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

**Efeitos da aplicação de transglutaminase na
fabricação do pão de forma**

Elisena Aparecida Guastaferrero Seravalli

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

São Paulo
2007

ELISENA APARECIDA GUASTAFERRO SERAVALLI

**Efeitos da aplicação de transglutaminase na
fabricação do pão de forma**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciência dos
Alimentos

Área de Concentração: Bromatologia
Orientador: Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

**São Paulo
2007**

19029

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013298

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S482e Seravalli, Elisena Aparecida Guastafarro
Efeitos da aplicação de transglutaminase na fabricação do
pão de forma / Elisena Aparecida Guastafarro Seravalli. --
São Paulo, 2007.
214p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador: Finardi Filho, Flavio

1. Cereal : Proteína : Ciência dos alimentos 2. Reologia :
Física dos alimentos I. T. II. Finardi Filho, Flavio, orientador.

641.331 CDD

Elisena Aparecida Guastaferrero Seravalli

Efeitos da aplicação de transglutaminase na fabricação do pão de forma

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, _____ de _____

Dedico às minhas filhas, Cecília e Fernanda, e minha mãe, pelo carinho e compreensão. Dedico ao Vitor, meu amor, que sempre me apoiou nos meus projetos e sonhos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Flavio Finardi Filho, pela orientação, apoio e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À Superintendência Executiva do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT), à Reitoria do Centro Universitário e à Direção da Escola de Engenharia Mauá, que sempre deram o incentivo e apoio necessários ao desenvolvimento deste trabalho, nas instalações do IMT.

Às empresas Danisco Brasil LTDA, Ajinomoto CO. INC., Bunge Alimentos S.A e Cargill Agrícola S/A pelo fornecimento de ingredientes, enzima transglutaminase e farinha de trigo, respectivamente.

A todos os técnicos de laboratório e planta piloto, e principalmente, a Inês Aparecida Santana, Camila Toledo, Marines dos Santos Nunes, Débora Tobias e Sidnei Ribeiro Moraes, da Escola de Engenharia Mauá e a todos os estagiários pelo apoio e força que me deram durante esses anos. Sem isso esse trabalho não teria sido realizado.

À Inês Aparecida Santana, obrigada por tudo.

Às minhas amigas, Antonia, Eliana e Cynthia pelas discussões, sugestões e principalmente pela amizade durante todos os anos de dedicação à carreira acadêmica.

Aos meus colegas da Escola de Engenharia Mauá, que de uma forma ou de outra me incentivaram durante esses anos de dedicação à tese.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Siglas	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 COMPOSIÇÃO DA MASSA DE PÃO	5
2.2 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE PÃO	6
2.2.1 Etapas do processo	8
2.2.1.1 Mistura	8
2.2.1.2 Divisão e Modelagem	11
2.2.1.3 Fermentação	11
2.2.1.4 Assamento	13
2.2.1.5 Resfriamento	15
2.3 INGREDIENTES	15
2.3.1 Farinha de trigo	15
2.3.1.1 Grão	16
2.3.1.2 Produção	21
2.3.1.3 Composição	25
2.3.2 Água	39
2.3.3 Gordura	40
2.3.4 Açúcar	41

2.3.5 Fermento	42
2.3.6 Sal	42
2.3.7 Melhoradores	43
2.3.7.1 Amilases	43
2.3.7.2 Glicose Oxidase	44
2.3.7.3 Agentes oxidantes	46
2.3.7.4 Emulsificantes	48
2.3.7.5 Transglutaminase	51
2.4 QUALIDADE DO PÃO	74
2.4.1 Características Externas e Internas	74
2.4.2 Textura	75
2.4.2.1 Textura do Pão – Método TPA	75
2.4.2.2 Textura do Pão – Método TA	79
2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	80
3. OBJETIVOS	85
4. MATERIAIS E MÉTODOS	86
4.1 MATERIAIS	86
4.2 EQUIPAMENTOS	87
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES	88
4.3.1 Formulação	88
4.3.1.1 Testes preliminares: Ajuste de formulação	88
4.3.1.2 Influência da Enzima Transglutaminase	89
4.3.1.3 Ausência dos aditivos	89
4.3.1.4 Otimização da formulação	91
4.3.2 Processo de Fabricação do pão	93

4.3.3 Avaliação da qualidade da farinha de trigo (Análises físico-químicas e reológicas da farinha de trigo)	94
4.3.3.1 Umidade	94
4.3.3.2 Cinzas	94
4.3.3.3 Gordura	94
4.3.3.4 Proteína	95
4.3.3.5 Glúten úmido e seco	95
4.3.3.6 Acidez Titulável em Suspensão Alcoólica	95
4.3.3.7 Determinação eletrométrica do pH	96
4.3.3.8 Determinação da atividade da α -amilase	96
4.3.4 Avaliação da qualidade do pão	96
4.3.4.1 Determinação do volume específico do pão	97
4.3.4.2 Determinação da dureza do miolo	97
4.3.4.3 Determinação da firmeza, elasticidade, coesividade, mastigabilidade e gomosidade do miolo do pão	99
4.3.5 Análises cromatográficas e eletroforéticas	101
4.3.5.1 Extração de albuminas, globulinas e prolaminas	101
4.3.5.2 Extração de gluteninas	102
4.3.5.3 Alquilação das gluteninas	102
4.3.5.4 Condições utilizadas para CLAE fase reversa	103
4.3.5.5 Análises Eletroforéticas	104
4.3.6 Análise Estatística	105
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
5.1 AJUSTE DE FORMULAÇÃO	106
5.2 INFLUÊNCIA DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE	108
5.3 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO	116
5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	138
5.4.1 Análises físico-químicas da farinha de trigo	138

5.4.2 Análises físico-químicas das massas e pães	140
5.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ELETROFORÉTICAS	144
5.5.1 Caracterização das gliadinas da farinha, das massas e dos pães	144
5.5.2 Caracterização das gluteninas da farinha, das massas e dos pães	161
6. CONCLUSÕES	178
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
8. ANEXOS	
ANEXO I	198
ANEXO II	199
ANEXO III	200
ANEXO IV	202
ANEXO V	203
ANEXO VI	204
ANEXO VII	206
ANEXO VIII	207
ANEXO IX	208
ANEXO X	210
ANEXO XI	211
ANEXO XII	212
ANEXO XIII	214

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação do trigo no Brasil.	19
Tabela 2.2 - Usos do trigo.	21
Tabela 2.3 - Comparação entre as safras de cereais de 2005 e 2006.	23
Tabela 2.4 - Comparação entre as safras de cereais de 2006 e 2007.	24
Tabela 2.5 - Dependência de Ca^{+2} na atividade da TGase de microorganismo e da TGase de fígado de porquinho-da-índia.	55
Tabela 2.6 - Especificidade da MTGase para substratos sintéticos.	56
Tabela 2.7 Afinidade da MTGase pelos seus substratos.	64
Tabela 2.8 - Ação da MTGase nas propriedades funcionais da proteínas alimentares.	65
Tabela 2.9 - Parâmetros da caracterização das TGases obtidas de diversas fontes.	67
Tabela 2.10 - Definições de parâmetros mecânicos de textura.	76
Tabela 2.11 - Interpretação da curva força-tempo (Figura 2.15) gerada pelo texturômetro.	77
Tabela 4.1 - Farinha de trigo e parâmetros físico-químicos.	86
Tabela 4.2 - Formulação do pão Controle, do pão Zero e do pão MTGase.	90
Tabela 4.3 - Níveis das variáveis do planejamento composto central.	91
Tabela 4.4 - Matriz de ensaios para o planejamento composto central.	92
Tabela 4.5 - Gradiente de eluição para as gliadinas.	103
Tabela 4.6 - Gradiente de eluição para as gluteninas.	104
Tabela 5.1 – Volumes, massa e volumes específicos para o pão Controle, pão Zero e pão MTGase.	109
Tabela 5.2 - Medidas para volume específico, dureza, firmeza, coesividade, gomosidade, elasticidade, mastigabilidade, para o pão Controle, pão Zero e pão MTGase.	112
Tabela 5.3 - Planejamento Experimental: Variáveis reais e codificadas e volume específico e dureza.	118

Tabela 5.4 - Parâmetros da regressão para o modelo do volume específico.	119
Tabela 5.5 - Análise de Variância do modelo codificado para o vol. específico	120
Tabela 5.6 - Parâmetros da regressão para o modelo da dureza.	125
Tabela 5.7 - Análise de Variância do modelo codificado para a dureza.	126
Tabela 5.8 - Planejamento Experimental: Variáveis reais e codificadas e firmeza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade.	131
Tabela 5.9 - Regressões das superfícies para as propriedades sensoriais dos pães.	132
Tabela 5.10 – Composição química da farinha de trigo na fabricação de pães	138
Tabela 5.11 – Valores de pH e acidez Titulável. Teores de glúten úmido e seco e <i>falling number</i> para farinha de trigo	139
Tabela 5.12 - Teores de umidade e proteínas das massas e pães	141
Tabela 5.13 Teores das frações protéicas das massas e pães	142
Tabela I.1 - Formulação do pão Controle, do pão Zero e do pão MTGase.	198
Tabela I.2 - Condições de processo de fabricação pão de forma	198
Tabela II.1 - Análise de Variância do modelo codificado para a formeza	199
Tabela V.1 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a elasticidade.	203
Tabela VIII.1 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a mastigabilidade.	207
Tabela XI.1 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a gomosidade.	211

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Fabricação de pão de forma pelo método de Massa Direta.	7
Figura 2.2 Ilustração diagramática de um grão de trigo (secção longitudinal).	16
Figura 2.3 Imagem tridimensional da LWM-GS. Detalhe do domínio C-terminal.	32
Figura 2.4 Imagem tridimensional da estrutura da gliadina.	35
Figura 2.5 Mecanismos propostos para ação da glicose-oxidase: (A) Formação da ligação cruzada dissulfeto (VEMULAPALLI, 1998); (B) Formação da ligação cruzada entre grupos fenólicos (AMEILLE et al., 2000)	45
Figura 2.6 Reação de acil-transferência entre resíduo glutamyl e amina primária catalisada pela TGase.	51
Figura 2.7 Reação entre resíduos protéicos de lisina e glutamina catalisada pela TGase.	52
Figura 2.8 Reação de deamidação do resíduo glutamyl catalisada pela TGase.	52
Figura 2.9 Estrutura primária da MTGase, com indicações de seqüências com conformações α -hélice e folha β .	57
Figura 2.10 Estrutura da MTGase. A- Vista frontal e B- Vista superior da molécula. O sítio ativo da enzima resíduo (Cys ⁶⁴) está representado pelo ponto C64 . A estrutura contém 11 α -hélices concentradas na extremidade amino-terminal e 8 folhas β na extremidade carboxi-terminal da molécula.	58
Figura 2.11 Modelo Van der WAALS da MTGase. A- Vista frontal. B- Vista Posterior. Os resíduos aromáticos e hidrofóbicos (Phe, Tyr, Val, Ile, Leu e Met), Cys ⁶⁴ , e os outros resíduos estão pintados de azuis, vermelho e verdes, respectivamente.	59
Figura 2.12 Pedacos reestruturados de carne de peixe e de frango.	60
Figura 2.13 Mecanismo hipotético de ação da MTGase nos seus substratos.	68
Figura 2.14 Mecanismo catalítico hipotético da MTGase.	69
Figura 2.15 Reação envolvida na medida da atividade MTGase (Método Hidroxamato).	70
Figura 2.16 Reação envolvida na medida da atividade MTGase (Método DMPDA).	71

Figura 2.17 Curva força em função do tempo gerada pelo texturômetro em análise de dupla compressão (TPA).	77
Figura 2.18 Curva típica obtida da deformação e ruptura do miolo do pão. A altura do pico denota força e a distância até a deformação, a extensibilidade do miolo.	78
Figura 2.19 Curva força em função do tempo gerada pelo texturômetro em análise de simples compressão (T.A).	80
Figura 4.1 Caixa desenhada para medição de volume do pão de forma.	97
Figura 4.2 Análise de textura do pão utilizando o analisador de textura TA-XT2i com acessório cilíndrico.	98
Figura 4.3 Exemplo da curva força-tempo gerada pelo texturômetro em análise de dupla compressão (TPA.)	100
Figura 4.4 Fatiadeira de pão de forma (Detalhe: fatias de 2,5 cm retiradas das extremidades e centro do pão).	101
Figura 5.1 Imagens obtidas do miolo do “Pão Zero”	106
Figura 5.2 Imagens obtidas do miolo do “Pão Controle”	107
Figura 5.3 Imagens obtidas do miolo do “Pão MTGase”	108
Figura 5.4 Altura atingida pelo pão quando utilizada a formulação livre de aditivos, “Pão Zero”.	110
Figura 5.5 Altura atingida pelo pão quando utilizada a formulação com 0,4% de emulsificante e 140 ppm de ácido ascórbico, “Pão Controle”.	110
Figura 5.6 Altura atingida pelo pão quando utilizada a formulação livre de aditivos e acrescida somente de 1% de enzima transglutaminase, “Pão MTGase”.	110
Figura 5.7 Comparação entre os Pães: “Pão Controle”, “Pão Zero” e “Pão MTGase”.	114
Figura 5.8 Relação entre os valores de volume específico previstos pelo modelo (equação 5.1) em função dos valores observados.	121
Figura 5.9 Superfície de resposta, para o volume específico, em função das concentrações de emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).	122
Figura 5.10 Contornos da resposta para o volume específico comparando	

a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).	123
Figura 5.11 Comparação entre os volumes específicos dos pães: 1- "pão Controle"; 2- "Pão Otimizado"; 3- "Pão MTGase" e 4- "pão Zero".	124
Figura 5.12 Relação entre os valores de dureza previstos pelo modelo (equação 5.2) em função dos valores observados.	126
Figura 5.13 Superfície de resposta, para a dureza, em função das conc. de emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).	127
Figura 5.14 Contornos da resposta para a dureza, comparando a interação entre os termos emulsif. (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).	128
Figura 5.15 Comparação entre os valores de dureza dos pães: 1- "pão Controle"; 2- "pão Otimizado"; 3- "pão MTGase" e 4- "pão Zero".	129
Figura 5.16 Comparação entre os valores de firmeza dos pães: 1- "pão Controle"; 2- "pão Otimizado"; 3- "pão MTGase" e 4- "pão Zero".	133
Figura 5.17 Comparação entre os valores de elasticidade dos pães: 1- "pão Controle"; 2- "pão Otimizado"; 3- "pão MTGase" e 4- "pão Zero".	134
Figura 5.18 Comparação entre os valores de mastigabilidade dos pães: 1- "pão Controle"; 2- "pão Otimizado"; 3- "pão MTGase" e 4- "pão Zero".	135
Figura 5.19 Comparação entre os valores de gomosidade dos pães: 1- "pão Controle"; 2- "pão Otimizado"; 3- "pão MTGase" e 4- "pão Zero".	136
Figura 5.20 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas utilizando C18.	146
Figura 5.21 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas utilizando C8 nas condições de eluição apresentadas na Tabela 5.15, mostrando as diferentes frações. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	147
Figura 5.22 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da farinha de trigo. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	149
Figura 5.23 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa ZM1 do pão Zero. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	150
Figura 5.24 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa ZM2 do pão Zero. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	150
Figura 5.25 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas do pão Zero. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	151

Figura 5.26 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa TGM1 do pão MTGase. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	152
Figura 5.27 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa TGM2 do pão MTGase. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	152
Figura 5.28 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas do pão MTGase. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	153
Figura 5.29: Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa CM1 do pão Controle. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	154
Figura 5.30: Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa CM2 do pão Controle I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	154
Figura 5.31: Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas do pão Controle. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.	155
Figura 5.32 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, de frações de gliadinas. As colunas estão numeradas pelos números de 1 a 9, que representam: 1- Padrões de peso molecular; 2- M1 do pão Zero; 3- M1 do pão MTGase; 4- M2 do pão Zero; 5- M2 do pão MTGase; 5- M2 do pão MTGase; 6- pão Zero; 7- pão com MTGase; 8- Farinha; 9- Farinha com MTGase.	157
Figura 5.33 Perfis densitométricos das frações de gliadinas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão Zero e da farinha de trigo. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão Zero após o assamento,	158
Figura 5.34 Perfis densitométricos das frações de gliadinas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão MTGase e da farinha de trigo adicionada de enzima. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão MTGase após o assamento.	160
Figura 5.35 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da farinha de trigo. I=subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II=subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).	162
Figura 5.36 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa ZM1 do Pão Zero. I=subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).	163

- Figura 5.37 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa ZM2 do pão Zero. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS). 164
- Figura 5.38 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas do pão Zero. 164
- Figura 5.39 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa TGM1 do pão MTGase. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS) 165
- Figura 5.40 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa TGM2 do pão MTGase. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS). 165
- Figura 5.41 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas do pão MTGase 166
- Figura 5.42 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, de frações de gluteninas. As colunas estão numeradas pelos números de 1 a 9, que representam: 1- Padrões de peso molecular; 2- M1 do pão Zero; 3- M1 do pão MTGase; 4- M2 do pão Zero; 5- M2 do pão MTGase; 5- M2 do pão MTGase; 6- pão Zero; 7- pão MTGase; 8- Farinha; 9- Farinha com MTGase. 171
- Figura 5.43 Perfís densitométricos das frações de gluteninas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão Zero e da farinha de trigo. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão Zero após o assamento. Os picos referem-se a: 1- 120 KDa; 2- 100/90 KDa; 3- 80 KDa; 4- 70 KDa; 5 – 60 KDa; 6- 50 KDa; 7- 40 KDa e 8- 30 KDa. 172
- Figura 5.44 Perfís densitométricos das frações de gluteninas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão MTGase e da farinha de trigo, e desta adicionada de enzima. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão MTGase após o assamento. Os picos referem-se a: 1- 120 KDa; 2- 100/90 KDa; 3- 80 KDa; 4- 70 KDa; 5 – 60 KDa; 6- 50 KDa; 7- 40 KDa e 8- 30 KDa. 174
- Figura II.1 Relação entre os valores de firmeza previstos pelo modelo em função dos valores observados. 199
- Figura III.1 Superfície de resposta, para a firmeza, em função das conc. de emulsificante(A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C). 200
- Figura IV.1 Contornos da resposta para a firmeza, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C). 202

Figura V.1 Relação entre os valores de elasticidade previstos pelo modelo em função dos valores observados.	203
Figura VI.1 Superfície de resposta, para a elasticidade, em função das concentrações de emulsificante(A), ácido ascórbico(B) e transglutaminase(C).	204
Figura VII.1 Contornos da resposta para a elasticidade, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).	206
Figura VIII.1 Relação entre os valores de mastigabilidade previstos pelo modelo em função dos valores observados.	207
Figura IX.1 Superfície de resposta, para a mastigabilidade, em função das conc. de emulsificante(A), ácido ascórbico(B) e transglutaminase(C).	208
Figura X.1 Contornos da resposta para a mastigabilidade, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).	210
Figura XI.1 Relação entre os valores de gomosidade previstos pelo modelo em função dos valores observados.	211
Figura XII.1 Superfície de resposta, para a gomosidade, em função das Concentrações de emulsificante(A), ácido ascórbico(B) e transglutaminase(C).	212
Figura XIII.1 Contornos da resposta para a gomosidade, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).	214

LISTA DE SIGLAS

AACC	American Association of Cereal Chemists
ABIP	Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria
ABITRIGO	Associação Brasileira da Indústria do Trigo
ACN	Acetonitrila
ACTIVA® STG-M	Preparação enzimática de transglutaminase microbiana
ADA	Azodicarbonamida
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
B-LMW-GS	B- Subunidades de gluteninas de baixo peso molecular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência – Fase Reversa
C-LMW-GS	C- Subunidades de gluteninas de baixo peso molecular
CNNPA	Comissão de Normas e Padrões para Alimentos
CSL	Estearoil-2-lactil lactato de cálcio
DATEM	Ésteres de ácido diacetil tartárico de mono e diglicerídios
D-LMW-GS	D- Subunidades de gluteninas de baixo peso molecular
DMPA	N,N-dimetil-1,4-fenilenediamina
DPE/ COAGRO	Diretoria de pesquisas / Coordenação de Agropecuária
DTT	Ditiotreitol
EC	Enzyme comission
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agricultural Organization
GCEA	Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias
GO	Glicose oxidase
GRAS	Geralmente reconhecidos como seguro

GSH	Glutation reduzido
HMW	Gluteninas de alto peso molecular
HMW-GS	Subunidades de gluteninas de alto peso molecular
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
J	Joules
JECFA	Comitê Conjunto da FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares
LMW	Gluteninas de baixo peso molecular
LMW-GS	Subunidades de gluteninas de baixo peso molecular
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MÉTODO TA	Método <i>Texture Analysis</i>
MÉTODO TPA	Método <i>Texture Profile Analysis</i>
MTGase	Transglutaminase Microbiana
OMS	Organização Mundial de Saúde
P/L	Relação entre tenacidade (P) e extensibilidade (L)
PER	Razão da eficiência protéica
PS 80	Polisorbato 80
PSI	Isolado protéico de soja
SDS-PAGE	Sódio dodecilsulfato poliacrilamida gel eletroforese (eletroforese em gel de policrilamida com SDS)
S-S-G	Glutation oxidado
SSL	Estearoil-2-lactil lactato de sódio
TFA	Ácido Trifluoracético
TGase	Transglutaminase
VB	Valor biológico
W	Força de glúten
Z-GLN-GLY	Carbobenzoxo-L-glutamil-glicina

RESUMO

SERAVALLI, E. A. G. **Efeitos da aplicação de transglutaminase na fabricação do pão de forma.** 2007. 215 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da adição da transglutaminase microbiana (MTGase) na fabricação de pão de forma, através do desenvolvimento de formulação ideal, com combinações de aditivos e enzima, e da avaliação do efeito da enzima nas proteínas, na massa crua, na massa após a fermentação e no produto final. Para comparar a qualidade dos pães produzidos com ou sem enzima, foram testadas três formulações: a básica, livre de aditivos (pão Zero); com a adição de emulsificante e ácido ascórbico (pão Controle); e a preparada com a formulação básica adicionada de enzima (pão MTGase). A avaliação da qualidade dos pães foi feita por meio de medidas físicas e instrumentais. A análise de textura foi realizada pelo método TPA (*Texture Profile Analysis*), cujas respostas de firmeza, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade podem ser correlacionadas com análises sensoriais. Paralelamente, de amostras de farinha, de massa e de pão foram obtidas as frações protéicas de gliadinas, gluteninas e os resíduos de extração. As gliadinas e as gluteninas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. Os resultados de volume e de firmeza dos diferentes pães apresentaram diferenças significativas a nível de 5%, em que as respostas do pão MTGase foram melhores que as do pão Zero, porém ainda inferiores às do Controle. A melhor formulação foi obtida por meio de um planejamento composto central, com variações nas concentrações de emulsificante, ácido ascórbico e enzima, com os resultados avaliados pela metodologia de superfície de resposta. Exceto para a coesividade, todos os outros parâmetros de volume, dureza (TA), firmeza, elasticidade, mastigabilidade e

gomosidade (TPA) apresentaram resultados positivos pela ação da transglutaminase a 0,6%, combinada com 0,2 % de emulsificante e 70 ppm de ácido ascórbico. Os resultados sugerem que a enzima foi capaz de modificar as propriedades químicas das proteínas, o comportamento reológico da massa e as propriedades funcionais do pão, melhorando a força da massa, a textura e o volume dos pães. As análises das frações gliadínicas apresentaram cerca de 3% de Nitrogênio total, em base seca, e as frações glutenínicas apresentaram entre 2 e 5% de Nitrogênio total. Os perfis cromatográficos e eletroforéticos dessas frações sugerem que as gliadinas não foram afetadas pela presença da enzima, que envolveram sobretudo as gluteninas. O conjunto de resultados indica que a aplicação de MTGase em associação com aditivos convencionais pode ser uma alternativa à panificação, embora os mecanismos de sua ação na massa não estejam completamente esclarecidos.

