo - Fundação Getúlio Vargas - São Paulo - Brasil - 1988

**Curso:** Mestrado em Ciência dos Alimentos  
**Área:** Bromatologia  
**Data da Matrícula:** 10/02/2005  
**Início da Contagem de Prazo:** 10/02/2005  
**Data Limite:** 10/08/2007  
**Orientador(es):** Prof(a). Dr(a). Inar Alves de Castro - 10/02/2005 a -- E.Mail: inar@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 20/04/2005  
**Exame de Qualificação:** Aprovado em 12/09/2006  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Data máxima para aprovação da Banca:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Ocorrência:** Última matrícula em 12/02/2007

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
Atividade do Prog.	Participou no '2005 Program & Exhibit Directory', com o trabalho intitulado: "Effect of soy lipoxygenase, ascorbic acid, and benzoyl peroxide mixtures on wheat dough rheological and color properties", publicado em anais, v. 1, p. 18, 2005, New Orleans, Louisiana, Estados Unidos da América do Norte	16/07/2005	20/07/2005	-	1	0.00	-	-	-
NHA5701-3	Fundamentos	08/08/2005	16/10/2005	120	8	88.00	A	N	Concluída

	Biológicos da Nutrição Humana Aplicada								
FBA5882-3	Química e Bioquímica de Proteínas Alimentares	16/08/2005	26/09/2005	90	6	100.00	A	N	Concluída
Atividade do Prog.	Participou no 6º Simpósio Latino-Americano de Ciência dos Alimentos, com apresentação do trabalho: "Diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging activity of antioxidant mixtures evaluated by response surface methodology", publicado em anais, v. 1, p. 22, 2005, Campinas, São Paulo	07/11/2005	10/11/2005	-	1	0.00	-	-	-
FBA5842-2	Fisiologia, Bioquímica e Bioquímica Molecular Pós-Colheita I	17/04/2006	21/05/2006	45	3	100.00	A	N	Concluída
FBA5887-1	Atualidades em Ciência, Tecnologia e Mercado de Carnes	24/04/2006	30/04/2006	30	2	80.00	A	N	Concluída
FBA5888-3	Microrganismos Patogênicos em Alimentos II	15/05/2006	25/06/2006	90	6	90.00	A	N	Concluída
FBA5843-1	Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular Pós-Colheita II	22/05/2006	25/06/2006	45	3	100.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
<b>Disciplinas:</b>	25	25	<b>Disciplinas:</b>	30
<b>Atividades Programadas:</b>	0	0	<b>Atividades Programadas:</b>	0
<b>Seminários:</b>	0	0	<b>Seminários:</b>	0
<b>Estágios:</b>	0	0	<b>Estágios:</b>	0
<b>Total:</b>	25	25		30

**Créditos Atribuídos à Dissertação : 71**

<p>Conceito até 31/12/1996:  A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.</p> <p>Conceito a partir de 02/01/1997:  A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.</p> <p>Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.</p>
---

**Situação em:** 26/03/2007 18:43