Palavras-chave: Transglutaminase. Proteínas do glúten. Pão de forma. Textura. Delineamento Experimental.

ABSTRACT

SERAVALLI, E. A. G. **Effects of transglutaminase application on breadmaking.** 2007. 215 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The application of microbial transglutaminase on weak gluten flour used in breadmaking was studied over the process. To verify the enzyme effects, three formulations were tested: Base formulation, characterized by the absence of enzyme and emulsifying agents; Control formulation, comprised by the presence of emulsifying agents and ascorbic acid and MTGase formulation, with the enzyme. Samples of flour, dough and bread were analyzed. The effect of enzyme on bread quality was estimated by parameters of Texture Analysis, Texture Profile Analysis and specific volume. The protein contents from those samples were determined by the total nitrogen in glutenin and gliadin fractions, that were also analyzed by RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography) and by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Although the MTGase bread did not reach the same quality parameters as those achieved by the Control samples, it showed as an alternative formulation to reduce the quantity of emulsifying agents and ascorbic acid as compared to the Control. The results indicate that the enzyme modified chemical and functional properties of glutenin fraction, improving dough strength and bread volume. Results of total nitrogen content, and electrophoretic and chromatographic profiles of the protein fractions suggest that while glutenin proteins were modified by enzyme, gliadin proteins were not affected.

Keywords: Transglutaminase. Protein, gluten. Bread. Texture. Experimental design.

1 INTRODUÇÃO

O trigo é um dos cereais mais importantes para o cotidiano humano. Sua história iniciou-se há cerca de 10 ou 12 mil anos, contribuindo de maneira vital para a fixação do homem à terra, nos primórdios da agricultura. Na forma de pão, o trigo está presente na mesa de todas as classes sociais, através de seus diversos tipos, desde os mais simples e populares até os mais elaborados e sofisticados.

O Brasil é seguramente um produtor de trigo competitivo. Tem mão-de-obra barata e, mais importante, pode contar com duas safras anuais. Com o aumento da população mundial, o Brasil é praticamente o único país a dispor de terras para a ampliação da agricultura em larga escala, principalmente nos Cerrados, onde têm-se evidenciado grande aumento na produção de grãos. São solos quimicamente pobres, mas facilmente corrigíveis, profundos, bem drenados, e, muitas vezes, planos, possibilitando a mecanização (ABITRIGO, 2007).

Várias pesquisas realizadas apresentam o valor do pão, do macarrão e outros derivados do trigo na alimentação do brasileiro. O consumo *per capita* no país poderia ser maior, hoje são consumidos 50 kg de farinha de trigo/ano, sendo o pão responsável por 54%, ou seja, 27 kg/*per capita* ano; as massas respondem por 12% , 5,9 kg/ano; os biscoitos por 11%, 5,5 kg/ano; a farinha de uso residencial, 10%, 5 kg/ano, e em outras aplicações temos 12%, 6 kg/ano. Portanto, os pães artesanais e industriais são os alimentos derivados do trigo mais consumidos no Brasil (ABITRIGO, 2007).

Segundo a ABIP (Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria, 2007), o segmento de Panificação e Confeitaria no Brasil é formado, por

aproximadamente, 52 mil estabelecimentos de pequeno e médio porte, gerando cerca de 600 mil empregos diretos, 1500 empregos indiretos, 105 mil empresários, com um faturamento anual em torno de 2% do PIB, hoje chegando a 24 bilhões de reais. Segundo a Associação, o mercado brasileiro apresenta grande oportunidade para o segmento, o consumo *per capita* hoje está, como média nacional, estabilizada em 33,11 Kg/ano. A Organização Mundial de Saúde (OMS), sugere 60 Kg/capita/ano e a Food Agricultural Organization (FAO), de 50 kg/capita/ano. Países da América Latina têm um consumo superior ao brasileiro, como a Argentina 73 kg/ano; o México 37 kg/ano e o Chile 88 kg/ano. Por isso grandes esforços têm sido desenvolvidos com o objetivo de provocar o aumento do consumo do pão, a médio prazo, em todo país (ABIP, 2007).

O aumento de consumo de derivados de trigo pode concretizar-se pela oferta de maior diversidade de produtos que sejam atraentes ao consumidor. Os processadores de alimentos têm buscado tecnologias inovadoras, tanto para produtos quanto para processos, que diversifiquem as opções de matérias primas e aumentem o lucro das empresas, mantendo a qualidade e a competitividade dos produtos elaborados. Por isso, a procura por novos ingredientes na indústria de alimentos tem crescido nos últimos anos e já é tendência mundial.

Dentre estes ingredientes inovadores, tem-se a enzima transglutaminase, reconhecida internacionalmente (OLIVEIRA, 2003). Acredita-se que melhoradores oxidantes são necessários para promover ligações cruzadas entre as proteínas trazendo efeitos benéficos à farinha. A introdução da enzima provoca também a formação de ligações cruzadas sem a utilização dos métodos oxidativos químicos. A transglutaminase (proteína-glutamina γ -glutamilttransferase, EC 2.3.2.13), catalisa

reações de acil-transferência, introduzindo ligações covalentes entre as proteínas (NONAKA et al., 1989). As ligações ϵ -(γ -Glu)-Lys se formam entre resíduos de lisina e glutamina sem perda da qualidade nutricional do resíduo de lisina (SEGURO et al., 1996).

O valor potencial da transglutaminase como um ingrediente alimentício sempre foi reconhecido, mas sua aplicação foi limitada devido à falta de uma fonte econômica da enzima (SINGH, 1991). O surgimento da transglutaminase microbiana derivada de processos fermentativos (ZHU et al., 1995) trouxe muitos avanços nas pesquisas de aplicação desta e em diferentes fontes protéicas. Assim, como é considerada uma enzima que ocorre naturalmente em tecidos animais e vegetais, e é destruída durante o cozimento, o seu uso já foi aprovado em produtos cárneos sem a necessidade de ser declarada nos rótulos dos produtos.

Muitas pesquisas são desenvolvidas na Europa e Japão na tentativa de aumentar cada vez mais o uso da enzima e com isso redução de custos de produção. Outras fontes de proteínas, além de carnes e peixes foram estudadas e muitos produtos apresentaram resultados importantes com relação à qualidade, propriedades funcionais, vida de prateleira e outros. Babiker et al. (1996), trabalhando com proteínas de soja adicionadas de enzima MTGase obtiveram aumento de solubilidade, aumento da capacidade emulsificante e espumante quando comparada à proteína nativa. As proteínas do leite, a caseína e as do soro, foram também exaustivamente estudadas. Produtos derivados como queijos e iogurtes apresentaram aumento de firmeza do gel e redução da perda de água de água por sinerese (FAEGEMAND; QVIST, 1999; LORENZEN; SCHLIMME, 1998; OLIVEIRA, 2003).

Grupos de pesquisas liderados por Gerrard (1998, 2000, 2001, 2002), na Nova Zelândia, e Rosell (2003, 2006), na Espanha, estudam aplicações da MTGase em produtos derivados de trigo com resultados promissores em promover o surgimento de um novo aditivo natural importante na fabricação de pães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O trigo é utilizado como alimento nas mais diferentes formas desde a Antiguidade, mas não se têm informações precisas sobre o início de seu cultivo. Relatos indicam que muitas décadas antes de Cristo já se cultivavam diversos tipos do cereal em regiões como China, Norte do Vale do Nilo e Mesopotâmia. O Egito é considerado como o local de origem do pão, assim como de outros produtos que sofrem fermentação (ABITRIGO, 2007).

No Brasil, a história do trigo teve início em 1534, quando as primeiras sementes foram trazidas da Europa e plantadas na Capitania de São Vicente, de onde foi difundida por todas as regiões, incluindo a Ilha de Marajó (ABITRIGO, 2007).

2.1 COMPOSIÇÃO DA MASSA DE PÃO

O pão é formado basicamente de farinha de trigo, água, fermento biológico e sal (cloreto de sódio). Entretanto outros componentes são adicionados em pequenas quantidades para melhorar as características da massa durante o processamento e do produto final. Estes componentes são o açúcar, a gordura vegetal, os emulsificantes, os agentes oxidantes e as enzimas (GIANNOU; KESSOGLOU; TZIA, 2003).

2.2 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE PÃO

A mecanização da indústria de panificação é fundamental do ponto de vista econômico e técnico porque reduz o tempo e os custos de processamento, permite a diversificação da linha de produção com aumento de eficiência e resulta em produto final de melhor qualidade. Há vários métodos de fabricação de pão, com numerosas modificações e variações (QUAGLIA, 1991; HOSENEY, 1994). Esses métodos podem ser divididos, basicamente em:

I- Processos Convencionais (Método da Massa Direta e Método da Massa Esponja)

II- Desenvolvimento Mecânico da Massa:

- Sistema tipo batelada: Método de Chorleywood, desenvolvido pela “Flour Milling and Baking Research Association, em Chorleywood (Inglaterra), no ano de 1961.
- Sistema Contínuo: processo completamente automático, com redução de custos e melhora na qualidade do pão. O método “Do maker”, desenvolvido na década de 50 por J.C.Baker, e o método “Am Flow”.

No processo Convencional, apesar dos elementos básicos serem os mesmos, os métodos diferem em detalhes. O Método da Massa Direta tem esse nome devido à necessidade de incorporação de todos os ingredientes em uma única fase de mistura, enquanto que o da Massa Esponja envolve duas fases distintas: a primeira que é chamada estágio esponja, na qual ocorre a mistura de aproximadamente 50 a 75% da

farinha, fermento, sal e parte da água; e a segunda chamada de estágio massa, na qual se completam os ingredientes (QUAGLIA, 1991; HOSENEY, 1994).

O método utilizado para fabricação do pão de forma deste trabalho foi o Método de Massa Direta. O fluxograma descritivo está representado na Figura 2.1.

Figura 2.1 Fabricação de pão de forma pelo método de Massa Direta.

2.2.1 Etapas do processo

2.2.1.1 Mistura

Além das funções básicas de homogeneizar, dispersar, solubilizar e hidratar os componentes, o trabalho mecânico da massa contribui para o desenvolvimento da rede do glúten e para a incorporação de bolhas de ar (AUTIO; LAURIKAINEM, 1997).

Assim, uma mistura heterogênea e espessa de água e farinha é convertida em uma massa viscoelástica, homogênea de aspecto seco resultado de interações entre proteínas, carboidratos e lipídeos favorecidas pela energia gerada na mistura (EI-DASH, 1978; MARSH, 1998).

A capacidade da farinha de trigo de formar uma massa viscoelástica, quando misturada à água, depende em grande parte das propriedades físico-químicas de suas proteínas. Outros componentes da farinha e ingredientes previamente adicionados também influenciam as propriedades funcionais desejáveis da massa e a qualidade organoléptica do pão. Assim, um produto com boa qualidade é obtido a partir da combinação otimizada de componentes, de ingredientes e de processamento (BLOKSMA; BUSHUK, 1998).

Pesquisas mostraram que as diferenças na funcionalidade das proteínas das diversas farinhas resultam de diferenças nas propriedades fundamentais dos vários tipos de proteínas presentes, nas proporções relativas de proteínas específicas, nas interações proteína-proteína e entre proteínas e demais substâncias presentes na própria farinha ou nos demais ingredientes adicionados. Durante o desenvolvimento da

massa, os agregados das proteínas, que a princípio parecem ter na estrutura física partículas ou fibras, são convertidos em filmes ou membranas contínuas que possuem a combinação reológica correta das propriedades para uma perfeita expansão e retenção de gases durante a fermentação e o assamento. A transformação das partículas dos componentes hidratados da farinha em massa desenvolvida depende, principalmente, das proteínas da farinha. As ligações químicas que estabilizam as proteínas do glúten nas massas são as ligações covalentes e as secundárias. As ligações covalentes são pontes dissulfeto, que formam ligações cruzadas intra- e inter-moleculares nas proteínas durante a formação da massa. As ligações secundárias são pontes de hidrogênio, ligações hidrofílicas e hidrofóbicas, ligações iônicas e polares (KULP; LORENZ; BRÜMMER, 1995).

A funcionalidade das proteínas da farinha não acaba com a sua desnaturação no assamento. Evidências mostram que o conteúdo e a qualidade das proteínas da farinha contribuem para um prolongamento do frescor do pão (BUSHUK, 1985).

No glúten, além da interação de proteínas, outros componentes da farinha como lipídeos, sais, amido e outros polissacarídeos também participam de sua formação. Os grânulos de amido ficam envoltos pela fase protéica que é contínua. As características, particularmente a elasticidade e extensibilidade da massa, dependem, tanto do conteúdo da proteína do glúten por unidade de massa como de sua capacidade para formar novas ligações com as moléculas adjacentes (GIANNOU; KESSOGLOU; TZIA, 2003).

Naes, Bjerke e Faergestad (1999) relataram a importância da mistura para o desenvolvimento do produto e otimização dos produtos e processos de panificação. No

caso do processo direto são utilizadas duas velocidades de mistura. A primeira, para homogeneização dos ingredientes e absorção da água e a segunda, para o trabalho mecânico da massa. Durante a mistura, a formação do glúten acontece em dois estágios: no primeiro, as moléculas de proteína são hidratadas e as suas fibrilas se aderem umas às outras formando uma rede desorganizada de fios espessos. A ação mecânica torna os fios mais finos e os orienta na direção em que foram submetidos à força, permitindo a interação entre eles. No segundo estágio aparece o pico de consistência, no qual as fibrilas de proteína têm seu diâmetro reduzido significativamente e interagem mais bidimensionalmente do que em um único eixo. Neste estágio, a massa pode ser estendida em forma de filme contínuo (STAUFER, 1998).

A capacidade da massa de ser estendida em uma membrana fina é um importante parâmetro no processo, pois indica a condição ótima de batimento, mais conhecida como “ponto de véu”. Se a mistura continuar após esse ponto, que corresponde ao pico de resistência, a consistência da massa diminui, torna-se menos resistente à ação mecânica e perde a capacidade de reter gás durante a fermentação (FRAZIER; DANIELS; RUSSEL EGGITT, 1975).

Uma boa massa é definida por sua capacidade de reter o gás e pela promoção de sua propriedade viscoelástica, assim o volume da massa pode expandir adequadamente durante a fermentação e nas etapas iniciais do assamento (STAUFER, 1998).

2.2.1.2 Divisão e Modelagem

A operação de divisão da massa em pedaços menores e boleamento destes é outra etapa importante, pois dirige a formação dos gases, elimina a pegajosidade da massa e, ao mesmo tempo, facilita a operação posterior de modelagem, eliminando os eventuais defeitos nesta etapa. Durante a divisão e o boleamento, a rede protéica da massa sofre uma tensão severa exigindo, portanto, um período de descanso da massa em formato de bolas, para que as moléculas da proteína readquiram sua estrutura flexível, o que permite uma modelagem facilitada, sem quaisquer rupturas na superfície (AUTIO; LAURIKAINEN, 1997).

O equipamento de modelagem da massa é constituído de três rolos cilíndricos, que giram em sentidos opostos, e com distâncias ajustadas entre si, tanto para permitir a retirada dos gases e o achatamento gradual, quanto para enrolar e selar a parte inferior da massa. Na fase de modelagem, as peças de massa sofrem a perda de gases, portanto, é essencial permitir que a fermentação da massa prossiga, por um determinado tempo, para que o glúten se recomponha, e pão adquira um volume adequado. O volume ótimo da massa é essencial para a qualidade da textura e das células do miolo (STEAR, 1990).

2.2.1.3 Fermentação

O objetivo do controle da fermentação é obter o máximo da produção de gás e, ao mesmo tempo, da sua retenção na massa, o que irá resultar num pão com volume

desejável e boa granulidade, textura, cor da crosta, e outras características que a farinha em questão pode produzir. Segundo Zghal, Scanlon e Sapirstein (2001) consideram que apesar de fatores como tipo de farinha, absorção de água, modelagem afetarem a qualidade do produto final, é o tempo de fermentação da massa, o mais importante entre eles, pois pode influenciar marcadamente o volume final do pão, a densidade e as propriedades mecânicas do miolo.

O período de fermentação final varia normalmente de 60 a 90 minutos, dependendo das condições de umidade e de temperatura a que a massa foi submetida, do tipo de pão, do peso em massa, dos ingredientes, da formulação, do tipo de farinha de trigo e da atividade do fermento aplicado (EL-DASH, 1978; QUAGLIA, 1991).

A temperatura de fermentação varia de 27 a 40 °C e sua umidade, de 75 a 90%, dependendo do tipo de massa. Em geral a temperatura de 27 °C e a umidade relativa de 75% são as mais satisfatórias para a fermentação. Temperaturas menores do que 27 °C irão retardar a velocidade de fermentação, e maiores do que 30 °C irão acelerar a fermentação, e aumentar o perigo de fermentações envolvendo leveduras inconvenientes, bactérias lácticas e fungos (STEAR, 1990).

Durante a fermentação da massa, as proteínas do glúten são modificadas física e quimicamente. Sofrem intumescimento e estabelecem ligações cruzadas que formam a estrutura tridimensional capaz de reter os gases produzidos nos estágios posteriores do processamento do pão. E apesar da fase de fermentação da massa ser essencial para o desenvolvimento do volume, e para a qualidade da casca e do miolo, ela acarreta aumento de custo e consome tempo. Por essa razão, a maioria dos novos métodos de produção do pão procura eliminá-la pelo que é chamado de

desenvolvimento mecânico da massa. Isto resulta no melhor controle do processo, na redução do custo, e na qualidade do pão (KULP; LORENZ; BRÜMMER, 1995; AUTIO; LAURIKAINEM, 1997).

2.2.1.4 Assamento

Como última fase do processo de panificação, o forneamento é responsável por uma série de mudanças físicas, químicas e bioquímicas no produto final. Essas mudanças incluem a inativação de enzimas, interrupção da fermentação, desenvolvimento de aroma e de sabor, expansão de volume, evaporação da água, formação de uma estrutura porosa, desnaturação de proteínas, gelatinização do amido, formação da crosta e reação de escurecimento, ligações entre proteínas, fusão dos cristais de gordura e a incorporação destes nas superfícies das células de ar e a ruptura das células de gás (SABLANI; BAIK; MARCOTTE, 2002).

No assamento, o amido sofre gelatinização, que é uma combinação da fusão da porção cristalina do grânulo de amido com a transição vítrea da sua porção amorfa. O grânulo de amido não é solúvel em água fria, porém, quando aquecido em meio aquoso, absorve água e intumescce. A frio o intumescimento é reversível, mas torna-se irreversível à medida que se aumenta a temperatura. Nesse processo se altera a estrutura do grânulo. Com o aumento da temperatura, pontes de hidrogênio são rompidas permitindo a incorporação de água pelo amido. Como consequência, a separação entre as cadeias aumenta, bem como o número e o tamanho das regiões cristalinas diminuem. Quando a temperatura de fusão dos cristais de amido é excedida,

o estado do sistema é próximo a um sólido. Esta temperatura é conhecida como ponto de gelatinização ou temperatura de gelatinização. Para pães, é a temperatura em que a estrutura viscoelástica da massa torna-se uma esponja sólida e a gelatinização dos grânulos de amido varia de parcial a quase totalidade (PATERAS, 1998).

O termo do envelhecimento vem do inglês *staling* e refere-se ao decréscimo da aceitação do pão por parte dos consumidores, devido às mudanças químicas e físicas que ocorrem na casca e no miolo durante o armazenamento, não decorrentes da deterioração microbiana. O envelhecimento inicia-se logo após o assamento e está associado principalmente ao aumento da firmeza do miolo, que durante o armazenamento se torna quebradiço e a casca borrachuda (KIM; D'APPOLONIA, 1977; PATERAS, 1998).

Logo após o assamento, a associação da amilose presente no amido parece não interferir na firmeza do miolo. A mudança nessa propriedade é atribuída às mudanças na orientação física das moléculas ramificadas de amilopectina no grânulo intumescido. No pão fresco, as cadeias ramificadas encontram-se livres. Com o tempo, estas se agregam gradualmente por ligações intermoleculares, aumentando a rigidez da estrutura interna do grânulo intumescido de amido causando o endurecimento do miolo (SHELTON; D'APPOLONIA, 1985).

A recristalização da amilopectina, mecanismo predominante no envelhecimento é denominado retrogradação. A amilopectina parte do estado completamente amorfo, no produto fresco, para o estado parcialmente cristalino com o passar do tempo. A velocidade e a extensão da recristalização do amido são determinadas principalmente pela mobilidade das ramificações cristalinas da amilopectina. A retrogradação é

formada por dois processos distintos: a gelatinização da amilose solubilizada e a recristalização da amilopectina no grânulo gelatinizado (GRAY; BEMILLER, 2003).

2.2.1.5 Resfriamento

Embora a maioria dos fabricantes não considere a fase de resfriamento tão fundamental sob o ponto de vista técnico, esta é uma fase de relevante importância, por contribuir com a vida de prateleira do produto final. Os produtos finais, ao saírem do forno, devem encontrar condições ideais para o seu resfriamento adequado, atingido quando a temperatura interna do produto estiver ao redor dos 30 °C, antes de ser fatiado e embalado (QUAGLIA, 1991).

2.3 INGREDIENTES

2.3.1 Farinha de trigo

A farinha de trigo é o ingrediente mais comum e mais importante na fabricação do pão. O trigo é o único entre os grãos de cereal cuja farinha extraída, pode produzir pão que é significativamente mais palatável, que àquele obtido de qualquer outra farinha de qualquer outro grão de cereal (GIANNOU; KESSOGLOU; TZIA, 2003).

2.3.1.1 Grão

O grão de trigo apresenta formato oval, tamanho e cor diferentes dependendo da espécie. Numa das extremidades do grão encontra-se o gérmen e na outra, um conjunto de cerdas. A presença de um sulco na parte interna, conhecido como *crease*, define o processo particularizado da moagem do trigo, uma vez que um processo simples de abrasão para a retirada da casca não seria possível (ABITRIGO, 2007a).

O grão se divide praticamente em três macro-regiões: o pericarpo, a semente e o gérmen (Figura 2.2).

Fonte: Adaptado de ABITRIGO (2007a)

Figura 2.2 Ilustração diagramática de um grão de trigo (Secção Longitudinal).

A parte mais externa é o pericarpo, mais conhecido como farelo, que recobre toda a semente e é composto por seis camadas (epiderme, hipoderme, remanescentes da parede celular ou células finas, células intermediárias, células cruzadas e células

tubulares). O pericarpo corresponde a aproximadamente a 10% do peso do grão e é incluído na farinha de trigo integral. É rico em celulose e comporta em sua estrutura o maior teor de minerais encontrado no grão de trigo (CORNELL; HOVELING, 1998).

A semente é formada pelo endosperma que é recoberto por três camadas: testa, hialina e aleurona. Representa, em média, 83% do peso do grão, é constituído principalmente de amido e proteína, e é desta região que se extrai a farinha branca de trigo. O gérmen é o embrião de uma nova planta, representando aproximadamente 2,5% do peso do grão de trigo. Formado pelo escutelo, eixo embrionário e o epiblasto, é rico em açúcares e em lipídeos, e por esse motivo, usualmente o gérmen é separado da farinha durante a moagem, pois essa quantidade de gordura interfere na qualidade de conservação da farinha de trigo (CORNELL e HOVELING, 1998).

O trigo é classificado de duas formas básicas: botânica e comercial. A primeira, mundialmente padronizada, define o trigo segundo suas características biológicas: o trigo é uma gramínea, um cereal fasciculado pertencente à família *Gramínea* e do gênero *Triticum*, e com variedades divididas em vários grupos. No Brasil, é moído, principalmente, trigo da espécie *T. aestivum vulgaris*, aqui cultivado ou importando, obtido de muitas variedades. De maneira simplificada, esse trigo é dividido como *hard*, ou duros, e *softs*, ou brandos (ABITRIGO, 2007).

O gênero *Triticum* contém aproximadamente 30 tipos de trigo geneticamente diferentes, classificados em espécies e sub-espécies distintas. Mais de 90% do trigo cultivado no mundo corresponde a três espécies, o *Triticum aestivum*, sub-espécie *vulgaris*; o *Triticum turgidum*, sub-espécie *durum*; e o *Triticum compactum*, com predominância dos dois primeiros, o *vulgaris* e o *durum*. Todas as espécies e sub-

espécies de *Triticum* caracterizam-se por possuir 7 pares de cromossomos (14) ou um múltiplo. Uma espécie diplóide contém 14 cromossomos, a tetraplóide, 28 e a hexaplóide, 42. O *durum* é um tetraplóide e o *vulgaris*, um hexaplóide (ABITRIGO, 2007).

Comercialmente, varia de país para país em função de hábitos, cultura e necessidades de consumo. São definidas a partir de características físico-químicas e aptidões à manufatura de produtos correlatos. Dois fatores são fundamentais para a classificação comercial do trigo: suas propriedades viscoelásticas e o seu poder fermentativo. São elas que irão determinar a melhor adequação ao uso da variedade do cereal. Alguns autores classificam o trigo em: durum, duro (*hard*), mole (*soft*) e branco (CORNELL; HOVELING, 1998; HOSENEY, 1992).

- Durum: este tipo de trigo tem elevado teor de proteínas, é extremamente tenaz, de grão relativamente grande e com endosperma compacto e vítreo. Tem baixa qualidade tecnológica para a produção do pão. As propriedades deste trigo, entretanto, são adequadas para a produção de massas alimentícias, como o macarrão, devido à cor, à elasticidade do glúten e, às características de moagem que permitem um alto rendimento em farinha de semolina;
- Duro: apresenta considerável tenacidade no grão, que contém endosperma vítreo. Os trigos duros, de inverno ou primavera, têm usualmente a cor amarela escura, e alto teor de proteína. A farinha é identificada por excelentes características de panificação, ideais para a fabricação de pães tipo francês ou tipo pão de forma;

- Mole: tem baixo teor de proteína e qualidade tecnológica inferior ao do trigo duro utilizado para as farinhas destinadas à fabricação do pão. Sua qualidade é adequada para a produção de *crackers*, biscoitos e pães do tipo árabe;
- Branco: os trigos brancos têm menor quantidade de proteínas e cor mais clara que os trigos duros, além de qualidade de panificação adequada à fabricação de bolos e tortas. As farinhas produzidas a partir deste tipo de trigo não são recomendadas para a fabricação de pães.

No Brasil, de acordo com a Normativa nº 07 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2003), os cultivares estão classificados (de acordo com a alveografia e o Índice de Queda) em cinco classes (Tabela 2.1):

Tabela 2.1 - Classificação do trigo no Brasil.

CLASSE	ALVEOGRAFIA ¹ (10 ⁻⁴ JOULES) (MÍNIMO)	NÚMERO DE QUEDA ² (Segundos) (MÍNIMO)
Trigo Brando	50	200
Trigo Pão	180	200
Trigo Melhorador	300	250
Trigo para outros usos	Qualquer	<200
Trigo Durum	-	250

1 Analisa as propriedades de tenacidade e de extensibilidade da massa. Considera-se somente o parâmetro W, que indica a força ou trabalho mecânico, necessário para expandir a massa, em Joules (J), segundo o método padrão indicado pelo fabricante.

2 ou Falling Number: Medida indireta da concentração da α -amilase determinada em 7 gramas de trigo moído, pelo método de Hagberg (Cereal Chemistry, v.58, p. 202, 1961)

Fonte: MAPA (2003)

Essas diferentes classes de trigo são utilizadas para fins distintos, conforme resumo apresentado a seguir (SCHEEREN; MIRANDA, 1999) e na Tabela 2.2:

- **em trigo brando**, são enquadrados os grãos de genótipos de trigo aptos para a produção de bolos, bolachas (biscoitos doces), produtos de confeitaria, pizzas e massa do tipo caseira fresca;
- **na classe trigo pão**, estão os grãos de genótipos de trigo com aptidão para a produção do tradicional pãozinho (do tipo francês ou d'água) consumido no Brasil. Esse trigo também pode ser utilizado para a produção de massas alimentícias secas, de folhados ou em uso doméstico, dependendo de suas características de força de glúten (W);
- **a classe de trigo melhorador** envolve os grãos de genótipos de trigo aptos para mesclas com grãos de genótipos de trigo brando, para fim de panificação, produção de massas alimentícias, biscoito do tipo *crackers* e pães industriais (como pão de forma e pão para hambúrguer);
- **na classe trigo durum**, especificamente os grãos da espécie *Triticum durum* L., estão os grãos de genótipos de trigo para a produção de massas alimentícias secas (do tipo italiana);
- **trigos para outros usos** são os destinados à alimentação animal ou outro uso industrial. Estes envolvem os grãos de genótipos de trigo com qualquer valor de W, mas não enquadrados em nenhuma das outras classes, por apresentarem número de queda (*falling number*) inferior a 200 (SCHEEREN; MIRANDA, 1999).

Tabela 2.2 - Usos do trigo.

Produtos	W ⁽¹⁾ (10 ⁻⁴ Joules)	P/L ⁽²⁾	Número de queda (Seg.) ⁽³⁾
Bolo	70 – 150	0,40 – 2,0	> 150
Biscoitos	70 – 150	0,40 – 2,0	> 150
<i>Cream Cracker</i>	250 – 350	0,70 – 1,50	225 – 275
Pão Francês	180 – 250	0,50 – 1,20	200 – 300
Uso Doméstico	150 – 220	0,50 – 1,00	200 – 300
Pão de Forma	220 – 300	0,50 – 1,20	200 – 300
Massa Alimentícia	> 200	1,00 – 3,00	> 250

1 Força geral de glúten

2 Relação entre tenacidade (P) e extensibilidade (L).

3- ou Falling Number: Medida indireta da concentração da α -amilase determinada em 7 gramas de trigo moído, pelo método de Hagberg (Cereal Chemistry, v.58, p. 202, 1961)

Fonte: (SCHEEREN; MIRANDA, 1999).

Schroeder (1987) relata que mais importante que as classificações sugeridas de trigo, são os conceitos de qualidade atribuídos a ele, que por sua vez são dependentes do segmento que avalia. Dessa forma, para o moageiro, a qualidade significa matéria-prima uniforme em tamanho e forma, alto volume específico, alto rendimento em farinha, baixos teores de cinzas, coloração desejável do produto final e baixo consumo de energia elétrica durante o processamento industrial. Para o panificador, a farinha de boa qualidade deve possuir alta capacidade de absorção de água, boa tolerância à mistura, glúten bem balanceado e alta porcentagem de proteínas. Para o consumidor, o trigo de boa qualidade é aquele capaz de produzir pães de grande volume, com texturas interna e externa adequadas, cor clara e alto valor nutritivo.

2.3.1.2 Produção

A produção mundial de trigo é de aproximadamente 600 milhões de toneladas. Os maiores produtores são a China e a União Européia, com mais de 100 milhões de

toneladas; os Estados Unidos e Índia em torno de 60 milhões; o Leste Europeu e a Rússia, 40 milhões; Canadá, 30 milhões e a Argentina e Austrália, com quase 20 milhões de toneladas da cultura de trigo produzida por ano. Os maiores exportadores da atualidade são a Argentina, Austrália, Canadá e Estados Unidos e a principal importadora é a Europa oriental. A China é um dos maiores produtores mundiais de trigo, mas também o maior consumidor (ABITRIGO, 2007).

A produção no Brasil, até o ano de 2002, variou entre 1,5 e 3,0 milhões de toneladas por ano, para uma demanda de cerca de 10 milhões de toneladas/ano. Os milhões de toneladas restantes foram importadas, principalmente da Argentina (80%) em função da proximidade dos dois países e dos acordos bilaterais. Nos anos 2003, 2004 e 2005 a demanda permaneceu a mesma, mas houve um aumento de áreas plantadas, principalmente em São Paulo (cerca de 20%), resultante de incentivos do governo, com a fixação dos preços por toneladas aos produtores e aberturas de créditos especiais agrícolas. A produção oscilou entre 4,5 a 6,0 milhões de toneladas, sendo que a menor safra foi a de 2005, com redução de 13% em relação a duas safras anteriores, devido ao atraso do plantio e também, por preços oferecidos ao produtor terem sido considerados ruins, abaixo dos custos de produção (ABITRIGO, 2007b; IBGE, 2007; IBGE, 2007a).

As Tabelas 2.3 e 2.4 mostram a comparação das safras de cereais de 2005 e 2006, e a perspectiva para a safra de 2007, respectivamente, para o Brasil.

Tabela 2.3 - Comparação entre as safras de cereais de 2005 e 2006.

Produtos Agrícolas	P r o d u ç ã o (toneladas)		
	Obtida safra 2005	Obtida safra 2006	Variação %
Arroz (em casca)	13 225 663	11 504 564	-13,0
Aveia (em grão)	510 033	378 698	-25,8
Cevada (em grão)	323 143	191 995	-40,6
Milho (em grão) 1ª safra	27 154 025	31 429 528	15,7
Milho (em grão) 2ª safra	7 961 886	11 046 437	38,7
Sorgo (em grão)	1 495 078	1 568 829	4,9
Trigo (em grão)	4 658 457	2 372 667	-49,1
Triticale (em grão)	276 657	202 574	-26,8

Fonte: Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Dezembro 2006 (IBGE, 2007b).

Na safra de 2006, o país colheu apenas 2,23 milhões de toneladas, segundo levantamento realizado pela EMBRAPA TRIGO (2007). A forte quebra da safra registrada foi provocada por condições climáticas adversas na época de implantação da cultura, como estiagem no Paraná, e geadas no Rio Grande do Sul no período de floração e frutificação (Tabela 2.3).

A previsão para 2007, mesmo se a área plantada permanecer estável em relação a 2006 (1,752 milhões de hectares), e se não houver problemas climáticos, a produção poderá dobrar para cerca de 4,5 a 5,0 milhões de toneladas (EMBRAPA TRIGO, 2007), muito acima da previsão feita pelo Grupo de Coordenação de Estatísticas do IBGE (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Comparação entre as safras de cereais de 2006 e 2007.

Produtos Agrícolas	Produção (toneladas)		
	Safra 2006	Safra 2007	Variação %
Arroz (em casca)	11 504 564	11 049 019	-4,0
Aveia (em grão)	378 698	472 816	24,9
Centeio (em grão)	2 086	5 577	167,4
Cevada (em grão)	191 995	243 025	26,6
Milho (em grão) 1ª safra	31 429 528	34 881 006	11,0
Milho (em grão) 2ª safra	11 046 437	10 333 570	-6,5
Sorgo (em grão)	1 568 829	1 526 355	-2,7
Trigo (em grão)	2 372 667	3 463 795	46,0
Triticale (em grão)	202 574	237 579	17,3

Fonte: Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias-GCEA/IBGE, DPE, COAGRO, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - Dezembro 2006 (IBGE, 2007b).

Cerca de 90% da produção de trigo está no sul do Brasil. O Paraná produz quase que 56% da produção nacional de trigo, porém, o Rio Grande do Sul detém a maior parte da área cultivada seguido pelo estado do Paraná, Santa Catarina, São Paulo e outros. O cereal vem sendo introduzido paulatinamente na região do cerrado (MS, GO e Distrito Federal) sob irrigação ou sequeiro. É elevado o número de variedades cultivadas no país, muitas já conhecidas de longa data, outras resultantes de seleções e hibridações realizadas em estações experimentais (EMBRAPA TRIGO, 2007a).

2.3.1.3 Composição

A composição da farinha de trigo oscila de acordo com a variedade do trigo e com seu grau de extração. Este representa a porcentagem do grão integral que está sendo transformada em farinha. Além das diferenças na qualidade tecnológica inerente à farinha de uma classe específica de trigo, as farinhas de um mesmo tipo de trigo podem variar em grau de extração devido às condições sofridas na moagem. Usualmente, as farinhas com baixos conteúdos de cinzas têm cor adequada e boa absorção de água, assim como sua qualidade geral em panificação, quando comparadas às outras de alto teor de cinzas do mesmo tipo de trigo. No processo de moagem, o moleiro mistura frações diferentes de farinha *blend* para obter uma farinha final para venda às padarias, mas a mistura deve ser feita para obter-se um rendimento total de farinha com qualidade total (POMERANZ, 1987; SCHROEDER, 1987).

À medida que o grau de extração aumenta, as propriedades da farinha mudam drasticamente. A qualidade de panificação para a maioria dos pães tende a cair quando o grau de extração excede a 80%: o volume do pão diminui; a cor do miolo tende a ficar mais escura; a firmeza e a estrutura do miolo, além do sabor também se alteram. Há mudanças também quanto ao seu valor nutricional, resultando em conteúdos mais altos de proteínas, de lipídeos e de fibras (SCHILLER, 1984).

Os lipídeos são responsáveis por menos de 2% e as cinzas, por menos de 0,5% de sua composição. Os carboidratos são os que contribuem com o maior percentual na farinha. O amido é o principal carboidrato e é responsável por aproximadamente 65% da composição da farinha. O amido do trigo é constituído de grânulos bem definidos

com distribuição bimodal, os pequenos são grânulos esféricos com diâmetros de 2-10 μm , e os grandes são grânulos lenticulares com diâmetros de 20-35 μm . Os grânulos lenticulares possuem um sulco equatorial característico em torno de sua circunferência. Essa área tem uma alta susceptibilidade ao ataque enzimático (SHELTON; APPOLONIA, 1985).

Os maiores componentes do amido são: amilose (23%) e amilopectina (73%). Bettge, Giroux e Morris (2000) desenvolveram estudos com trigos modificados geneticamente, que apresentam teores variados de amilose e amilopectina. Demonstraram que grânulos de amido ceroso (mais que 99% de amilopectina) são substancialmente mais susceptíveis a quebras físicas que grânulos contendo amilose (parcialmente ceroso, contendo 18% de amilose ou trigo normal contendo 22-23% de amilose no seu amido).

Devido ao fato de o amido ceroso não conter amilose, não há grandes regiões de pontes de hidrogênio entre cadeias e formação de hélices duplas, como visto em amilose de amido de trigo normal dentro da região amorfa do grânulo de amido. Número reduzido de pontes de hidrogênio pode levar à diminuição da resistência à trituração e conseqüentemente a um aumento na quantidade de amido danificado. O grânulo de amido, quando danificado, tem a sua capacidade de absorver água aumentada (JACOBS; DELCOUR, 1998).

Os demais polissacarídeos presentes na farinha são as pentosanas, responsáveis por 2,0 a 2,5% da farinha. Pentosanas são classificadas pela sua solubilidade em água fria. A diferença de solubilidade está baseada no grau de arabinose nas ramificações da cadeia de xilose. As pentosanas insolúveis em água têm

um grau maior de ramificações do que as solúveis. Tanto as pentosanas solúveis quanto as insolúveis são extremamente hidrofílicas. Embora as pentosanas compreendam apenas pequena parcela da farinha, já na década de 60, Bushuk (1966) descreveu que 23% da água total da massa estão associadas às pentosanas e Kulp (1968) relatou que as pentosanas solúveis em água (arabinoxilanas) absorvem 11 vezes seu peso em água e as pentosanas insolúveis absorvem 10 vezes, e por isso, as pentosanas foram consideradas um importante regulador da absorção de água e sua distribuição na massa.

Quanto às proteínas, correspondem, em média, a 12% da farinha. Segundo Singh; Donovan e MacRitchie (1990), as proteínas podem ser classificadas quanto à sua solubilidade ou quanto à sua função fisiológica no grão. Quanto à solubilidade, a farinha contém albuminas e globulinas, solúveis em água e em soluções salinas, respectivamente, que contribuem com um sexto do total de proteínas, e o restante constituído pelas gliadinas e gluteninas, que são formadoras do glúten. A classe solúvel em álcool é a gliadina e seu resíduo, a glutenina, pode ser solubilizada em ácido acético 0,1 mol/L (OSBORNE, 1907). As albuminas compõem 60% da porção protéica não formadora da massa, e têm massa molar variável entre 10 e 20 KDa. Os 40% restantes correspondem às globulinas, que têm massa molar entre 20 e 200 KDa. Quanto às funções fisiológicas, as proteínas podem ser de três tipos: estruturais, metabólicas e de reserva. As proteínas metabólicas, como a β -amilase e as lipoxigenases, contribuem com as propriedades da farinha destinadas à fabricação do pão. Em algumas farinhas, α -amilases e proteases também são importantes

(SGARBIERI, 1996). Tecnicamente, as proteínas de reserva, que atuam na estrutura do glúten e na massa, são as mais importantes. São as proteínas do glúten as responsáveis pela formação da rede viscoelástica da massa, que conseqüentemente se tornará a estrutura do pão (BUSHUK, 1985; YAHATA et al., 2006).

A glutenina é responsável pela característica de força e de elasticidade e a gliadina pela viscosidade e extensibilidade da massa (UTHAYAKUMARAM et al., 2000).

O conteúdo de proteína de trigo depende, e fortemente, de fatores agronômicos e ambientais, tais como umidade e nitrogênio do solo e temperatura durante o crescimento. Para uma particular condição de crescimento, algumas variedades de trigo produzem mais proteínas que outras (JOHANSSON; PRIETO-LINDE; JÖNSSON, 2001).

Por outro lado, a qualidade da proteína, é primeiramente uma característica genotípica, isto é, cada variedade de trigo herda a qualidade de proteína de seus “pais”. Contudo, a qualidade pode ser também adversamente afetada pelas condições ambientais anormais, tais como: doenças infecciosas, alta temperatura durante o período de crescimento, condições de alta umidade durante a colheita e condições de armazenamento impróprias pós-colheita (BUSHUK, 1985).

A quantidade de proteínas pode ser determinada precisamente, mas a qualidade é extremamente complexa e muito difícil de medir. Interações físicas e químicas, provavelmente, acontecem de maneira muito complexa para resultar em qualidade apropriada de proteína para um tipo específico de produto e processo. Chiang, Chen e Chang (2005) trabalharam com produto tradicional da China a base de glúten de farinhas de cinco diferentes variedades de trigo, com extração máxima de 60%. Os

resultados mostraram que a qualidade do produto não foi somente afetada pelo processo, mas também pela composição das proteínas das farinhas utilizadas.

Kaufman, Hoseney e Fennema (1986) revisaram modelos estruturais para a formação da massa e discutiram interações químicas que poderiam influenciar na estrutura, com ênfase nas reações de dissulfeto.

Para Tipples, Preston e Kilborn (1982), o termo “força” usado para trigo ou farinha é uma manifestação das propriedades características das proteínas do glúten, e pode ser definido de duas maneiras diferentes. A primeira envolve fatores relacionados às propriedades físicas e/ou químicas da farinha ou massa. A segunda, e talvez a mais importante para esses autores, está relacionada à habilidade da farinha em produzir pães de boa qualidade. Afirmam ainda, que existe uma generalização para o conceito de que trigos com alto conteúdo de proteína (14%) tendem a ser duros, ter glúten forte e produzir pão de boa qualidade; enquanto que, trigos com baixo conteúdo de proteína (8%) tendem a ser macios, ter glúten fraco e produzir pão de baixa qualidade. Para eles, contudo, variedades e outros fatores contradizem esses conceitos simplistas para definição de “força” e produzem muitas exceções.

Há décadas, as proteínas do glúten são subdivididas em dois grandes grupos baseados na sua solubilidade em etanol 70 % (as gliadinas, a classe solúvel, e as gluteninas, o resíduo). Entretanto, estudos mostraram que essa classificação apresenta muita sobreposição de componentes, com solubilidades muito próximas, e por isso considerada pouco precisa. Assim, surgiu uma nova tendência de definir essas classes com base no tamanho molecular. Segundo Shukla (2001), após uma alta extração de farinha do endosperma do grão de trigo, esta pode conter pelo menos 50 tipos

diferentes de subunidades de proteínas: de 4 a 6 gluteninas de alto peso molecular (HMW), acima de 15 gluteninas de baixo peso molecular (LMW), e 30 ou mais gliadinas monoméricas (α -, β -, γ - e ω -). Aproximadamente 34% das proteínas da farinha são gluteninas com pesos moleculares variando entre 80 e 160 KDa para as subunidades de altos pesos moleculares reduzidas, e em média, 40 e 45 KDa para as subunidades das gluteninas de baixos pesos moleculares reduzidas.

Para Veraverbeke et al. (2000a), os polímeros, que podem chegar a valores de pesos moleculares superiores a 2×10^4 KDa, são formados por subunidades de gluteninas de baixo peso molecular (LMW-GS) (30 a 55 kDa, baseado na mobilidade em SDS-PAGE) e subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) (80 a 120 kDa, baseado na mobilidade em SDS-PAGE) unidos por pontes dissulfeto e de hidrogênio.

Informações sobre as estruturas secundárias e terciárias do glúten são limitadas. Aparentemente, o conteúdo α -hélice de glutenina é bem baixo, talvez menor que da gliadina, estimado em 30%. Embora glutenina, presumivelmente, tenha pouca estrutura quaternária regular, agregações intermoleculares dessas proteínas são extremamente importantes para a funcionalidade (BUSHUK, 1985).

A purificação das gluteninas é extremamente difícil devido à sua baixa solubilidade e a similaridade estreita dos componentes das proteínas, porém mais de 20 HMW-GS já foram isoladas, e suas estruturas caracterizadas, incluindo as distribuições dos resíduos de cisteína (SHEWRY; HALFORD; TATHAM, 1992; SHEWRY; TATHAM, 1997). As subunidades de HMW ainda são subdivididas, de acordo com suas estruturas, em dois tipos: tipo x, de peso molecular ligeiramente mais alto (geralmente com 4 resíduos de cisteína) e menor mobilidade eletroforética em

SDS-PAGE e o tipo y (com 7 resíduos de cisteína) (SHEWRY; HALFORD; TATHAM, 1992).

Payne et al. (1987) encontraram em cultivares de trigo hexaplóides, dois ou três diferentes tipos x e um ou dois diferentes tipos y de HMW-GS. Outra significativa descoberta é a localização do resíduo de cisteína próximo ao aminoácido terminal da subunidade. Nessa molécula de glutenina, o grupo sulfidril deste resíduo, forma uma ponte dissulfeto com um resíduo similar de outra subunidade. Tal localização terminal de uma ponte dissulfeto inter-poli-peptídeo poderia ser consistente com modelos moleculares de glutenina e com o bem conhecido modelo de influência de agentes redutores nas propriedades reológicas do glúten e massa (BUSHUK, 1985).

Khan e Bushuk (1979a) trabalhando com filtração em gel relataram que gluteninas de variedades de trigo de alta qualidade formam mais e maiores agregados que gluteninas de trigo de baixa qualidade. Resultados indicaram associações hidrofóbicas mais fortes nos agregados de gluteninas de trigo de qualidade mais alta, com alto grau de polimerização através de pontes dissulfeto.

Bushuk (1985) encontraram um longo segmento das HMW-GS com predominância de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, tornando a região da molécula altamente hidrofóbica, facilitando fortes associações com outras proteínas similares ou com constituintes não-protéicos, por exemplo, lipídeos. Esse caráter altamente hidrofóbico das proteínas do glúten contribui para a sua funcionalidade na massa.

As subunidades de gluteninas de baixo peso molecular (LMW-GS) foram originalmente sub-classificadas em B-, C- e D-LMW-GS, baseado nas diferenças de

mobilidade no SDS-PAGE (JACKSON; HOLT; PAYNE, 1983). A maior fração de LMW-GS são as B-LMW-GS com pesos moleculares variando de 40 e 50 KDa , as C-LMW-GS têm pesos moleculares de 30 a 40 KDa (PAYNE; CORFIELD, 1979) e as D-LMW-GS presentes em alguns cultivares de trigo, representam uma menor fração de LMW-GS com mobilidade em SDS-PAGE ligeiramente abaixo das frações B-LMW-GS (MASCI et al., 1993).

Lew, Kuzmicky e Kasarda (1992) aventaram a hipótese de que a maioria das C-LMW-GS sejam provavelmente gliadinas mutantes com um resíduo adicional de cisteína, enquanto a maioria das B-LMW-GS formariam uma classe mais distinta de LMW-GS com 2 resíduos de cisteína não envolvidos nas ligações dissulfeto intramoleculares. Assim, enquanto a maioria das B-LMW-GS poderia agir como *chain extenders*, das C-LMW-GS poderia agir como *chain terminators* na polimerização das gluteninas (Figura 2.3).

Fonte: www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=12828&pf=1&cg_id=0

Figura 2.3 Imagem tridimensional da LWM-GS. Detalhe do domínio C-terminal.

A importância da distribuição dos tamanhos das subunidades de gluteninas na qualidade da glutenina (WEEGELS; HAMER; SCHOFIELD, 1996) justificaram estudos recentes no comportamento da polimerização “*in vitro*” de subunidades de gluteninas nativas e mutantes.

Veraverbeke et al. (2000a) purificaram HMW-GS da farinha de trigo e as polimerizaram usando diferentes agentes oxidantes. Verificaram que nenhuma das condições de oxidação usadas resultou em completa incorporação de HMW-GS monoméricas nos polímeros. Sugeriram que a formação de pontes dissulfetos intramoleculares poderia ser responsável pela incapacidade dessas subunidades incorporarem-se aos polímeros de gluteninas.

Em outro estudo, Veraverbeke et al. (2000b) polimerizaram *in vitro*, frações de LMW-GS e uma mistura de frações de LMW-GS com HMW-GS utilizando agentes oxidantes (KIO_3 , KBrO_3 e H_2O_2) para investigar uma possível interação entre as duas classes de gluteninas durante a polimerização. Observaram que a incompleta polimerização ocorrida durante oxidação *in vitro* de HMW-GS pura (VERAVERBEKE et al., 2000a) não pode ser explicada pela ausência de LMW-GS, porque uma significativa proporção de HMW-GS também permaneceu monomérica quando da polimerização com a mistura das frações. As LMW-GS incorporaram-se muito mais nos polímeros de gluteninas do que as HMW-GS, quando polimerizadas individualmente ou na mistura com HMW-GS. As LMW-GS foram capazes de formar grandes polímeros entre elas, o mesmo ocorrendo com as HMW-GS.

As gliadinas compreendem aproximadamente 50% das proteínas do glúten. Podem ser classificadas em frações α -, β -, γ - e ω -gliadinas baseada na mobilidade em gel ácido poliacrilamida (pH=3,1). As frações α -, β - e γ -gliadinas são ricas em enxofre, enquanto a ω -gliadina é pobre (SHEWRY; TATHAM, 1997).

Estudos com adição suplementar de gliadina em massa geralmente resultaram em tempos de mistura mais curtos, maior resistência à quebra, elasticidade mais baixa e menor volume (FIDO et al., 1997; UTHAYAKUMARAM et al., 1999).

Uthayakumaram et al. (2001) estudaram duas variedades australianas de farinha: “Banks”, elaborada a partir de trigo duro de média força, 13% de proteína e “Rosella”, a partir de trigo fraco e macio com 8,2% de proteína e determinaram os papéis dos componentes de gliadinas individuais na altura, no tempo de mistura, na resistência à quebra, na elasticidade e na extensibilidade. As frações de gliadinas estudadas foram α , β , γ e ω , com pesos moleculares de 31, 35 e 40 a 70 KDa, respectivamente. Todas as gliadinas reduziram o tempo de mistura, a elasticidade e altura do pão, e aumentaram a resistência à quebra e a extensibilidade para ambas as variedades, mas a quantidade de mudança dependeu da fração. As γ -gliadinas foram as responsáveis por diminuir enormemente a elasticidade e aumentar a extensibilidade, e esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Fido et al. (1997).

Segundo Van Lonkhuijsen; Hamer; Schreuder (1992) e Weegels et al. (1994), a hidrofobicidade das gliadinas medida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) fase reversa segue esta ordem: $\omega < \alpha < \beta < \gamma$.

A Figura 2.4 mostra a estrutura hipotética da gliadina. Uma molécula de gliadina em solução combina espontaneamente com outras moléculas através de ligações de hidrogênio para formar uma única unidade. A formação desta unidade causa a exposição dos grupos hidrofóbicos tornando-a insolúvel em água. Estes grupos hidrofóbicos expostos interagem com outras unidades para formar grandes agregados.

Fonte: www.dfal.de/EJahr1999.html.

Figura 2.4 Imagem tridimensional da estrutura da gliadina.

Enquanto a confusão relativa à classificação das proteínas vem sendo esclarecida por recentes pesquisas sobre sua biologia molecular (LÁSZTITY, 2002), um dos grandes desafios no estudo das proteínas do trigo durante o armazenamento e as relações de suas propriedades na massa do pão é a dificuldade de dissolvê-las completamente em condições que não as alterem quimicamente. Embora seja possível solubilizá-las em soluções de NaOH (BYERS; MIFLIN; SMITH, 1983), muitas ligações

covalentes, particularmente as ligações dissulfeto, são quebradas em altos pH, e a estrutura da proteína é significativamente alterada. A completa dissolução das proteínas da farinha também pode ser conseguida pela adição de agentes redutores (por exemplo, 2-mercaptoetanol ou ditioneitol) no solvente, mas tal redução somente é útil para o estudo de polipeptídeos individuais. Informações sobre como esses polipeptídeos interagem para formar grandes cadeias não são obtidas por esse método.

As gluteninas são as mais difíceis de serem extraídas da farinha e sua recuperação depende fortemente dos solventes e das condições usadas. Um método, freqüentemente utilizado, adaptado de Byers, Mifflin e Smith (1983) por Kruger, Marchylo e Hatcher (1988 e 1989), usou 1-propanol e ditioneitol (DTT). Para separar quantitativamente HMW-GS e LMW-GS, o método por cromatografia líquida de alta eficiência, fase reversa, (CLAE-FR) foi o que apresentou os melhores resultados, e ainda hoje, é utilizado com adaptações.. As subunidades de gluteninas reduzidas e alquiladas podem ser separadas, pois as de alto peso molecular são mais hidrofílicas do que as de baixo peso molecular e, portanto, são eluídas antes.

A primeira separação de subunidades de gluteninas por CLAE-FR foi feita por Bietz (1983). Desde então, diferentes combinações de solventes, acetonitrila ou acetronila com 1-propanol, DTT ou uréia foram empregados com eluições com gradientes para isolar ou identificar subunidades de gluteninas ou componentes de gliadinas (WIESER; ANTES; SEILMEIER, 1998). Para esses autores, a estrutura primária para todas as proteínas do glúten já foram determinadas, com exceção das ω -gliadinas. Assim, para eles, as proteínas do glúten podem ser divididas em: 1- grupos de subunidades de alto peso molecular (HMW) que incluem os tipos x- e y- das

subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS); 2- grupo pobre em aminoácidos contendo enxofre, considerados de médio peso molecular (MMW), incluindo os tipos ω -5 e ω -1,2 de gliadinas; e finalmente, o grupo de baixo peso molecular, contendo aminoácidos ricos em enxofre, que incluem as subunidades de gluteninas de baixo peso molecular (LMW-GS) e os tipos α - e γ -gliadinas.

Nicolas et al. (1998) testaram métodos de extração exaustiva de gluteninas usando solventes compatíveis com a determinação do conteúdo de subunidades de gluteninas de baixo e de alto peso molecular por CLAE-FR. Eles utilizaram farinha de 45 cultivares diferentes de trigo e compararam com o teor de nitrogênio obtido pelo método de Kjeldahl para validação do método. Eles concluíram que o procedimento de extração seqüencial (solubilização em uréia 8,0 mol/L e 2-mercaptoetanol como agente desnaturante e dissociante) e análises por CLAE-FR, desenvolvidos no trabalho, permitiram determinar a concentração total de diferentes classes de prolaminas (α -, β -, γ -, ω -gliadinas), e de 90% das gluteninas (subunidades de baixos e altos pesos moleculares).

Huebner e Bietz (1985) relataram que a razão entre subunidades de altos e baixos pesos moleculares pode ser usada para determinar a qualidade de trigos utilizados em panificação.

As correlações entre o conteúdo e a composição de proteína nas propriedades do glúten e as propriedades reológicas das massas de farinha de trigo foram resumidas por Lásztity (2002). De acordo com esse pesquisador, a matriz de proteína insolúvel é um pré-requisito essencial para a formação de uma massa coesa; uma quantidade de proteína insolúvel é indispensável para formar uma fase protéica contínua na presença

de amido e água; a relação de gliadinas/gluteninas e o tamanho dos polímeros de gluteninas tem efeito significativo nas propriedades reológicas de massa.

Lásztity (2002) afirmou que a qualidade da farinha determina as condições tecnológicas da fabricação de pães e que o sistema de ligações dissulfeto de proteínas pode ser visto como um sistema dinâmico. O número e distribuição das ligações podem mudar dependendo das condições de mistura, presença de compostos sulfurados de baixo peso molecular, enzimas, etc. Por exemplo, a redução das ligações dissulfeto durante a mistura da massa e sua reoxidação durante o período de descanso têm sido experimentalmente demonstradas por muitos pesquisadores. Compostos sulfurados de baixo peso molecular, por exemplo, o glutathione reduzido (GSH), pode causar rompimento de pontes dissulfeto entre proteínas para formação de moléculas de proteína-S-S-G. Esta quebra de ligações entre as proteínas pode causar enfraquecimento da estrutura da massa.

A farinha de trigo é o principal ingrediente da massa de pão e por isso a sua avaliação reológica é de vital importância para a indústria de panificação, ajudando a prever as características de processamento da massa e a qualidade dos produtos finais (RAO e RAO, 1993), sendo parte de um conjunto de análises, onde necessariamente devem estar incluídos testes, para avaliar a capacidade de absorção de água da farinha e comportamento de mistura da massa bem como para determinar força e extensibilidade da massa (KIEFFER et al., 1998).

2.3.2 Água

É um dos principais ingredientes de uma massa, e sua qualidade e temperatura são de importância fundamental na qualidade final do produto que está sendo fabricado. Suas principais funções: dissolução de sais e açúcares; dispersão das células de leveduras; transporte de nutrientes para as leveduras através das membranas celulares. É necessária para a hidrólise do amido e açúcares e também para a gelatinização do amido durante o assamento. A água adicionada à farinha ativa as enzimas, possibilita a formação do glúten, altera as propriedades reológicas, determinando a consistência final da massa, contribuindo para a textura e a maciez do pão (GIL; CALLEJO; RODRIGUEZ, 1997).

A água é absorvida por proteínas, grânulos de amido íntegros e danificados e pentosanas presentes na farinha. A quantidade ideal é determinada por absorção, através de farinograma (STAUFFER, 1998). A quantidade de água absorvida depende da qualidade da farinha de trigo. Uma farinha de boa qualidade garante boa absorção e retenção de água durante o processamento da massa. Melhores resultados de volume são obtidos quando o nível de água absorvido é o maior possível antes da massa se tornar pegajosa, porém o volume não depende apenas da absorção de água, mas também do tempo de batimento (AUTIO et al., 2001).

Os efeitos da adição de água nas propriedades físicas do desenvolvimento mecânico da massa de pães foram estudados por Larsen e Greenwwod (1991). Eles avaliaram mudanças nas propriedades da massa, na umidade do miolo e na qualidade do pão produzido, variando de 54-68% a quantidade de água adicionada. Nesse

intervalo usado para adição de água não foi possível verificar efeitos no volume do pão, porém um gradiente de 8% de umidade entre o centro e as laterais do miolo pode ter conseqüências importantes na atividade das enzimas resistentes ao calor e que retardam o envelhecimento.

2.3.3 Gordura

A gordura age na massa, cobrindo cada partícula dela e garantindo uma textura macia, casca suave e, principalmente, conservando a umidade do produto final e retardando seu envelhecimento. Nas massas de pão, a gordura age como lubrificante interno, principalmente do glúten, mantendo-o elástico. Facilita a maquinabilidade, evitando o ressecamento da massa, tornando-a mais branda. Também melhora a aparência da casca, e contribui para o flavor do produto (STAUFFER, 1998).

A gordura, no nível mínimo de 0,7% sobre o peso da farinha, é essencial para a operação, mas não há dúvidas de que alguns agentes emulsificantes podem ser usados como substitutos da gordura, ou em combinação com a mesma, para produzir um aumento no volume do pão, na cor e na maciez do miolo. Segundo Penfield e Campbell (1990), a adição de 3% de gordura sobre o peso da farinha reduz a taxa de endurecimento dos pães.

2.3.4 Açúcar

A quantidade de açúcar que deve ser adicionada à formulação de pães varia de zero a 8,0% (PENFIELD; CAMPBELL, 1990). Experimentos já na década de 50, verificaram que em concentrações superiores a 10%, o açúcar retarda a fermentação da massa de pão no procedimento de massa direta. No método da esponja, açúcares como glicose, frutose e sacarose diminuem a produção de gás quando adicionados à massa em níveis de 6% (BARNHAM; JOHNSON, 1951).

O açúcar é substrato para a fermentação e para as reações de cor e sabor característicos no final do assamento, resultantes da reação de Maillard e de caramelização (QUAGLIA, 1991). A fermentação e as reações de escurecimento são responsáveis por produzir o sabor e o odor únicos de pão recém assado.

Quanto à cor, Bertram (1953) mostrou que no escurecimento da casca do pão durante o assamento, as reações de Maillard são mais importantes do que as reações de caramelização. Trabalhando com farinha de baixo teor de proteína, o pesquisador demonstrou que a cor da crosta apresentou características muito melhores quando a massa foi adicionada de nitrogênio do que quando adicionada de açúcar.

Quanto ao aroma, embora, Johnson, Rooney e Salem (1966) tenham verificado que a maioria das substâncias voláteis produzidas durante a fermentação é dissipada durante o assamento, mais de 70 compostos permanecem para contribuir com o "flavor". Esses componentes incluem ácidos orgânicos, álcoois, carbonilas e ésteres. Durante o resfriamento do pão, as substâncias responsáveis pelo sabor, produzidas

durante o escurecimento da crosta, se difundem através do miolo, realçando o sabor do pão.

2.3.5 Fermento

Saccharomyces cerevisiae é a levedura mais comum utilizada em panificação. Metaboliza açúcares como glicose, frutose, sacarose e maltose, sob condições anaeróbias, produzindo o gás carbônico (CO₂) necessário para o crescimento da massa e para a obtenção de compostos aromáticos característicos de produto de panificação fermentado. Há alguns tipos diferentes de fermento disponíveis para pão: biológico fresco, biológico seco e biológico seco instantâneo, este último é obtido por meio da desidratação de células de levedura, até que a umidade atinja valores entre 4 e 5% no final do processo. O empacotamento é feito a vácuo, o que permite alta durabilidade (1-2 anos) à temperatura ambiente. As principais vantagens incluem a dispensa de refrigeração, a excelente tolerância e um bom “salto” de forno, e o maior controle de fermentação em temperaturas elevadas, além de maior uniformidade das células do miolo do pão (GIANNOU, 2003).

2.3.6 Sal

O sal age na formação da rede de glúten, no controle da fermentação devido ao efeito osmótico na célula da levedura, e no controle do tempo de mistura. Uma pequena quantidade na massa do pão realça o sabor, favorece a ação das amilases e inibe a

das proteases, que poderiam despolimerizar as proteínas envolvidas no glúten (GIANNOU, 2003). A quantidade utilizada é aproximadamente de 2% sobre a farinha de trigo (QUAGLIA, 1991).

2.3.7 Melhoradores

O aditivo da panificação é definido como sendo qualquer ingrediente ou substância adicionado à formulação básica do pão. Em concentrações exatas, esses aditivos ajudam a melhorar a qualidade tecnológica do pão, ou neutralizar as deficiências existentes em seus ingredientes, ou ainda, proteger o pão, prolongando a vida de prateleira.

2.3.7.1 Amilases

As amilases desempenham função importante na fabricação do pão, particularmente durante a etapa de fermentação. Normalmente a farinha contém um percentual de açúcar, que corresponde à quantidade adequada para abastecer o fermento durante a primeira hora de fermentação. Entretanto, quando o tempo de fermentação é maior, é necessária a adição suplementar de açúcar, para fornecer mais metabólitos ao fermento. A carência de açúcar poderá reduzir a produção de gás pelo fermento, acarretando um menor volume e coloração pálida da crosta (STEAR, 1990).

A α -amilase atua nos grãos de amido danificados, nas moléculas de amilose e de amilopectina, quebrando-as em cadeias menores denominadas dextrinas,

diminuindo a quantidade de água que pode ser mantida pelo amido, tanto na massa quanto no pão depois de assado. A β -amilase, então, ataca parte da dextrina, para produzir maltose, que é metabolizada pelo fermento (CHAMBERLAIN; COLLINS; McDERMOT, 1981).

A maioria das farinhas contém naturalmente nível adequado de β -amilase, enquanto que, para a α -amilase o nível deve ser ajustado por adição, pois ocorre uma perda no processo de extração. Esse ajuste assegura a quantidade adequada e necessária de açúcar para o fermento durante a fermentação. Por outro lado, atividade excessiva de α -amilase produz crosta muito escura, estrutura aberta de miolo e presença de grandes quantidades de produtos de degradação do amido, o que provoca aumento de pegajosidade do miolo (CHAMBERLAIN; COLLINS; McDERMOT, 1981).

2.3.7.2 Glicose Oxidase

A glicose oxidase tem sido utilizada recentemente como agente melhorador de massa de farinha de trigo. Apesar disso, pouco se conhece do mecanismo de ação da enzima. Garcia et al. (2002) propuseram que o efeito positivo apresentado para as massas com adição de glicose oxidase estaria relacionado com a gelatinização das pentosanas e, ainda, o fortalecimento das ligações cruzadas entre as proteínas via mecanismo das pontes dissulfeto.

Vemulapalli, Miller e Hosene (1998) e Miller e Hosene (1999) sugeriram que a ação melhoradora nas propriedades da massa e do pão pode ser atribuída à introdução de ligações cruzadas dissulfeto na rede do glúten. Eles propuseram que a enzima

catalise a conversão da D-glicose, na presença de oxigênio, a ácido D-glicônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido, por sua vez, oxida, indiretamente, os grupos tióis de 2 resíduos de cisteína para formar ligações dissulfeto (Figura 2.5). Outras teorias alternativas têm sido discutidas por muitos autores. Ameille et al. (2000) sugeriram que, o peróxido de hidrogênio produzido pela reação catalisada pela glicose oxidase atua como substrato das peroxidases endógenas na farinha de trigo, que catalisa a formação de ligações cruzadas via ligações entre fenólicos (Figura 2.5).

Figura 2.5 Mecanismos propostos para a ação da glicose oxidase: (A) Formação da ligação cruzada dissulfeto (VEMULAPALLI; MILLER; HOSENEY, 1998); (B) Formação da ligação cruzada entre grupos fenólicos (AMEILLE et al., 2000).

2.3.7.3 Agentes oxidantes

As três contribuições mais importantes de oxidantes em panificação estão na substituição do processo de maturação da farinha de trigo que ocorre normalmente de um a dois meses após a sua produção; no branqueamento da farinha removendo a coloração amarelada; e no glúten conferindo força e elasticidade à estrutura para resistir ao estresse do batimento rápido. Esta última é a de maior interesse no comportamento da massa durante o seu processamento, porque melhora a reologia da massa e a capacidade de reter gases, de modo a produzir um pão de maior volume e melhor textura (STAUFFER, 1990).

Dallago et al. (2005) afirmaram que o ácido ascórbico geralmente é o componente mais aceito para melhorar a estrutura das massas de pães, devido à sua relativa segurança e aceitabilidade. O Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos não impõem limites para o seu uso em pães, porém a taxa de variação dos fabricantes é de 10 a 200 ppm dependendo da farinha de trigo.

Miller e Hoseney (1999) relataram que a oxidação aumentou a força da massa. Adicionando ácido ascórbico e azodicarbonamida (ADA) às massas, observaram aumento em ambos os parâmetros elasticidade e viscosidade.

A oxidação do ácido ascórbico para ácido dehidroascórbico, catalisada pela ácido ascórbico oxidase, necessita de oxigênio disponível na sua forma livre, cuja demanda é suprida durante a mistura da massa. O ácido dehidroascórbico formado oxida os resíduos de cisteína das proteínas (grupos SH) do glúten para formar pontes dissulfeto, reação catalisada pela ácido dehidroascórbico redutase, presente na farinha,

produzindo ácido ascórbico e produtos de condensação intermoleculares com aminoácidos, que podem contribuir para melhorar a qualidade do pão (LILLARD; SEIB; HOSENEY, 1982).

Nakamura e Kurata (1997) relataram que o ácido ascórbico e os compostos relacionados, ácido dehidroascórbico e o ácido 2,3 diceto-L-gulônico, são importantes melhoradores usados na produção de pão, pois afetam as propriedades da massa durante a mistura, especialmente a firmeza. Em concentrações de 70 a 120 ppm, o ácido ascórbico melhorou as propriedades de manuseio da massa e a qualidade do pão. Para concentrações de até 50 ppm, há um melhoramento gradual na cor do miolo; enquanto que, a textura melhora progressivamente até a adição de 75 ppm. Não houve diferenças significativas no aumento do volume ou na qualidade do miolo após a adição de 75 ppm até serem alcançadas concentrações de cerca de 300 ppm, mas é observado que o volume do pão é insatisfatório.

Os agentes oxidantes de ação rápida são iodato de potássio (KIO_3), iodato de cálcio ($\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$), peróxido de cálcio (CaO_2) e azodicarbonamida (ADA), não aceitos pela legislação corrente da Comunidade Européia. Contudo, sob a legislação do FDA (EUA) eles são permitidos quando usados a um nível máximo de 75 ppm, e 45 ppm para a azodicarbonamida. Os intervalos estimados para adição em processamento de massas panificáveis nos Estados Unidos para iodato de potássio, 3-20 ppm; iodato de cálcio, 3-20 ppm; peróxido de cálcio, 10-50 ppm e azodicarbonamida, 5-30 ppm (FDA, 2007).

A combinação desses agentes oxidantes de ação rápida com àqueles de ação lenta, tais como os bromatos, aumenta a consistência da massa quase que

imediatamente após a mistura. Dependendo da farinha usada no processamento, as combinações de 10 a 20 ppm de iodato de potássio, e 45-55 ppm de bromato de potássio são satisfatórias. O ácido ascórbico pode também ser usado como substituto, a uma concentração de 75 ppm. Com base no peso ele exibe uma atividade efetiva similar a do bromato de potássio, porém mais lenta do que a do iodato de potássio (NAKAMURA; KURATA, 1997).

Melhores resultados seriam obtidos se o iodeto fosse usado em combinação com o bromato de potássio. O bromato de potássio (KBrO_3), além do ácido ascórbico, está entre os agentes oxidantes mais conhecidos e mais econômicos que todos os outros, embora não sejam utilizados na maioria dos países europeus, com exceção da Inglaterra e Holanda. Por meio de estudos toxicológicos *in vivo* e *in vitro*, o Comitê Conjunto da FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (FAO/OMS, 1992) considerou o bromato de potássio como sendo um carcinógeno genotóxico, e, portanto, impróprio para uso como aditivo em farinhas e pães.

O uso em qualquer quantidade do bromato de potássio, como aditivo alimentar, é rigorosamente proibido no Brasil desde 1970, pela Resolução nº 15/70 de 16/09/70 da Comissão de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) e pela Lei nº 10.273 de 05/09/2001 (ANVISA, 2001).

2.3.7.4 Emulsificantes

Os emulsificantes são utilizados em panificação a fim de retardar o envelhecimento dos pães, para reduzir o tempo de mistura dos ingredientes, para melhorar o manuseio e a força da massa e para aumentar a tolerância ao tempo de

descanso e de fermentação. Está bem estabelecido que os efeitos dos emulsificantes na performance funcional das massas e subsequente qualidade do pão dependem da natureza, da origem e do tamanho das partículas, além da quantidade adicionada na formulação destas, condições de processamento e ingredientes (COLLAR et al., 1999).

Crowley, Grau e Arendt (2000) estudaram os efeitos da gordura e emulsificantes em cinco diferentes tipos de pães produzidos com diferentes tempos de mistura (90, 150 e 240 segundos). Os miolos dos pães foram avaliados por meio de um sistema digital de análise por imagem (sistema PC IA), e os resultados apresentaram diferenças significativas entre os tipos de pães, com gordura ou emulsificante ou tempo de mistura. Concluíram que os cinco tipos de pães poderiam ser distinguidos somente pelas características das células do miolo.

A propriedade do emulsificante, de aumentar o volume do pão e prolongar o frescor da casca, é comparável à adição de gordura na massa dos pães. Estudos da substituição da gordura pelo uso de emulsificantes têm sido realizados devido à demanda por produtos de baixa caloria (STAMPFLI; NERSTEN, 1995).

Os emulsificantes são categorizados em duas classes: os que formam complexos com o amido e os que atuam na interação de proteínas. Aqueles favorecem a maciez do miolo e previnem o envelhecimento, como os monoglicerídeos; estes são fortalecedores de massa, aumentando a capacidade do glúten de formar um filme que retém o gás produzido pela levedura, como os estearoil-2-lactil lactatos (KROG, 1981).

Os monoglicerídeos adicionados à massa do pão na forma de hidratos β -cristalinos, formam filmes de β -cristais que se adsorvem à superfície dos grânulos de amido durante a mistura da massa. Na etapa de assamento, na temperatura de 50 °C

antes da gelatinização do amido, os β -cristais dos monoglicerídeos são transformados em uma forma ativa e se complexam com a amilose. Por isso, o intumescimento dos grânulos de amido é retardado e a quantidade de amilose livre formada é diminuída com a reação com emulsificantes, resultando em estruturas mais macias de miolo. Ainda, devido ao reduzido intumescimento do amido mais água torna-se disponível para a fase protéica, e pode indiretamente influenciar a distribuição de umidade entre o amido e o glúten (KROG, 1981).

Ésteres de ácido diacetil tartárico de mono e diglicerídios (DATEM), estearoil-2-lactil lactato de sódio (SSL), estearoil-2-lactil lactato de cálcio (CSL) e o polisorbatos são os mais utilizados em produtos de panificação (BRANDT, 1996).

O CSL é um sólido com alto ponto de fusão, que pode ser adicionado à massa em forma de pó, sozinho ou com outros aditivos. Melhora a retenção de gás em massas e a vida de prateleira do produto, devido à capacidade de se ligar à amilose. Por ser miscível com gordura, é ideal para pães que contenham esse lipídeo, e apresenta melhores resultados quando o produto contém, além da gordura, açúcar. O Polisorbato 80 (PS80) atua na interação de proteínas, melhorando a retenção de gás, a textura e o volume (BRANDT, 1996). No Brasil o uso é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999).

2.3.7.5 Transglutaminase

A enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13; proteína-glutamina γ -glutami-transferase), a TGase, é um tipo de transferase que catalisa reações de acil-transferência entre os grupos γ -carboxiamida dos resíduos dos aminoácidos glutamina ligados em proteínas ou peptídeos (acil doadores) e uma variedade de aminas primárias (acil aceptores), introduzindo ligações cruzadas covalentes (Figura 2.6).

Figura 2.6 Reação de acil-transferência entre resíduo glutamyl e amina primária catalisada pela enzima transglutaminase.

Quando os grupos ϵ -amínicos dos resíduos de lisina ligados em proteínas atuam como receptores de acil, nas reações catalisadas pela transglutaminase formam-se ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamyl)lisina, inter- e intra-moleculares (Figura 2.7). Essas ligações cruzadas resultam em mudanças nas propriedades funcionais das proteínas de soro, soja, glúten, miosina e actomiosina. Essas modificações podem produzir alterações na textura dos alimentos, formar filmes protéicos resistentes à água e ao calor, permitir tratamentos térmicos em géis sem alteração da estrutura, melhorar elasticidade, aumentar capacidade de retenção de água, alterar solubilidade, além de produzir proteínas alimentares com alto valor nutricional através de ligações cruzadas

entre diferentes proteínas complementando aquela contendo aminoácido essencial limitante (ZHU et al., 1995).

Figura 2.7 Reação entre resíduos protéicos de lisina e glutamina catalisada pela enzima transglutaminase.

A quantidade de ligações cruzadas depende da acessibilidade à ação enzimática de resíduos de lisina e de glutamina livres no substrato protéico. Quando não há aminas primárias, a água age como o acil receptor e os resíduos de glutamina são deamidados (Figura 2.8). Se os grupos amínicos dos substratos puderem ser bloqueados usando um método econômico e seguro, essa reação pode ser usada para mudar o ponto isoelétrico e a solubilidade de uma proteína. Todavia, não há um reagente bloqueador apropriado que seja seguro à ingestão (NONAKA et al., 1996), e essa reação de deamidação não é utilizada nas indústrias de alimentos até o momento.

Figura 2.8 Reação de deamidação do resíduo glutamyl catalisada pela enzima transglutaminase.

A transglutaminase é encontrada em grande variedade de organismos eucariotas. Essas transglutaminases eucariotas, Ca^{2+} -dependente, estão envolvidas em numerosas funções biológicas que vão da coagulação sanguínea à diferenciação celular (JUNQUA et al., 1997). Podem ser encontradas no fígado e no sangue de mamíferos, na moela e no sangue de aves, nos músculos e nas ovas de pescados, nos tecidos de alguns vegetais e em microorganismos. No sangue humano, é conhecida como Fator XIIIa, um dos responsáveis pela coagulação sanguínea (KURAISHI; SAKAMOTO; SOEDA, 1996).

A transglutaminase foi encontrada em tecidos animais e vegetais (FOLK, 1980; FALCONE; SERAFINI-FRACASSINI; DEL DUCA, 1993; YASUEDA; KUMAZAWA; MOTOKY, 1994) e em microorganismos (ANDO et al., 1989). Desde os anos 60, a purificação, caracterização e aplicação da TGase Ca^{2+} -dependente de origem animal, principalmente de fígado de porquinho-da-índia, foi intensamente estudada (FOLK e COLE, 1965, 1966; CONNELLAN et al., 1971; FOLK, 1980; BROOKHART; MAMAHON; TAKAHASHI, 1983; MATHEIS; WHITAKER, 1987; SINGH, 1991; LARRÈ et al., 1992, 1993a). O fígado de porquinho-da-índia foi a única fonte comercial da TGase por décadas.

Apesar da escassa fonte e os processos de separação e purificação complexos para obter a enzima de tecidos, Singh (1991) relatou uso de TGase Ca^{2+} -dependente em muitas proteínas alimentares. Verificou que caseínas são mais sensíveis à ação da enzima que as proteínas do soro, e ainda, a velocidade de reação nas globulinas 11S é maior do que nas globulinas 7S da soja.

Estudos comparativos entre as propriedades funcionais das proteínas tratadas com TGase Ca^{2+} -dependente e aquelas nativas, também foram realizados. Motoki, Nio e Takinami (1984) relataram diferenças entre α_{s1} -caseína e globulinas da soja, na solubilidade, na estabilidade das emulsões e na capacidade de retenção de água. Tanimoto e Kinsella (1988) mostraram aumento na viscosidade dos géis e maior estabilidade a altas temperaturas para as β -globulinas modificadas.

Ando et al. (1989) foram os primeiros a explorar a possibilidade de se obter uma enzima extraída de microorganismos. Isolaram quase 500 cepas de vários microorganismos. Entre elas, o *Streptoverticillium* sp. linhagem s-8112, ou *Streptoverticillium mobaraense* (derivado de uma variante do *Streptomyces mobaraensis*), foi encontrado ter capacidade de produzir transglutaminase. Motoki et al. (1989) apud Zhu et al. (1995) relataram que outras linhagens de *Streptoverticillium*, como *S. griseocarneum*, *S. cinnamomeum* subespécie *cinnamomeum*, também expressam a enzima.

Independentemente da cultura, a produção da enzima é obtida por meio de fermentação aeróbica com aeração e agitação constantes. A temperatura para crescimento e formação de produto está na faixa entre 25 e 35 °C, e o tempo de fermentação é dependente das condições utilizadas e determinado pela mais alta atividade de transglutaminase que pode ser encontrada, normalmente entre 2 e 4 dias. A transglutaminase microbiana (MTGase) é uma enzima extracelular dissolvida no caldo de fermentação, separada e purificada por uma combinação de métodos de tal maneira que aumente a sua eficiência e a recuperação (ZHU et al., 1995).

Pesquisas surgiram para caracterizar a então enzima produzida por fermentação e que prometia avanços na tecnologia de ingredientes para aplicação em alimentos protéicos. Estudos mostraram a formação das ligações cruzadas na presença da MTGase e também a relação de independência com o cálcio (Tabela 2.5) (ANDO et al., 1989).

Tabela 2.5 – Dependência de Ca^{+2} na atividade da TGase de microorganismo e da TGase de fígado de porquinho-da-índia.

Concentração de CaCl_2 (mM)	Atividade de TGase de microorganismos (%)	Atividade TGase de fígado de porquinho da Índia (%)
0	100	0
1	100	39
5	99	100

Fonte: Ando et al. (1989).

A polimerização de proteínas e a formação de géis foram observadas quando α_{s1} -caseína e globulinas de soja foram tratadas com a transglutaminase microbiana (NONAKA et al, 1989). A especificidade da MTGase foi estudada usando substratos sintéticos como modelo (Tabela 2.6). Os substratos utilizados contêm o radical Z e peptídeos com resíduos glutamyl, lisil e asparagil. A atividade da enzima apresentou valores diferentes em função da localização do resíduo glutamyl nos peptídeos. Este resultado sugere que a capacidade da proteína em agir como substrato para a transglutaminase é afetada pela posição da glutamina na cadeia peptídica (ANDO et al., 1989).

Tabela 2.6 – Especificidade da MTGase para substratos sintéticos.

Substrato	Atividade (%)
Z-Gln-Gly	100
Z-Gln-Gly-OEt	65
Z-Gln-Gln-Gly	38
Z-Gln-Gln-Gly-Gly	13
Z-Gly-Gly-Gln-Gly	28
Z-Gln	0
Z-Asn-Gly	0
Gly-Gln-Gly	0

Z = grupo Benziloxycarbonil ($C_6H_5CH_2OCO-$)

Fonte: Ando et al. (1989).

Outros parâmetros cinéticos também foram determinados. A MTGase é altamente ativa em uma larga faixa de pH que vai de 5 a 8. Não há, portanto, nenhum problema de inativação para a maioria dos processamentos empregados em alimentos. A enzima é estável até a temperatura de 50 °C, velocidade máxima, e a partir daí a atividade começa a reduzir-se gradualmente. Embora a inativação da MTGase esteja comprovada a 75 °C para a maioria dos alimentos, as temperaturas e tempos necessários para a inativação são diferentes e depende do tipo de alimento em estudo (ANDO et al., 1989).

Kanaji et al. (1993) estabeleceu a completa seqüência de aminoácidos da enzima Transglutaminase Microbiana (MTGase) produzida pelo *Streptoverticillium* sp. linhagem s-8112, por meio da combinação de métodos como espectrometria de massa, o método padrão de degradação de Edman, e a purificação por cromatografia líquida de

alta performance. A enzima contém 331 aminoácidos (Figura 2.9), peso molecular de 37.863 Daltons e um resíduo de cisteína essencial à sua atividade.

Fonte: Kanaji et al., 1993.

Figura 2.9 Estrutura primária da MTGase, com indicações de seqüências com conformações α -hélice e folha β .

Kashiwagi et al. (2002) determinaram a estrutura da MTGase (*Streptoverticillium* sp. linhagem s-8112; *Sv. morabaense*) através de cristalografia por raio-X (Figura 2.10), na tentativa de correlacionar estrutura e função da enzima e obter informações básicas que pudessem auxiliar nas várias aplicações industriais desta.

A estrutura cristalina foi determinada a resolução de 2,4 Å. Forma um simples e compacto domínio com dimensões gerais de 65X59X41 Å, apresentando uma fenda profunda na borda da molécula onde se localiza o resíduo catalítico, Cys⁶⁴, no *loop* entre as hélices α_2 e α_3 (KASHIWAGI et al., 2002).

Fonte: Kashiwagil et al. (2002).

Figura 2.10 Estrutura da MTGase. A- Vista frontal e B- Vista superior da molécula. O sítio ativo da enzima resíduo (Cys⁶⁴) está representado pelo ponto C64. A estrutura contém 11 α -hélices concentradas na extremidade amino-terminal e 8 folhas β na extremidade carboxi-terminal da molécula.

A Figura 2.11 mostra a distribuição dos resíduos hidrofóbicos e aromáticos da MTGase. Há uma quantidade grande de resíduos aromáticos, incluindo Trp⁵⁹, Tyr⁶², Trp⁶⁹, Tyr⁷⁵, Tyr²⁷⁸, Tyr²⁹¹, Tyr³⁰² na superfície circundando a fenda do sítio ativo.

Fonte: Kashiwagil et al. (2002).

Figura 2.11 Modelo van der WAALS da MTGase. A- Vista frontal. B- Vista posterior. Os resíduos aromáticos e hidrofóbicos (Phe, Tyr, Val, Ile, Leu and Met), Cys⁶⁴, e os outros resíduos estão pintados de azuis, vermelho e verdes, respectivamente.

Sakamoto, Kumazawa, e Motoki (1994) avaliaram a resistência à quebra oferecida por géis obtidos de várias proteínas como de isolado protéico de soja (PSI), caseinato de sódio, gelatina e proteínas do ovo. Compararam os resultados com aqueles obtidos dos experimentos com géis preparados com as mesmas proteínas, porém tratadas previamente com MTGase, em diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de enzima. Ajustando-se as condições para cada proteína, verificaram que ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamil)lisina foram formadas na presença da transglutaminase, que a quantidade das ligações formadas foi proporcional à concentração de enzima utilizada e que a força dos géis também aumentou em relação àqueles produzidos com proteínas sem tratamento enzimático.

Zhu et al. (1995) revisaram estudos relacionados com a MTGase e a sua aplicação em diversas fontes de proteínas alimentares. Pesquisadores japoneses avaliaram os efeitos da enzima em produtos derivados de carne, peixe, krill, colágeno, trigo, soja, derivados de leite, gelatina e outros. Para os produtos derivados de carne, peixe e krill, as principais mudanças foram em relação à elasticidade, textura, *flavour* e aparência (Figura 2.12). Com relação ao trigo foi observada melhor textura e aumento de volume para formulações adicionadas da enzima, e para a soja, melhor textura e aumento da vida de prateleira para produtos como tofu.

Fonte: Ajinomoto – Material Técnico, 1997

Figura 2.12 Pedacos reestruturados de carne de peixe e de frango.

Babiker et al. (1996) trabalharam com proteínas de soja hidrolisadas em meio ácido e enzimaticamente. Os hidrolisados de soja apresentavam baixa solubilidade, baixa capacidade emulsificante e espumante, além de sabor amargo devido à presença de peptídeos ricos em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Os hidrolisados foram

tratados com MTGase resultando em polimerização de parte das frações protéicas. Ocorreu aumento da solubilidade apesar do aumento do peso molecular, que foi justificado pela mudança dos resíduos hidrofóbicos expostos dos peptídeos para o interior das moléculas; aumento da capacidade emulsificante e espumante quando comparada com proteína nativa e com a hidrolisada, e redução do sabor amargo.

Seguro et al. (1996) determinaram a biodisponibilidade da lisina, expressa como a razão da eficiência protéica (PER) e o valor biológico (VB) em ratos. Estes foram alimentados com dietas contendo caseína nativa e com caseína modificada com MTGase. Os resultados mostraram que nenhuma diferença significativa foi observada no ganho de peso, PER e VB entre os ratos alimentados com as dietas acima mencionadas, sugerindo que a ligação cruzada ϵ -(γ -glutamil)lisina foi absorvida quase que totalmente (99%) no corpo.

Kuraishi, Sakamoto e Soeda (1997) trabalhando com géis protéicos verificaram que o uso de MTGase pode conferir a uma proteína a capacidade de formar gel e, para aquelas que já têm essa propriedade funcional, a capacidade formar géis mais firmes. A força de ruptura do gel varia com o aumento do número de ligações ϵ -(γ -glutamil)lisina, resultados que estão de acordo com aqueles obtidos por Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994). Entretanto, excesso de MTGase causa um decréscimo na força do gel, e este, por sua vez, perde sua capacidade de retenção de água, podendo ocorrer a sinerese. Além disso, o excesso de ligações ϵ -(γ -glutamina)lisina pode inibir o desenvolvimento uniforme da rede protéica. Além de propiciar a formação de géis protéicos, o uso da MTGase pode conferir também viscosidade em dispersões protéicas e aumento da estabilidade térmica dos alimentos.

A capacidade de retenção de água também pode ser alterada. O gel formado por ligações ϵ -(γ -glutamina)lisina apresenta uma melhor capacidade de retenção de água. Assim com o uso da MTGase, géis alimentícios com boa capacidade de retenção de água podem ser produzidos sem adição de gelatina (KURAISHI; SAKAMOTO; SOEDA, 2000).

Nonaka et al. (1997) compararam a formação de géis de caseinato de cálcio em leite desnatado adicionado de leite em pó e em leite desnatado adicionado de MTGase na razão de 0,4%, enzima/ proteína de leite. Ambos os sistemas formaram géis firmes. Este estudo demonstrou que a enzima melhora a textura de alimentos protéicos. Como resultado, foi observado que o gel formado pela coagulação do leite fica mais viscoso à medida que novas ligações cruzadas são introduzidas.

Uma rede mais compacta pode ser também formada quando um tratamento térmico (95 °C/5 min) é aplicado ao leite antes da coagulação. Isso ocorre devido à associação da β -lactoglobulina desnaturada com as micelas de caseína, ocorrendo a formação das pontes dissulfeto (FAEGEMAND; QVIST, 1997).

Para Lorenzen e Schlimme (1998), a aplicação da transglutaminase no processamento de proteínas em produtos lácteos poderiam promover: aumento da firmeza do gel e diminuição da sinerese em iogurtes; aumento do rendimento e diminuição da sinerese na produção de queijos; aumento da capacidade de retenção de água e aumento das propriedades de gelificação de sorvetes; aumento da viscosidade e das propriedades de gelificação e emulsificação em caseinatos; obtenção de concentrados lácteos gelificados como ingredientes para sobremesas lácteas; melhoria das propriedades físicas de cremes batidos e possibilita a utilização de proteínas micro-

particuladas como substitutos de gordura; produção de filmes alimentícios a base de soro e imobilização de enzima a partir da α s₁-caseína.

Foltran et al. (2001) trabalharam com requeijão cremoso acrescentando na sua formulação 0,02% de MTGase. O produto apresentou melhores características reológicas e sensoriais e, além disso, apresentou aumento de 12,4 % no rendimento e redução de 38% no custo final do produto em relação ao controle (requeijão fabricado sem adição de MTGase).

Segundo Oliveira (2003), a utilização da transglutaminase pode ser uma alternativa tecnológica viável, resultando na produção de queijos com características reológicas e sensoriais satisfatórias, e possibilitando um melhor aproveitamento do leite, reduzindo os custos e aumentando a lucratividade para a indústria.

A Tabela 2.7 mostra um resumo das proteínas alimentares, como substratos.

Tabela 2.7 - Afinidade da MTGase pelos seus substratos.

	Proteína Alimentar	Afinidade	Referências
Leite	Caseína	●	Motoki, Nio e Takinami (1984); Singh (1991); Nonaka et al. (1989); Seguro et al. (1996); Lorenzen e Schlimme (1998); Lauber, Henle e Klostermeyer (2000).
	Caseinato de Sódio	●	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994); Nonaka et al (1997).
	α -Lactalbumina	Δ	Singh (1991); Faergemand et al. (1999); Truong et al (2004); Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004)
	β -Lactoglobulina	Δ	Tanimoto e Kinsella (1988); Singh (1991); Faergemand e Qvist (1997); Faergemand et al. (1999); Truong et al (2004); Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004).
Ovos	Proteína da Clara	Δ	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994).
	Proteína da Gema	○	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994)
Carnes	Mioglobina	Δ	Kuraishi, Sakamoto e Soeda (2000)
	Colágeno	○	Kuraishi, Sakamoto e Soeda (2000)
	Gelatina	●	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994).
	Miofibrila: Miosina	●	Motoki e Seguro (1998); Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004)
	Miofibrila: Actina	X	Motoki e Seguro (1998); Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004)
	Globulina 11S	●	Motoki, Nio e Takinami (1984); Nonaka et al. (1989); Singh (1991); Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994); Babiker et al. (1996).
Soja	Globulina 7S	●	Motoki, Nio e Takinami (1984); Nonaka et al. (1989); Singh (1991); Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994); Babiker et al. (1996).
	Gliadina	○	Gerrard et al (1998); Gerrard et al (2000);
Trigo	Glutenina	○	Gerrard et al (1998); Gerrard et al (2000);

Onde: ● reage muito bem; ○ reage bem; Δ reage dependendo das condições; X em geral não reage.

A Tabela 2.8 resume as principais propriedades funcionais das proteínas afetadas pela ação da enzima transglutaminase.

Tabela 2.8 – Ação da MTGase nas propriedades funcionais das proteínas alimentares.

Proteínas	Propriedades funcionais	Referências
Caseína	Textura; capacidade de retenção de água; capacidade espumante e de emulsificação.	Kuraishi, Sakamoto e Soeda (1997); Faergemand et al. (1999); Foltran et al. (2001); Oliveira (2003).
Caseinato de Sódio	Capacidade de gelificação e textura	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994); Nonaka et al (1997).
β -Lactoglobulina	Capacidade de gelificação; capacidade de retenção de água; estabilidade térmica.	Faergemand e Qvist (1997); Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004).
Proteína da Gema	Capacidade de emulsificação e gelificação	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994).
Gelatina	Capacidade de retenção de água e de gelificação; estabilidade térmica; viscosidade.	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994); Kuraishi, Sakamoto e Soeda (2000 e 2001).
Miofibrila (carne, peixe, krill): Miosina	Textura; solubilidade; capacidade de retenção de água; estabilidade térmica.	Zhu et al. (1995); Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004)
Soja (Globulinas 11S e 7S)	Textura; solubilidade; capacidade espumante, de emulsificação e de gelificação	Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994); Zhu et al. (1995); Babiker et al. (1996).
Glúten (Gliadinas e Gluteninas)	Capacidade de retenção de água; textura.	Zhu et al. (1995); Gerrard et al (1998); Larrè et al. (2000); Gerrard et al. (2000).

Zhu et al. (1998a, b) e Meiyang, Guocheng e Jian (2004) estudaram diferentes meios de cultura; condições ótimas de crescimento e de fermentação em batelada (pH, temperatura e agitação) com o objetivo de avaliar o comportamento de novas linhagens de microrganismos para a produção de MTGase. O principal microrganismo estudado

foi *Streptoverticillium mobaraense*. Os esforços, segundo esses pesquisadores, são para aumentar a capacidade de fermentação e para produzir mais enzimas e com maior atividade, com o objetivo de diminuir custos e aumentar o emprego destas em processos industriais.

Soares, Assmann e Ayub (2003), seguindo a linha dos pesquisadores anteriores também estudaram vários microorganismos coletados da Região Amazônica com o objetivo de desenvolver procedimentos de produção e purificação e caracterização de uma nova enzima com atividade transglutaminásica. Uma linhagem de *Bacillus circulans* foi a que produziu a enzima com maior rendimento e atividade.

A Tabela 2.9 mostra um resumo das características das transglutaminases obtidas de diferentes fontes.

Tabela 2.9 – Parâmetros da caracterização das TGases obtidas por diversas fontes.

Enzima	Fonte	Relação Ca ⁺²	MM (Da)	Km (mM)	Vmáxima(*) (μmoles/min.mg)	pI	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Autores
TGase	Mamíferos (porquinho-da-Índia)	dependente	90.000	0,66	(37 ± 1)	4,5	6,8 – 7,0	37,5	Folk e Cole (1966)
MTGase	<i>Streptovorticillium morabaense</i>	independente	37.863			8,9	6,0 - 7,0	50	Kanaji et al. (1993); Zhu et al. (1998a,b)
MTGase	<i>Bacillus circulans</i>	independente	45.000	0,87		6,3	6,0 - 8,0	47	Soares, Assmann e Ayub (2003)
MTGase	<i>Bacillus subtilis</i>	independente	29.000				8,2	60	Suzuki et al. (2000)

(*) a medida de atividade foi realizada pelo método do Hidroxamato (GROSSOWICZ et al., 1950).

As reações catalisadas pela TGase são caracterizadas pela formação de um complexo tioléster acil-enzima resultante do ataque do grupo tiol do sítio ativo de um resíduo de cisteína na enzima ao grupo γ -carboxiamida do substrato glutamina. Na segunda etapa, o grupo ϵ -amino da lisina reage com o intermediário tioléster para formar uma amida (MACEDO et al., 2000) (Figura 2.13).

Fonte: Macedo et al. (2000).

Figura 2.13 Mecanismo hipotético de ação da MTGase no seus substratos.

Kashiwagi et al. (2002) apresentaram o mecanismo catalítico hipotético da MTGase. Além dos resíduos de glutamina e lisina também mostraram os resíduos da histidina e asparagina formando a tríade “Cys-His-Asp” que faz parte do centro catalítico da transglutaminase (fator XIII) do sangue humano (Figura 2.14). Apesar da histidina não ser essencial para a atividade catalítica da MTGase, ela aparece juntamente com a asparagina circundando a cisteína nas duas enzimas. Para esses autores esses resultados podem implicar que ambas as enzimas estão relacionadas pela evolução convergente.

Fonte: Kashiwagi et al. (2002)

Figura 2.14 Mecanismo catalítico hipotético da MTGase.

O método colorimétrico do hidroxamato descrito por Grossowicz et al. (1950) é usado para medida da atividade da MTGase. A atividade pode ser medida incorporando-se hidroxilamina, uma amina primária usada como substrato acil aceptor, ao carbobenzoxy-L-glutamyl-glicina, Z-Gln-Gly, um substrato sintético usado como substrato γ -glutamyl doador. A quantidade de ácido hidroxâmico produzido é medida espectrofotometricamente a 525 nm (Figura 2.15). A unidade enzimática é definida

como a formação de 1 μ M de ácido hidroxâmico em um minuto por unidade de massa a 37 °C (FOLK e COLE, 1996).

Fonte: Folk e Cole (1996).

Figura 2.15 Reação envolvida na medida da atividade da MTGase (Método Hidroxamato).

Macedo, Marrano e Keillor (2000) desenvolveram um método espectrofotométrico direto e contínuo para determinar a atividade da TGase usando N,N-dimetil-1,4-fenilenediamina (DMPA) como substrato γ -glutamil acceptor e o carbobenzoxy-L-glutamyl-glicina, Z-Gln-Gly como substrato γ -glutamil doador. O composto anilida formado é um cromóforo que absorve luz a 278 nm. A atividade da transaminação da TGase pode ser medida, então, monitorando o aumento da absorbância da anilida resultante a 278 nm (Figura 2.16).

Fonte: Macedo, Marrano e Keillor (2000).

Figura 2.16 Reação envolvida na medida da atividade da MTGase (Método DMPDA).

As características das proteínas são um dos principais parâmetros que afetam a qualidade da farinha e consequentemente a qualidade da panificação do trigo (MacRITCHIE, 1987). Como já mencionado anteriormente vários fatores afetam a qualidade final do glúten, desde variedade genética do cultivar do trigo até condições ambientais, infestação de insetos e condições de armazenamento. Por esses motivos entre outros, diversos centros de pesquisas e universidades têm desenvolvido programas para melhorar a qualidade do trigo. Contudo alguns cultivares em uso não são apropriados para a panificação e requerem modificações nas proteínas para atingirem as propriedades reológicas necessárias.

Condicionadores de massa foram desenvolvidos para suprir as deficiências na qualidade. Os agentes oxidantes, ácido ascórbico, azodicarbonamida e bromato de potássio são os mais utilizados até então. Porém devido a recentes indicações de que alguns deles podem causar câncer, o uso destes compostos tem sofrido restrições (ROSELL et al., 2003).

O uso de enzimas é a melhor alternativa em relação aos compostos químicos, pois são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) e não permanecem ativas após o assamento. Rosell et al. (2003) relataram que entre as enzimas que podem conferir força à massa estão as transglutaminases (MTGases) e glicose oxidase (GO). Essas enzimas atuam por mecanismos diferentes e podem induzir mudanças nas formas polimerizadas das subunidades das gluteninas e transformar proteínas solúveis em insolúveis, melhorando suas propriedades funcionais.

Gerrard et al (1998) foram os primeiros pesquisadores que utilizaram a MTGase em produtos derivados de trigo. Sugeriram que a enzima poderia produzir efeitos benéficos durante a fabricação de pães comparáveis àqueles produzidos pelos melhoradores oxidantes tradicionais. Como resultado eles obtiveram melhora acentuada na força do miolo, redução do trabalho mecânico aplicado à massa e aumento da absorção de água, e consideraram o fato de que cada um desses efeitos poderia reduzir custos de produção para panificados.

Gerrard et al. (2000) avaliaram os efeitos da ação da MTGase em massas laminadas. Observaram inicialmente que as massas adicionadas da enzima ficaram ligeiramente mais rígidas que as do controle e que a laminação foi ligeiramente prejudicada pelo decréscimo na extensibilidade da massa. Outras etapas do processo não foram afetadas pela ação da MTGase. As massas dos *croissants* tratadas com a enzima apresentaram-se mais lisas, e no descongelamento do produto, a crosta apresentou-se mais resistente à quebra e o miolo mais uniforme e sem buracos. Os produtos apresentaram aumento acentuado de volume que foi atribuído ao tempo extra que a enzima tem para agir durante o descongelamento.

Köksel et al. (2001) investigaram a possibilidade do uso da MTGase na reparação da estrutura das proteínas do glúten hidrolisadas pelas proteases existentes em insetos que atacam o grão de trigo. Eles primeiramente compararam os efeitos nas propriedades reológicas fundamentais, como extensibilidade e elasticidade de massas preparadas com farinha de trigo saudável com àquelas preparadas com farinha de trigo danificado por insetos. Verificaram que estas sofreram rápida deterioração nas suas propriedades e produziram pães de baixa qualidade. Com a adição da MTGase nesta formulação os pesquisadores relataram que a enzima reconstrói substancialmente a estrutura da massa hidrolisada.

A AJINOMOTO CO., INC. (Tóquio, Japão) possui a patente mundial para a produção da MTGase, produzida por fermentação pelo microorganismo *Streptoverticillium mobaraense* destinada à aplicação em alimentos. No Brasil, a sua utilização ainda é restrita aos setores de carnes e frutos do mar, sendo ainda pouco conhecidos os efeitos das aplicações em produtos lácteos e em massas alimentícias.

A transglutaminase empregada em alimentos recebe o nome de ACTIVA[®] TG. A empresa possui vários tipos de preparações da enzima, que diferem quanto ao veículo utilizado e à atividade e, portanto, do tipo de aplicação a que se destina. Neste trabalho foi utilizada a preparação de enzima ACTIVA[®] STG-M, que consiste na mistura de enzima MTGase e amido e destinada a aplicação em massas secas e frescas, pães, massas de pizzas e outros.

2.4 QUALIDADE DO PÃO

Para avaliação da qualidade do pão muitos parâmetros podem ser analisados. Medidas físicas, químicas, sensoriais e instrumentais podem ser realizadas na casca e no miolo e definidas como um determinado padrão de qualidade, resultantes de mudanças nas formulações, nas condições de processo e armazenamento.

2.4.1 Características Externas e Internas

As características externas freqüentemente avaliadas em pães são as dimensões do produto, aparência, cor e formação da casca. As internas são distribuição, tamanho e número de alvéolos no miolo, cor e textura (CAUVAIN e YOUNG, 1998). Na avaliação sensorial, são verificados parâmetros de sabor, aroma, cor e textura.

O volume específico, ou razão entre volume e a massa, é um parâmetro de qualidade que indica se a fermentação do pão foi excessiva, resultando num volume específico muito grande, ou se ocorreram problemas na formação do glúten ou na fermentação, resultando num baixo volume específico (BUSHUK, 1985).

2.4.2 Textura

Assim como o sabor, a textura é um importante indicador de qualidade de um alimento e determinante na aceitação deste pelo consumidor (STEAR, 1990).

Segundo Szczezniak (1988; 2002), textura é a manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais, mecânicas e superficiais de alimentos, detectados por meio dos sentidos de visão, de audição, de tato e de sinestesia. Os analisadores de textura detectam e quantificam certos parâmetros físicos que posteriormente são interpretados em termos de percepção sensorial. É um atributo de múltiplos parâmetros, e é derivado da estrutura do alimento, sendo detectável por vários sentidos, sendo os mais importantes o tato e a pressão.

2.4.2.1 Textura do Pão – Método TPA

A análise de textura de alimentos sólidos e semi-sólidos pode ser realizada pelo método TPA (*Texture Profile Analysis*) aplicável tanto para medidas sensoriais, como para instrumentais. O método instrumental baseia-se em comprimir o alimento pelo menos duas vezes e quantificar parâmetros mecânicos a partir de curvas força-deformação. Excelentes correlações entre análise de textura experimental e sensorial foram encontradas para o parâmetro firmeza (SZCZESNIAK, 2002).

Moore et al. (2006) avaliaram a influência de diversas fontes de proteínas (leite, soja e ovo) em combinação com adição de diferentes níveis de MTGase na qualidade do pão. Foram determinados volume específico, cor, textura e teor de umidade. A

firmeza do miolo do pão foi monitorada por um tempo de cinco dias de armazenamento e os testes foram realizados segundo método de TPA.

Collar e Armero (1996) relataram que mudanças realizadas na massa do pão refletem diretamente na qualidade do produto final. Utilizaram método TPA com a finalidade de acessar as propriedades de textura da massa e correlacionar com as do pão. As altas correlações das medidas do TPA com outros testes reológicos instrumentais (farinógrafo) propriedades químicas (*Gluten Index*) e físico-químicas (volume específico e umidade) e características sensoriais da qualidade do pão também foram relatadas pelos autores.

A Tabela 2.10 mostra as definições de parâmetros mecânicos de textura em relação aos sensoriais.

Tabela 2.10 – Definições de parâmetros mecânicos de textura.

PARÂMETROS	FÍSICO	SENSORIAL
FIRMEZA	Força necessária para atingir uma dada deformação.	Força requerida para comprimir uma substância sólida entre os dentes incisivos.
COESIVIDADE	Extensão que o material pode ser deformado antes da ruptura.	Grau de deformação da amostra antes da ruptura com os molares.
ELASTICIDADE	Taxa em que o material deformado volta para a condição inicial.	Grau em que o produto retorna para sua forma original quando comprimido entre os dentes.
MASTIGABILIDADE	Energia requerida para desintegrar um alimento a um estado pronto para ser engolido.	Número de mastigações necessárias, com força constante, para reduzir a amostra a uma consistência adequada para ser engolida.

Fonte: Adaptado de Szczesniak (2002).

A curva força em função do tempo (Figura 2.17) da análise de TPA, gerada por analisador de textura, por exemplo, o TA-TX2i da Stable Micro Systems (SMS, 1995), é interpretada na Tabela 2.11.

Figura 2.17 Curva força em função do tempo gerada pelo texturômetro em análise de dupla compressão (TPA).

Tabela 2.11 - Interpretação da curva força-tempo (Figura 2.17) gerada pelo texturômetro.

PARÂMETROS	UNIDADE	DEFINIÇÃO
FIRMEZA	N	Altura do pico do primeiro ciclo (F2).
COESIVIDADE	Adimensional	Relação entre áreas do segundo ciclo (A2) e do primeiro (A1), do contato inicial até o pico.
ELASTICIDADE	m	Distância medida do contato inicial da amostra no segundo ciclo até o pico F1 (L).
MASTIGABILIDADE	N.m	Firmeza x coesividade x elasticidade.
GOMOSIDADE	N	Firmeza x coesividade x 100.

Fonte: Adaptado de Szczesniak (2002).

Dahle e Montgomery (1978) utilizaram o equipamento Instron adaptado para medidas de textura do pão. A curva apresentada durante a compressão do miolo pode ser assim interpretada: a altura do pico denota a força (máxima resistência antes da ruptura visível do miolo); e a distância percorrida através do miolo antes da ruptura é a medida da extensibilidade do miolo (Figura 2.18).

Fonte: Dahle e Montgomery (1978).

Figura 2.18 Curva típica obtida da deformação e ruptura do miolo do pão. A altura do pico denota força e a distância até a deformação, a extensibilidade do miolo.

Esses autores afirmaram que comparações entre pães com vários dias de armazenamento revelaram diferenças significativas na força e extensibilidade do miolo, e que este procedimento também pode ser usado para verificar mudanças nas variáveis de processo e ingredientes, além de verificar a influência de novos ingredientes ou aditivos na qualidade em termos de textura do produto final.

2.4.2.2 Textura do Pão – Método TA

A Figura 2.19 ilustra a curva Força versus Tempo (ou Distância) que mostra as características do teste de dureza do pão. O *probe* comprime a amostra de 25 mm até 40% da sua altura original (ponto A), isto significa uma compressão de 10 mm de profundidade. Depois se afasta da amostra e retorna ao ponto inicial.

A dureza do pão é definida neste método como a força (em gramas, quilogramas ou Newtons) requerida para comprimir o produto a uma distância pré-estabelecida, ou seja, a força necessária para comprimir até 25% de uma amostra com espessura de 25 mm (ponto B) (Método padrão para determinação da dureza do pão definido pela AACC, 74-09, 1983). Uma compressão de 25% de uma amostra de 25 mm de espessura resulta no valor de força necessária para penetrar 6,25 mm da amostra, que é definida como dureza.

Figura 2.19 Curva força em função do tempo gerada pelo texturômetro em análise de simples compressão (T.A).

2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento fatorial permite avaliar a influência de dois ou mais fatores em uma resposta. É utilizado a fim de minimizar o número de experimentos necessários para a obtenção de uma resposta, sem perda significativa da qualidade da estimativa.

Em panificação, o planejamento experimental tem sido utilizado a fim de estudar as variáveis de processo e de mistura. As variáveis de processo incluem os aditivos, o tempo e a temperatura de fermentação, as da mistura, o percentual de cada componente na formulação ou o percentual de variedades de trigo na farinha

(FAERGESTAD et al., 1999; NAES; BJERKE; FAERGESTAD, 1999). Uma das ferramentas muito utilizadas é a metodologia de superfície de resposta.

Box, Hunter e Hunter (1978) definem a metodologia da superfície de resposta como sendo um grupo de técnicas usadas no estudo empírico das respostas (variáveis dependentes), medidas ou calculadas, em função do número de variáveis de entrada (variáveis independentes).

Atualmente, a análise, a otimização e predição do desempenho de processos são baseadas na modelagem matemática. Um modelo matemático típico pode ser representado, por:

$Y = \Phi(x_1, x_2, \dots, x_i)$, em que Y é a variável dependente ou estimativa da resposta medida, e x_i são as variáveis independentes codificadas ou fatores codificados.

A representação gráfica da função resposta é conhecida como Superfície de Resposta. De acordo com os autores citados, algumas das vantagens dessa metodologia são:

- A metodologia é uma aproximação seqüencial: o resultado em cada etapa guia a experimentação a ser conduzida na próxima. Em cada etapa é realizado um modesto número de ensaios experimentais, garantindo que o tempo e o esforço dos experimentadores não sejam desperdiçados em ensaios improdutivos;
- Ajuda a entender o problema experimental como um todo em termos geométricos;
- É aplicável para qualquer número de variáveis.

Os projetos experimentais para análise de superfície de resposta são usualmente baseados em delineamentos fatoriais em 2 níveis e suas composições (superfícies de primeira ordem – funções matemáticas de primeiro grau), ou em 3 níveis (superfícies de segunda ordem – funções matemáticas de segundo grau) (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

O projeto mais usado para obter uma superfície de resposta é o planejamento composto central. Este foi introduzido pelos autores acima citados, como uma alternativa aos projetos 3^k , isto é, k fatores em 3 níveis. Neste tipo de projeto, os experimentos estão representados por 3 grupos de pontos:

1- Fatorial de dois níveis

A parte fatorial do projeto, em dois níveis, consiste de todas as possíveis combinações dos níveis +1 e -1 dos fatores, onde estes níveis representam os valores máximo e mínimo correspondentes ao fator codificado. Para o fatorial em dois níveis, o número de pontos é calculado como 2^k , onde k é o número de fatores. Por exemplo, se utilizarmos $k=3$, temos:

$(-1,-1,-1), (+1,-1,-1), (-1,+1,-1), (+1,+1,-1), (-1,-1,+1), (+1,-1,+1), (-1,+1,+1), (+1,+1,+1)$

2- Pontos em estrela ou axiais

Nesses pontos em estrela ou axiais, cada ponto do projeto tem um fator em $\pm \alpha$, e os demais fatores no ponto central zero (0), onde α é a distância entre o ponto central do projeto e ponto axial. O valor de α é calculado em cada projeto para blocos rotacionais e ortogonais. Para o projeto fatorial 2^3 , os pontos são:

$(-\alpha, 0, 0), (+\alpha, 0, 0), (0, -\alpha, 0), (0, +\alpha, 0), (0, 0, -\alpha), (0, 0, +\alpha)$

3- Pontos centrais (n_0)

Os pontos centrais, como o próprio nome indica, são pontos codificados e estabelecidos no nível zero, isto é, no ponto médio de cada faixa do fator. Este é representado como (0, 0, 0). Os pontos centrais são, geralmente, repetidos para se obter uma boa estimativa do erro experimental. O número de pontos centrais deve ser maior ou igual a um ($n_0 \geq 1$).

O número total de corridas experimentais, ou pontos do projeto é calculado como:

$$N = 2^k + 2k + n_0$$

A eficácia da aplicação da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento e otimização de produtos derivados de cereais, tem sido estudada por diferentes pesquisadores. Ylimaki et al. (1991) utilizaram a metodologia para mapear os níveis de goma e água, requeridos para a produção de pão livre de glúten aceitáveis sensorialmente, cuja formulação foi baseada em farinha de arroz e amido de batata. Toufeile et al. (1994) também utilizaram a metodologia de superfície de resposta para analisar os efeitos dos emulsificantes nas propriedades sensoriais de pão livre de glúten com formulação baseada em amido de milho pré-gelatinizado e farinha de milho.

Collar et al. (1999) examinaram os efeitos de diferentes hidrocolóides (hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), pectina e goma xantana) na performance da massa de pão farinha de trigo adicionando cada um deles isoladamente e em combinação em

diferentes níveis; determinaram as formulações ótimas para o pão e verificaram a validade da metodologia de superfície de resposta utilizando um planejamento composto central para analisar o aditivo, e os efeitos sinérgicos e/ou antagônicos dos hidrocolóides na qualidade das massas.

Collar e Bollaín (2004) estudaram os efeitos da MTGase nas propriedades viscoelásticas das massas de farinha de trigo quando adicionada isoladamente e em combinação com hidrocolóides (HPMC e pectina), com outras enzimas (α -amilases e xilanases) e com emulsificante DATEM. As alterações observadas na mistura, na textura e nos parâmetros de extensão e viscosidade foram analisadas utilizando a ferramenta superfície de resposta.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o uso da transglutaminase como agente melhorador de massa na fabricação de pães e comparar os efeitos funcionais e moleculares com a ação exercida por melhoradores tradicionais.

Considerando os parâmetros de qualidade usualmente utilizados em panificação, os objetivos específicos incluem: o desenvolvimento de formulação ideal, com diferentes combinações de aditivos e transglutaminase, e a busca de melhores condições de processo, tais como concentração de enzima, tempo e temperatura de fermentação; a avaliação dos efeitos da aplicação da enzima nas frações protéicas, das gliadinas e das gluteninas, na massa crua, na massa após a fermentação e no produto final; a correlação das respostas dos parâmetros de qualidade dos pães, como volume e textura, com os resultados das análises cromatográficas e eletroforéticas apresentados pelas proteínas do trigo após adição de transglutaminase nas formulações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados os materiais, equipamentos, procedimentos experimentais e análises utilizadas.

4.1 MATERIAIS

Ácido ascórbico p.a.; Ésteres de ácido diacetil tartárico de mono e diglicerídeo (DATEM), Panodan ALB 10 PS (92% DATEM e 8% Carbonato de cálcio) e Alfa-amilase, GRINDAMYLTM A 4000, produzida por fermentação com cepa selecionada de *Aspergillus oryzae*, procedência DANISCO BRASIL LTDA.

Os lotes de farinha de trigo, os teores de umidade (AACC 45-15 A, 2000), de cinzas (AACC 08-01, 2000); de glúten (AACC 38-12, 2000); absorção de água (AACC 54-21, 2000) e Falling Number (AACC, 56-81B) utilizados nos experimentos estão descritos na Tabela 4.1. Os métodos são aprovados pela AACC (2000).

Tabela 4.1 – Farinha de trigo e parâmetros físico-químicos.

Farinha de Trigo	Umidade (%) ⁴	Absorção de água (%) ⁴	Cinzas (%) ⁴	Glúten (%) ⁴	Falling Number
BUNGE PRÓ-T(1º Lote) ¹	14,2	62,7	0,67	28,2	337
BUNGE PRÓ-T(2º Lote) ²	14,7	62,6	0,51	27,0	298
CARGILL PANIFICAÇÃO ³	13,7	62,0	0,70	28,2	296

Onde: 1- Fabricação 25/04/2005; 2- Fabricação 08/06/2005; 3- Fabricação 19/04/2006; 4- dados fornecidos pelo fabricante – BUNGE ALIMENTOS S.A – Moinho de Ponta Grossa – origem: trigo 100% paranaense e CARGILL AGRÍCOLA S/A – Divisão Flour Milling - trigo 100% nacional.

Fermento Biológico Seco Instantâneo marca Dr.Oetker, gordura vegetal hidrogenada marca Siol Alimentos (Saúde), adquirida no mercado; sal refinado extra iodado tradicional marca Cisne, açúcar refinado marca União, todos adquiridos no mercado; amostras não comercializadas em embalagens de 50 gramas fechadas à vácuo de Enzima Transglutaminase ACTIVA® STG-M: preparação enzimática fornecida pela empresa AJINOMOTO CO., INC., com atividade declarada de 100U/ g de proteína.

4.2 EQUIPAMENTOS

Balança Filizola BP15; balança semi-analítica MonoBloc Inside AB204-S; masseira Suprema SR15 ouro; modeladora RT, Perfecta Curitiba; formas para pão-de-forma sem tampa; estufa Vipão elétrico, Perfecta Curitiba; forno elétrico Perfecta Curitiba Vipinho 0448 TRIF; fatiador Maquipão; texturômetro Texture Analyser TA-XT2i; Balança analítica, marca Mettler Toledo; Freezer; Câmara fria; Termômetro; Cronômetro; Higrômetro; Utensílios comuns de laboratório; Cromatógrafo Líquido de Alta performance, marca Varian com detector UV/Vis, marca Varian modelo 9050 e bomba Modelo 9012; Centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5417C; Agitador magnético; Pipetas automáticas Marcas Wheaton e Brand; Unidade eletroforese em gel vertical, marca Sigma.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES

4.3.1 Formulação

Para verificar se a enzima transglutaminase apresentava efeitos positivos, ou não, no desenvolvimento da massa do pão de forma, foram feitos testes comparativos entre diferentes formulações.

As formulações variaram em função da adição dos ingredientes que mais marcadamente afetam as propriedades de textura e volume final do produto, ou seja, um agente oxidante, o ácido ascórbico e um emulsificante, o DATEM (STAMPFLI e NERSTEN, 1995; STAUFFER, 1990). As concentrações dos ingredientes como sal, açúcar, gordura e a enzima α -amilase foram mantidas constantes, as quais foram estabelecidas por meio de recomendações e testes preliminares realizados.

4.3.1.1 Testes preliminares: Ajuste de formulação

Para a obtenção da formulação padrão, denominada de controle, foram realizados testes preliminares. Nestes, realizados na planta piloto de Engenharia de Alimentos da Escola de Engenharia Mauá, foram avaliadas diferentes condições de processo (tempo e temperatura de fermentação e assamento) e concentrações dos ingredientes (POLIZEL, 2004). Considerou-se como pão ideal (pão Controle) aquele

que mais se aproximou, em termos de características internas e externas, ao pão de forma encontrado no mercado. A documentação foi feita por meio de imagens obtidas em equipamento *scanner* “*scanjet* HP, modelo 2400C”. A formulação está descrita na Tabela 4.2.

4.3.1.2 Influência da Enzima Transglutaminase

A influência da enzima foi avaliada substituindo-se o emulsificante e o ácido ascórbico, considerados ingredientes importantes no desenvolvimento e manutenção da rede de glúten, por 1,0%, da preparação enzimática sobre a farinha, (pão MTGase). A recomendação do fabricante para adição da enzima situa-se na faixa entre 0,1 e 1,0%, dependendo da qualidade da farinha. As concentrações dos outros ingredientes permaneceram constantes. A documentação foi feita por meio de imagens obtidas em equipamento *scanner* “*scanjet* HP, modelo 2400C”. A formulação utilizada está apresentada na Tabela 4.2.

4.3.1.3 Ausência dos aditivos

Para garantir que a farinha tinha qualidade inadequada para a fabricação de pão, produziu-se o chamado pão Zero, de cuja formulação retirou-se totalmente o emulsificante, o ácido ascórbico e a transglutaminase. A documentação foi feita por meio de imagens obtidas em equipamento *scanner* “*scanjet* HP, modelo 2400C”.. A formulação está apresentada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Formulação do pão Controle, do pão Zero e do pão MTGase.

Ingredientes	(%) sobre a farinha				(%) sobre o total		
	pão Controle	pão MTGase	pão Zero	pão Controle	pão MTGase	pão Zero	
Farinha de trigo	100	100	100	60,3	60,1	60,4	
Água ⁽¹⁾	54	54	54	32,5	32,4	32,6	
Fermento	1	1	1	0,60	0,60	0,60	
Sal	2	2	2	1,20	1,20	1,21	
Açúcar	4	4	4	2,41	2,40	2,42	
Gordura	4,5	4,5	4,5	2,71	2,70	2,72	
α -amilase ⁽²⁾	0,0025	0,0025	0,0025	0,0015	0,0015	0,0015	
Ácido ascórbico ⁽³⁾	0,0140	-	-	0,0084	-	-	
Emulsificante ⁽⁴⁾	0,4	-	-	0,24	-	-	
Enzima TG	-	1,0	-	-	0,60	-	
Total	165,9	166,5	165,5	100	100	100	

Onde: pão Zero: sem aditivos; pão Controle: segundo recomendação do fabricante; pão MTGase, com adição de 1% de enzima.

1- Porcentagem definida pelo grau de absorção da farinha de trigo, método AACC 54-21, 1995);

2- Enzima α -amilase (25 ppm, definida pela medida do "Falling Number" fornecida pelo moinho);

3- Ácido ascórbico PA – limite máximo fornecido pelo fabricante.

4- Emulsificante (DATEM) – limite máximo fornecido pelo fabricante.

4.3.1.4 Otimização da formulação

Como a substituição total dos aditivos pela enzima transglutaminase não produziu o efeito desejado em relação aos parâmetros avaliados, textura e volume específico, realizou-se um planejamento composto central para estudar a melhor combinação entre emulsificante, ácido ascórbico e enzima transglutaminase.

No planejamento composto central as variáveis independentes, ou fatores, selecionadas foram: concentrações de emulsificante, ácido ascórbico e transglutaminase, e as variáveis dependentes ou respostas: a dureza, firmeza, elasticidade, gomosidade, coesividade, mastigabilidade e volume específico dos pães.

Foram estabelecidos cinco intensidades de variação para os pontos fatoriais de cada variável independente. Os pontos de máximo (+1) e mínimo (-1) foram estabelecidos a partir dos resultados obtidos nos testes preliminares e recomendações dos fabricantes.

Na Tabela 4.3 são apresentados os valores das variáveis independentes e dependentes utilizadas na matriz do planejamento.

Tabela 4.3 - Níveis das variáveis do planejamento composto central.

Variáveis originais	Variáveis codificadas	Níveis				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Emulsificante (*)	A	0,032	0,1	0,2	0,3	0,368
Ácido ascórbico (*)	B	0,00028	0,0030	0,0070	0,0110	0,0137
Transglutaminase (*)	C	0,096	0,3	0,6	0,9	1,104

(*) porcentagem sobre a farinha.

Para determinação dos pontos axiais, a seguinte fórmula foi utilizada: $\alpha = \pm (2^n)^{1/4}$ e $n=3$, resulta em $\alpha = 1,68$. Os resultados foram avaliados com auxílio do *software* estatístico *Minitab* versão 14.1. Os ensaios foram realizados aleatoriamente e em duplicatas seguindo a matriz do planejamento mostrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Matriz de ensaios para o planejamento composto central.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis originais		
	A	B	C	(%) sobre a farinha		
				Emulsificante	Ac. Ascórbico.	MTGase
1	-1	-1	-1	0,1	0,0030	0,3
2	+1	-1	-1	0,3	0,0030	0,3
3	-1	+1	-1	0,1	0,0110	0,3
4	+1	+1	-1	0,3	0,0110	0,3
5	-1	-1	+1	0,1	0,0030	0,9
6	+1	-1	+1	0,3	0,0030	0,9
7	-1	+1	+1	0,1	0,0110	0,9
8	+1	+1	+1	0,3	0,0110	0,9
9	$-\alpha$	0	0	0,032	0,0070	0,6
10	$+\alpha$	0	0	0,368	0,0070	0,6
11	0	$-\alpha$	0	0,2	0,00028	0,6
12	0	$+\alpha$	0	0,2	0,0137	0,6
13	0	0	$-\alpha$	0,2	0,0070	0,096
14	0	0	$+\alpha$	0,2	0,0070	1,104
15	0	0	0	0,2	0,0070	0,6
16	0	0	0	0,2	0,0070	0,6
17	0	0	0	0,2	0,0070	0,6

Com os resultados do planejamento experimental é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas obtidas, bem como determinar os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente modelos de primeira e segunda ordem, correlacionando as variáveis e as respostas. Quando a análise dos resultados por meio de Análise de Variância ANOVA permite, são obtidos modelos preditivos que possibilitam desenhar curvas de superfície de resposta e de contorno para visualização e interpretação dos resultados.

4.3.2. Processo de Fabricação do pão

Todos os ingredientes, exceto a gordura, foram colocados na masseira em baixa velocidade e misturados por 2 minutos. Em seguida, a água foi adicionada até obtenção de uma mistura homogênea. Após a mistura, o batimento foi conduzido em velocidade alta sendo a gordura adicionada no início desta etapa. O final do batimento foi estabelecido através da obtenção do “ponto de véu” da massa. Foram monitorados os tempos de batimento e as temperaturas da água, da farinha e da massa após a mistura.

A massa obtida foi dividida em porções de 600 gramas cada, boleada e colocada para descansar por 15 minutos. Em seguida, a massa foi modelada e colocada lateralmente em forma de tamanho padrão, evitando assim, que, durante a fermentação, ocorresse deformação dos pães. As formas foram colocadas em estufa regulada, a 35 °C e umidade de 85% por 150 minutos para a fermentação final. O assamento foi feito a 140 °C por 40 minutos. Foram feitas análises de textura e volume específico dos pães. Foram retiradas amostras de farinha, de massa e de pães, que

foram congeladas em freezer em temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, para análises físico-químicas e instrumentais posteriores.

A farinha utilizada nestes testes, recentemente produzida, foi armazenada em câmara resfriada a $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia do ensaio. Todos os testes de formulação foram feitos em 4 dias seguidos.

4.3.3 Avaliação da qualidade da farinha de trigo (Análises físico-químicas e reológicas da farinha de trigo)

4.3.3.1 Umidade

O teor de umidade da farinha de trigo foi determinado pelo método de secagem em estufa a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob pressão atmosférica, de acordo com a metodologia descrita pela AACC (2000), método de número 44-15A.

4.3.3.2 Cinzas

O teor de cinzas da farinha de trigo foi determinado pelo método de incineração em mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$, de acordo com a metodologia descrita pela AACC (2000), método de número 08-01.

4.3.3.3 Gordura

O teor de gordura da farinha de trigo foi determinado pelo método de extração intermitente, Soxhlet, de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1995).

4.3.3.4 Proteína

O teor de proteína da farinha de trigo foi determinado pelo método de Kjeldahl, de acordo com a metodologia descrita pela AACC (2000), método de número 46-13. O teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 5,7. Para a determinação das frações de albuminas, globulinas e gliadinas foi utilizado o mesmo método. Para determinar o teor de gluteninas e o teor de proteínas no resíduo, os extratos foram exaustivamente dialisados até eliminação total de uréia e glicina.

4.3.3.5 Glúten úmido e seco

As determinações dos teores de glúten úmido e seco e do índice de glúten foram feitos pelo sistema Glutomatic, de acordo com a metodologia descrita pela AACC (2000), método de número 38-12.

4.3.3.6 Acidez Titulável em Suspensão Alcoólica

Acidez titulável em suspensão alcoólica foi determinada, de acordo com metodologia descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Foi preparada uma suspensão de farinha e solução alcoólica a 95%. Após repouso por 24 horas, o sobrenadante foi titulado com NaOH 0,10 mol/L. Resultado de acidez expressa em “volume de solução de NaOH 0,10 mol/L gasto para neutralizar a acidez de 100 gramas de farinha”.

4.3.3.7 Determinação eletrométrica do pH

O pH foi determinado de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1995). Foi preparada uma suspensão de farinha de trigo e água, na proporção de 1:10. Após repouso por 10 minutos, o pH foi medido no sobrenadante.

4.3.3.8 Determinação da atividade da α -amilase

A atividade amilásica na farinha de trigo foi determinada através do aparelho *Falling Number*, modelo 1500 *Fungal* (Peters Instruments, Suíça) de acordo com o método de número 56-81B da AACC (2000), utilizando sete gramas de farinha, corrigido para 14% de umidade. O resultado obtido é conhecido como valor "*Falling Number*" ou número de queda.

4.3.4 Avaliação da qualidade do pão

Os pães foram retirados do forno e mantidos em sala com temperatura e umidade controladas de 22°C e 40%, respectivamente, durante duas horas. Após esse tempo foram armazenados em embalagens de saco plástico de polietileno, em temperatura ambiente por intervalo de tempo que variou entre 17 e 20 horas.

4.3.4.1 Determinação do volume específico do pão

Os volumes de seis pães de cada formulação foram medidos por deslocamento de sementes de painço, utilizando uma caixa feita de madeira com proporções adequadas e de volume de 2760 cm³ (Figura 4.1). O volume específico foi determinado pela razão entre volume e massa de cada pão, expresso em cm³/g.

Figura 4.1 Caixa desenhada para medição de volume de pão de forma.

4.3.4.2 Determinação da dureza do miolo

A determinação da dureza (método TA) foi realizada no analisador de textura TA-XT2i SMS utilizando um *probe* adaptado de acrílico, cilíndrico com 36 mm de diâmetro (Figura 4.2), através do método AACC 74-09 (AACC, 1995). Os valores do parâmetro

de dureza do miolo foram realizados através da medida que corresponde ao pico da curva força versus tempo (N/s). Os testes foram realizados simultaneamente às medidas do volume específico nas amostras de cada formulação, em fatias de 2.5 cm retiradas das extremidades e do centro de cada pão, sob as seguintes condições:

- Velocidade do Pré-Teste: 1,0 mm/s;
- Velocidade do Teste: 1,7 mm/s;
- Velocidade do Pós-teste: 10,0 mm/s;
- Distância: 10 mm (distância que o “probe” é deslocado);
- Tensão: 40%
- Gatilho: Auto – 5g (ponto inicial da análise, quando o acessório encontra uma resistência igual ou superior a 5 g).

Figura 4.2 Análise de textura do pão utilizando o analisador de textura TA-XT2I com acessório cilíndrico.

4.3.4.3 Determinação da firmeza, elasticidade, coesividade, mastigabilidade, e gomosidade do miolo do pão.

Os testes no método TPA, (TA-xT2 :Texture Profile Analyser – Stable Micro Systems), (Dr. Malcolm Bourne's Food Texture e Viscosity (Academic Press), foram realizados nas mesmas condições padrões de determinação de dureza de miolo (item 4.3.4.2) com as amostras de cada formulação, fatias de 2,5 cm retiradas das extremidades e do centro de cada pão. Os mesmos parâmetros anteriores para as velocidades, distância e gatilho, com: *Strain* de 40% e o tempo entre as duas compressões de 5 segundos

O método utilizado consiste na dupla compressão da amostra (Figura 4.3), gerando gráfico, força-tempo e força-distância, dos quais obtêm-se valores necessários para o cálculo dos parâmetros de firmeza, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade, e coesividade. Estes parâmetros foram escolhidos devido à sua relação com parâmetros sensoriais.

Figura 4.3 Exemplo da curva força-tempo gerada pelo texturômetro em análise de dupla compressão (TPA).

Os parâmetros de textura foram calculados através da curva (Figura 4.3) da seguinte forma (BRENNAN, 1988):

Firmeza: pico de força medida durante o primeiro ciclo de compressão (N).

Coesividade: Relação entre as áreas da segunda e primeira compressões do ponto inicial até o pico (adimensional).

Elasticidade: distância do ponto inicial da segunda compressão até o pico (m);

Mastigabilidade: produto da firmeza, coesividade e elasticidade (J);

Gomosidade: Firmeza x coesividade x 100.

As medidas foram feitas com três fatias de 2,5 cm de cada pão, do centro e das extremidades (Figura 4.4), totalizando dezoito repetições para cada formulação.

Figura 4.4 Fatiadeira de pão de forma (Detalhe: fatias de 205 cm retiradas das extremidades e centro dos pães).

4.3.5 Análises cromatográficas e eletroforéticas

4.3.5.1 Extração de albuminas, globulinas e prolaminas

O procedimento de extração seqüencial, fracionamento por solubilidade de Osborne (1907), adaptado por Bietz e Wall (1975), foi usado com poucas modificações. Agitação contínua (agitador magnético) foi utilizada a cada etapa de extração por 60 minutos com exceção para o enxágüe das gliadinas (30 minutos). Frações solúveis e

insolúveis foram separadas por centrifugação a 20500 x g, por 20 minutos, a cada passo de extração. Massas de aproximadamente 2,0 gramas de farinha e 3,0 gramas de massa de pão foram utilizadas para cada extração. Albuminas e globulinas foram extraídas a 5 °C com 30 mL de tampão de fosfato de sódio 0,05 mol/L (pH 7,8), mais 30 mL de solução de NaCl 0,1 mol/L e Triton X110, 20 g/L. Os dois sobrenadantes foram combinados. As gliadinas foram extraídas a 20 °C com etanol 70% (v/v), primeiramente com 30 mL e depois o resíduo foi enxaguado com 20 mL e agitação por 30 min. Os dois sobrenadantes foram combinados. O conteúdo de proteína de cada fração foi determinado por Kjeldahl ($N \times 5,7$). Após a extração de gliadinas, o resíduo (gluteninas e amido) foi usado para extração de gluteninas.

4.3.5.2 Extração de gluteninas

As gluteninas foram extraídas a 20 °C com agitação por 60 minutos e seguido de centrifugação a 20500 x g por 20 minutos. A extração foi feita com 30 mL de tampão tetraborato 0,05 mol/L (pH=8,5), 2-mercaptoetanol 2% (v/v), glicina 1 g/L e uréia 6 mol/L adaptado de Burnouf e Bietz (1984) por Larrè et al.(1997) e Nicolas et al.(1998).

4.3.5.3 Alquilação das gluteninas

Para evitar a repolimerização das subunidades de gluteninas durante a análise cromatográfica, foi feita a alquilação dessas subunidades pela adição de 235 µL de 4-vinilpiridina para cada 5 mL de extrato, como descrito por vários autores (KHAN e BUSHUK, 1979b; LARRÈ et al., 1997, NICOLAS et al.,1998). Após a retirada de ar com nitrogênio, os tubos foram fechados, agitados manualmente e aquecidos durante 30

minutos a 60 °C. Polissacarídeos residuais foram precipitados pela adição de 2-propanol 100% na proporção de 1:1. Uma alíquota foi centrifugada a 20500 x g, por 20 minutos, antes da injeção na coluna do cromatógrafo líquido.

4.3.5.4 Condições utilizadas para CLAE fase reversa

As análises cromatográficas das frações de proteínas foram feitas usando um sistema CLAE – Varian constituído por uma bomba 9012, uma coluna Chromspher C8, 250 x 4,6 mm, com partícula interna de 5 µm e um detector UV visível 9050, com faixa de comprimento de onda (λ) de trabalho de 190 a 770 nm, temperatura da coluna de 50 °C, volume de amostra de 20 µL.

O sistema de eluição utilizado: A) Ácido Trifluoracético (TFA) (0,1%), v/v; B) Acetonitrila (ACN) + TFA (99,9/0,1%, v/v). Nos testes preliminares foram testados 3 condições de eluição, variando os gradientes. Aquelas que apresentaram os melhores resultados estão apresentadas nas Tabelas 4.5 e 4.6. Esses sistemas de eluição foram utilizados nas amostras finais de farinha, massas e pães, para a separação das frações de proteínas das gliadinas e das gluteninas.

Tabela 4.5 – Gradiente de eluição para as gliadinas.

GLIADINAS		
Tempo (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)
0	72	28
30	44	56
70	44	56
80	10	90
95	10	90
105	72	28

Tabela 4.6 – Gradiente de eluição para as gluteninas.

GLUTENINAS		
Tempo (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)
0	72	28
3	72	28
33	44	56
70	44	56
80	10	90
95	10	90
105	72	28

A vazão foi de 1,0 mL/min; detecção foi por UV absorbância de 210 nm. A cada corrida a coluna foi limpa com 90% de acetonitrila por 15 minutos e equilibrada com a concentração inicial, 28% de acetonitrila e 72% de água, durante 5 minutos.

4.3.5.5 Análises eletroforéticas

O perfil eletroforético das frações de gluteninas e gliadinas foi obtido em gel de poliacrilamida contendo SDS, a pHs ajustados com tampão Tris-HCl para o pH 8,8 para gel de separação a 12,0% e pH 6,8 para gel de concentração a 6,0%, sob condições redutoras com 2-mercaptoetanol, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Os géis foram fixados em ácido tricloroacético (20% v/v), enxaguados com água antes de serem corados por 2 horas com 0,1% (w/v) Coomassie Blue G 250 em ácido tricloroacético, metanol e ácido acético glacial (10/50/10, v/v/v). Os géis foram descorados em metanol 40% (v/v) e ácido acético glacial 7,5% (v/v).

Amostras foram congeladas após extrações descritas nos itens 4.3.5.1 e 4.3.5.2, para as gliadinas e gluteninas, respectivamente, e armazenadas até a análise. Os extratos contendo as gliadinas foram concentrados e aqueles contendo gluteninas e os resíduos foram dialisados para eliminação da uréia e glicina.

As quantidades de proteínas aplicadas nos géis de eletroforese foram as mesmas para todas as amostras. As alíquotas foram solubilizadas em 50 μ L do tampão de amostra contendo 1,2 mL de tris pH 6,8, 2,0 mL de SDS 10%, 1,0 mL de glicerol, 0,5 mL de azul de bromofenol 0,5 %. E para cada 0,95 mL do tampão foi adicionado 0,05 mL de 2-mercaptoetanol. Após fervura por 3 minutos, 30 μ L dessa suspensão foi aplicada nos géis de SDS.

Os perfis eletroforéticos foram analisados por densitometria por meio do programa ImageJ 1,37 V. (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) de domínio público.

4.3.6 Análise Estatística

Os experimentos do delineamento foram feitas em duplicatas, resultando em dezoito repetições para cada formulação e as medidas das variáveis dependentes foram avaliadas pela Análise de Variância (ANOVA) usando o programa estatístico Minitab. O teste de Duncan foi aplicado na comparação entre as médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AJUSTE DE FORMULAÇÃO

Diferentes lotes de farinha e de fornecedores foram testados. Para atender ao objetivo do trabalho, a farinha ideal para ser utilizada deveria apresentar propriedades reológicas de uma farinha fraca, baixo conteúdo de proteína e o produto final de qualidade ruim, ou melhor, pão de baixo volume, duro, crosta irregular e miolo borrachudo, denominado pão Zero (Figura 5.1).

Figura 5.1 Imagens obtidas do miolo do pão Zero.

Por outro lado, com adição de emulsificante e um agente oxidante, a qualidade do pão deveria mudar drasticamente e apresentar características próprias em relação à textura e ao volume, o “Pão Controle” (Figura 5.2), sugerindo que os aditivos escolhidos e as quantidades utilizadas, produziram diferenças significativas em relação ao pão Zero.

Figura 5.2 Imagens obtidas do miolo do pão Controle.

A substituição desses aditivos, agora, pela enzima transglutaminase microbiana, a MTGase, foi conduzida seguindo orientação do fabricante, que indica adição de 0,1 a 1,0% (porcentagem sobre a farinha) da enzima ACTIVA STG-M, própria para panificação, dependendo da qualidade da farinha. Testes com adição de 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0% foram realizados (POLIZEL, 2004). Comparando com o pão Zero, para todas as quantidades adicionadas foram observadas diferenças entre os pães, porém a que mais se aproximou do controle foi a de 1,0% (Figura 5.3). Concentrações superiores a esse valor provocaram efeitos negativos com relação ao controle. As massas apresentaram-se mais borrachudas e os miolos dos pães mais pesados e duros, de acordo com resultados encontrados por Gerrard et al. (1998).

Figura 5.3 Imagens obtidas do miolo do pão MTGase.

Além de se utilizar a enzima isoladamente na concentração de 1,0%, desenvolveu-se também um planejamento experimental para estabelecer possíveis interações entre os diferentes aditivos: emulsificante, ácido ascórbico e enzima MTGase.

5.2 INFLUÊNCIA DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE

Os resultados para os testes que compararam as formulações do pão Controle, com o pão Zero e àquele adicionado de 1% de enzima (pão MTGase) realizados conforme descritos nas seções 4.3.1.1 a 4.3.1.3. Os testes foram realizados aleatoriamente por sorteio. Para cada formulação foram obtidos seis pães. Todos os pães foram pesados, medidos os volumes (Tabela 5.1) e as respectivas alturas dos próprios pães e/ou das fatias (Figuras 5.4 a 5.6). Para as medidas de

dureza, firmeza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade foram separados os mesmos seis pães, que foram fatiados. Foram retiradas três fatias de 2,5 cm de cada pão, do centro e das extremidades, totalizando 18 repetições para cada formulação (Tabela 5.2).

Tabela 5.1 - Volumes, massas e volumes específicos para o pão Controle, pão Zero e pão MTGase.

Amostra	Volume ¹ (cm ³)	Massa ¹ (g)	Volume. Específico ¹ (cm ³ /g)
Pão Controle	3040	519	5,86
Pão MTGase	2480	520	4,77
Pao Zero	1572	485	3,24

1- Valores médios de 6 determinações.

As massas obtidas para o pão Controle e pão MTGase não diferem significativamente, porém os volumes sim. Enquanto que, para o pão Zero esta diferença aparece tanto para o volume quanto para a massa. O pão Zero, fabricado a partir da formulação com apenas os ingredientes básicos, farinha, água, gordura, sal, açúcar e fermento, após mistura e descanso apresentou um volume parecido como aquele do pão Controle ou mesmo MTGase, mas logo que saiu da estufa para ser colocado no forno, a estrutura entrou em colapso e não manteve o gás formado durante a fermentação.

Figura 5.4 Altura atingida pelo pão quando utilizada a formulação livre de aditivos, pão Zero.

Figura 5.5 Altura atingida pelo pão quando utilizada a formulação com 0,4% de emulsificante e 140 ppm de ácido ascórbico, pão Controle.

Figura 5.6 Altura atingida pelo pão quando utilizada a formulação livre de aditivos acrescida somente de 1% de enzima transglutaminase, pão MTGase.

Com as imagens mostradas nas Figuras 5.1 a 5.6, foi possível avaliar macroscopicamente o efeito da adição da enzima na formulação dos pães. O pão considerado controle apresentou altura variando entre 10 e 12 cm, enquanto o pão acrescido de enzima, entre 8 e 10 cm, muito acima daqueles valores apresentados para o pão Zero que não ultrapassou os 5 cm. Além de apresentar casca muito dura e, miolo borrachudo e com poros grandes e não uniformes.

Tabela 5.2 - Medidas de volume específico, dureza, firmeza, coesividade, gomosidade, elasticidade, mastigabilidade, para o pão Controle, pão Zero e pão MTGase.

Amostra	Volume específico ¹ (cm ³ /g)	Dureza ² (N)	Firmeza ² (N)	Coesividade ² (m)	Elasticidade ² (N.m)	Gomosidade ² (N)
pão Controle	5,86 ± 0,08 ^a	1,60 ± 0,09 ^a	2,4 ± 0,1 ^a	1,35 ± 0,04 ^a	0,0096 ± 0,0005 ^a	320 ± 17 ^a
pão MTGase	4,77 ± 0,04 ^b	2,40 ± 0,07 ^b	3,36 ± 0,01 ^b	1,32 ± 0,01 ^a	0,0095 ± 0,0002 ^a	444 ± 14 ^b
pão Zero	3,24 ± 0,05 ^c	3,90 ± 0,01 ^c	5,4 ± 0,2 ^c	1,36 ± 0,05 ^a	0,0049 ± 0,0002 ^c	592 ± 37 ^c

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Pão Zero = formulação base sem aditivação; pão Controle = formulação base acrescentada de 0,4% de emulsificante e 140 ppm de ácido ascórbico; pão MTGase = formulação base adicionada de 1% de enzima TGase (% sobre a farinha).

1- Valores médios de análises realizadas em 6 replicatas;

2- Valores médios de análises realizadas em 18 replicatas.

O trabalho requerido para misturar a massa pode ser considerado menor quando da fabricação do pão MTGase, comparado com àquele do pão Controle e pão Zero, pois os tempos de batimentos daquelas massas sofreram reduções que variaram de 3 a 4 minutos (ver Anexo I), o que pode representar potencialmente economia no custo de produção, resultado obtido também por Gerrard et al. (1998).

Caballero, Gómez e Rosell (2007) relataram que o volume de pães frescos adicionados de MTGase diminuiu significativamente em relação ao seu controle, como encontrado nesse experimento. Por outro lado, (BASMAN; KÖKSEL; PERRY, 2002) encontraram aumento do volume do pão fabricado com uma farinha pobre em proteínas quando adicionado de MTGase, o que equivale ao pão MTGase comparado com o pão Zero, deste trabalho.

As medidas de volume específico (cm^3/g) obtidas para os diferentes pães apresentaram diferenças significativas. Os volumes dos pães com MTGase foram intermediários em relação aos pães controle e zero. Gerrard et al. (1998, 2000) encontraram redução no volume e aumento da força da massa para pães tratados com MTGase, enquanto que para as massas laminadas os resultados tiveram efeitos contrários, que foi explicado pelas diferenças nas composições e estruturas das massas.

Gerrard et al. (2000) demonstraram também que a adição de MTGase em massas laminadas melhorou substancialmente a altura dos *donuts* e *croissants* e, esse efeito foi preservado no congelamento em períodos superiores a 90 dias.

Diferenças significativas no parâmetro dureza (N) também foram observadas para os 3 pães, sendo que o pão MTGase apresentou valores intermediários entre o

pão Zero e o pão Controle. Adição de MTGase às massas produziu pão com textura melhorada acima dos pães zeros. Para Gerrard et al. (1998), pães tratados com MTGase e ácido ascórbico apresentaram resultados próximos com relação ao aumento da força do miolo em pães assados, superiores àqueles sem nenhum tratamento (ausência de melhoradores), e resultados inferiores àqueles contendo ácido ascórbico + bromato.

As medidas instrumentais obtidas da análise de TPA geradas pelo analisador de textura, TA-TX2i, e que segundo Szczesniak (2002) podem ser correlacionadas com as análises sensoriais, apresentaram para firmeza, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade diferenças significativas. A Figura 5.7 mostra os pães acima mencionados.

Figura 5.7 Comparação entre as fatias do pão contendo MTGase com o Controle e o pão Zero.

Observando a figura acima, pode-se notar que o miolo do pão adicionado de MTGase apresentou cor mais clara, as células menores e mais uniformes com relação

aos outros dois pães. A densidade do miolo parece ser maior em relação ao pão Controle e menor em relação ao pão Zero. Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Caballero, Gómez e Rosell (2007).

Ainda nos resultados da Tabela 5.2 notam-se diferenças significativas também no parâmetro firmeza (N) para os 3 pães, sendo que o pão MTGase apresentou valores intermediários entre o pão Zero e o pão Controle. Assim como a dureza, essa medida expressa a força que se tem adicionar para promover uma deformação no miolo do pão. Pelos resultados pode-se verificar que os aditivos empregados, emulsificante e ácido ascórbico, promovem uma maciez maior comparada com aquela obtida apenas com a adição da enzima, que por sua vez é maior que para o pão sem aditivação.

Dahle e Montgomery (1978) utilizaram o equipamento Instron para medidas de textura do pão. O pão, segundo esses autores, é extensível e compressível devido à sua estrutura celular e à matriz do glúten, respectivamente. O colapso da estrutura observada na altura máxima do pico de deformação indica ruptura da matriz do glúten e foi relacionada com a força, máxima resistência antes da ruptura visível do miolo; e a distância percorrida através do miolo antes da ruptura como a extensibilidade do miolo (Figura 2.17). A coesividade, definida por Szczesniak (2002), como a extensão que o material pode ser deformado antes da ruptura, não apresentou diferença significativa, indicando que a formulação não afetou a estrutura celular do miolo.

A adição de transglutaminase não alterou a elasticidade em relação ao controle, mantendo o dobro dos valores em relação ao pão Zero (Tabela 5.2).

Assim como para a firmeza, a adição da enzima aumentou o valor do parâmetro mastigabilidade, tornando o pão mais duro em relação ao pão Controle, porém mais

macio em relação ao pão Zero, o que pode ser explicado pela presença de emulsificante (Tabela 5.2). A mastigabilidade é definida como produto da firmeza pela coesividade e elasticidade, era de esperar o comportamento semelhante ao da firmeza, desde que os resultados para elasticidade e coesividade não influenciaram nas interpretações.

E, finalmente, o parâmetro gomosidade, definido como produto da firmeza pela coesividade, tampouco foi afetado. Do mesmo modo, a adição da enzima aumentou a gomosidade, tornando o pão mais duro comparativamente ao pão Controle, porém mais macio em relação ao pão Zero, o que também é devido à presença de emulsificante.

Caballero, Gómez e Rosell (2007) encontraram aumentos significativos para firmeza, coesividade, gomosidade, mastigabilidade e elasticidade para o miolo dos pães adicionados de MTGase.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO

Os primeiros testes do planejamento experimental foram realizados aleatoriamente, sorteados entre 4 dias do mês de maio 2005, com o primeiro lote de farinha. As análises foram realizadas duas horas após o assamento. Para cada formulação foram obtidos seis pães, dentre os quais apenas três foram pesados e medidos os volumes. Para a medida de dureza, firmeza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade os mesmos três pães foram fatiados.

Os resultados foram avaliados e devido à falta de reprodutibilidade destes, chegou-se a conclusão que um novo experimento deveria ser feito e com um número maior de replicatas na tentativa de diminuir as prováveis fontes de erro. O segundo lote de farinha foi utilizado.

Os testes foram realizados aleatoriamente e sorteados no mês de junho do mesmo ano. As variáveis de processo foram controladas, como a mistura dos ingredientes, tempo e velocidade de batimento, controle de temperatura da água, controle de temperatura de saída da massa, modelagem manual, temperatura e umidade da câmara de fermentação. Os pães foram resfriados mantidos a temperatura ambiente por, em média, 18 horas e, então, analisados. Todos os seis pães foram pesados, medidos os volumes e analisados no texturômetro. Houve melhora expressiva nos resultados.

O terceiro e, último, ensaio foi realizado no ano seguinte. Utilizou-se o 3º lote de farinha, 100% nacional. Outras mudanças no processo foram realizadas na modelagem e fatiamento dos pães. A modelagem deixou de ser feita manualmente e foi utilizada uma modeladora própria para fabricação de pão. Após o assamento, os pães foram resfriados, embalados em sacos de polietileno e mantidos, em média, por 18 horas em sala com temperatura e umidade controladas. O fatiamento, após esta etapa, ocorreu com mais uniformidade e sem deformações dos pães. Foram retiradas de cada pão três fatias de 2,5 cm, do centro e das extremidades, totalizando 18 repetições para cada formulação. Cada formulação foi feita em duplicata.

Os resultados para o planejamento composto central para volume específico e dureza são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Planejamento Experimental: Variáveis reais e codificadas e volume específico e dureza.

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES						VARIÁVEIS DEPENDENTES		
	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS REAIS (% sobre a farinha)					
	A	B	C	Emulsificante	Ácido Ascórbico	Enzima	Volume específico (cm ³ /g)	Dureza (N)	
1	-1	-1	-1	0,1	0,0030	0,3	5,62 ± 0,09	1,5 ± 0,2	
2	+1	-1	-1	0,3	0,0030	0,3	5,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	
3	-1	+1	-1	0,1	0,0110	0,3	5,77 ± 0,09	1,4 ± 0,2	
4	+1	+1	-1	0,3	0,0110	0,3	5,8 ± 0,2	1,26 ± 0,09	
5	-1	-1	+1	0,1	0,0030	0,9	5,20 ± 0,04	2,5 ± 0,2	
6	+1	-1	+1	0,3	0,0030	0,9	5,11 ± 0,09	1,9 ± 0,2	
7	-1	+1	+1	0,1	0,0110	0,9	5,20 ± 0,04	2,4 ± 0,3	
8	+1	+1	+1	0,3	0,0110	0,9	5,29 ± 0,08	2,4 ± 0,2	
9	-1,68	0	0	0,032	0,0070	0,6	5,38 ± 0,03	1,9 ± 0,2	
10	+1,68	0	0	0,368	0,0070	0,6	5,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	
11	0	-1,68	0	0,2	0,00028	0,6	4,94 ± 0,04	2,2 ± 0,2	
12	0	+1,68	0	0,2	0,0137	0,6	5,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	
13	0	0	-1,68	0,2	0,0070	0,096	6,01 ± 0,08	1,3 ± 0,2	
14	0	0	+1,68	0,2	0,0070	1,104	5,18 ± 0,09	2,1 ± 0,3	
15	0	0	0	0,2	0,0070	0,6	5,35 ± 0,09	1,7 ± 0,2	
16	0	0	0	0,2	0,0070	0,6	5,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1	
17	0	0	0	0,2	0,0070	0,6	5,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	

Através do programa estatístico, *Minitab*, obtiveram-se os coeficientes de regressão, os modelos polinomiais, a análise do modelo através da ANOVA, cálculo dos desvios e gráficos. Os resultados e as discussões estão apresentados abaixo para: 1- Volume Específico e 2- Dureza.

1 - Volume Específico

Os parâmetros do modelo codificado, já excluídos os fatores onde $p > 0,05$, são apresentados na Tabela 5.4. Foram eliminados os seguintes fatores: as interações AB, AC e BC pois os efeitos nestes pontos não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Tabela 5.4 - Parâmetros da regressão para o modelo do volume específico.

Termo	Coeficientes	T	p
Constante	5,37479	128,385	0,000
A	0,04477	2,277	0,046
B	0,08614	4,381	0,001
C	-0,25232	-12,834	0,000
A*A	0,06243	2,885	0,016
B*B	-0,07369	-3,405	0,007
C*C	0,08364	3,865	0,003

O coeficiente de determinação foi de $R^2 = 95,9\%$.

Foi realizada uma regressão com os dados das Tabelas 5.3 e 5.4, obtendo-se o modelo equacional codificado, mostrado na equação 5.1, que representa o comportamento da variação do volume específico em função das concentrações de emulsificante, ácido ascórbico e transglutaminase.

Equação 5.1

$$\hat{Y} = 5,3748 + 0,04477A + 0,08614B - 0,25232C + 0,06243A^2 - 0,07369B^2 + 0,08364C^2$$

Onde: $\hat{Y}$ é a estimativa do volume específico ajustado; A é a concentração codificada de emulsificante; B é a concentração codificada de ácido ascórbico e C é a concentração codificada de transglutaminase.

Com o objetivo de obter a amplitude do modelo acima, realizou-se a análise de variância da regressão através da ANOVA (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Análise de Variância do modelo codificado para o volume específico.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média dos desvios quadráticos	Razão F	Valor de P
Regressão	6	1,24377	1,24377	39,27	<0,01
Erro Residual	10	0,05279	0,05279		
Falta de Ajuste	8	0,04992	0,04992	4,35	0,200
Erro Puro	2	0,00287	0,00287		
Total	16	1,29655			

Com os dados a tabela acima, foi possível obter a amplitude do modelo, como descrito a seguir:

$$R^2 = SQ_{\text{regressão}} / SQ_{\text{Total}} \quad \therefore \quad R^2 = 0,95$$

A relação entre os valores de volume específico previsto pelo modelo (equação 5.1) em função dos valores observados está representada na Figura 5.8.

Figura 5.8: Relação entre os valores de volume específico previstos pelo modelo (equação 5.1) em função dos valores observados.

Através dos valores de R e F e da localização dos pontos próximos à reta no gráfico acima, pode-se dizer que o modelo codificado é satisfatório.

Como a regressão é significativa ($p < 0,05$) e a falta de ajuste não é significativa ($p > 0,05$) ao nível de 5% de significância, pode-se representar o modelo graficamente por superfície de resposta. O modelo da equação 5.1 está representado nas Figuras 5.9 e 5.10, a seguir:

Figura 5.9 Superfície de resposta, para o volume específico, em função das concentrações de emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C). Os valores fixos encontram-se nos pontos centrais (0, 0, 0)

Avaliando as figuras de superfície de resposta para o volume específico, observa-se que: 1- aumentando a concentração de emulsificante e do ácido ascórbico ocorre aumento do volume específico até o ponto central e depois tende a uma redução; 2- aumentando-se a concentração de enzima ocorre diminuição significativa do volume específico e para o emulsificante não ocorre alteração.

Figura 5.10 Contornos da resposta para o volume específico comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

As superfícies de resposta apresentadas na Figura 5.9 e as curvas de contorno apresentadas na Figura 5.10 permitem verificar que para obtenção de um volume considerado ideal e dentro dos padrões adotados, ou seja, 5,2 – 5,4 cm³/g,

as variáveis A, B e C se encontram nos pontos centrais, o que corresponde às concentrações de 0,2% de emulsificante, 70 ppm de ácido ascórbico e 0,6% de enzima. O pão com o volume médio de $5,3 \text{ cm}^3/\text{g}$ (pão Otimizado) está abaixo daquele encontrado para o pão Controle ($v = 5,86 \text{ cm}^3/\text{g}$) e acima do volume do pão MTGase ($v = 4,77 \text{ cm}^3/\text{g}$). No entanto, o resultado da formulação otimizada pode ser considerado bom devido à redução de emulsificante de 0,4% para 0,2%, de ácido ascórbico de 140 para 70 ppm e de enzima MTGase de 1,0 para 0,6%, para compensar o custo da enzima.

A Figura 5.11 compara os volumes específicos do pão Controle, do pão Otimizado, do pão MTGase e do pão Zero.

Figura 5.11 Comparação entre os volumes específicos dos pães: 1- pão Controle; 2- pão Otimizado; 3- pão MTGase e 4- pão Zero.

2 – Dureza

Os parâmetros do modelo codificado já excluídos, os fatores onde $p > 0,05$, estão apresentados na Tabela 5.6. Foram eliminados os seguintes fatores: as interações AA, CC, AB, AC e BC pois os efeitos nestes pontos não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Tabela 5.6 - Parâmetros da regressão para o modelo da dureza.

Termo	Coefficientes	T	p
Constante	1,67782	26,438	0,000
A	-0,12888	-2,470	0,029
B	-0,02999	-0,575	0,5761
C	0,39028	7,481	0,000
B*B	0,12919	2,419	0,032

O coeficiente de determinação foi de $R^2 = 85,0\%$.

A partir dos valores observados na Tabelas 5.3 e 5.6, pode-se escrever o modelo para a resposta dureza, mostrado na equação 5.2.

Equação 5.2:

$$\hat{Y} = 1,6778 - 0,12888A - 0,02999B + 0,39028C + 0,12919B^2$$

Em que $\hat{Y}$ é a dureza ajustada; A é a concentração de emulsificante; B é a concentração de ácido ascórbico e C é a concentração de transglutaminase. A análise de variância da regressão está representada na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a dureza.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média dos desvios quadráticos	Razão F	Valor de P
Regressão	4	2,53676	2,53676	17,06	0,000
Erro Residual	12	0,44603	0,44603		
Falta de Ajuste	10	0,43835	0,43835	11,43	0,083
Erro Puro	2	0,007671	0,007671		
Total	16	2,98279			

Com a Tabela acima, é possível obter a amplitude do modelo, como descrito abaixo:

$$R^2 = SQ_{\text{regressão}} / SQ_{\text{Total}} \quad \therefore \quad R^2 = 0,85$$

A relação entre os valores de dureza previstos pelo modelo (equação 5.2) em função dos valores observados está representada na Figura 5.12.

Figura 5.12 Relação entre os valores de dureza previstos pelo modelo (equação 5.2) em função dos valores observados.

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 5.7 e dos valores de R e F e do gráfico acima pode-se afirmar que o modelo se ajusta adequadamente aos dados e pode ser representado graficamente em superfície de resposta (Figuras 5.13 e 5.14)

Figura 5.13 Superfície de resposta, para a dureza, em função das concentrações de emulsificante(A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C). Os valores fixos encontram-se nos pontos centrais (0, 0, 0)

Pelo comportamento apresentado na figura acima, sugere-se que aumentando a concentração do emulsificante e do ácido ascórbico ocorre diminuição da dureza e com a enzima observa-se que a dureza aumenta com o aumento de sua concentração.

Figura 5.14 Contornos da resposta para a dureza comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

Como foi dito a presença de enzima aumenta a dureza do pão, que pode ser observado mais claramente na Figura 5.15, que compara o valor deste parâmetro entre todos os pães.

Figura 5.15 Comparação entre os valores de dureza dos pães: 1- pão Controle; 2- pão Otimizado; 3- pão MTGase e 4- pão Zero.

As medidas instrumentais da análise de TPA geradas pelo analisador de textura, TA-TX2i, e que segundo Szczesniak (2002) podem ser correlacionadas com as análises sensoriais também foram feitas para as formulações do planejamento experimental. Para análise firmeza (N), coesividade, elasticidade (m), mastigabilidade (N.m) e gomosidade (N) foi utilizado um Planejamento Composto Central para 2 fatores. Este planejamento consta de 17 pontos: 8 fatoriais, 6 axiais ($\alpha=1,68$) e 3 pontos centrais. Esses resultados estão apresentados na Tabela 5.8

Os resultados para as variáveis dependentes foram avaliados pelo programa estatístico, *Minitab*. Com os parâmetros do modelo codificado já excluídos ($p>0,05$), e a regressão modelada com os dados da Tabela 5.8, obteve-se os modelos equacionais codificados, apresentados na Tabela 5.9, para as variáveis dependentes acima citadas. Esses modelos representam estimativas dos valores das variações dessas variáveis como uma função das concentrações de emulsificante, ácido ascórbico e transglutaminase.

Tabela 5.8 - Planejamento Experimental: Variáveis reais e codificadas e firmeza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade.

ENSAIOS	VALORES CODIFICADOS				VALORES REAIS (% sobre a farinha)				VARIÁVEIS INDEPENDENTES				VARIÁVEIS DEPENDENTES			
	A	B	C		Emulsificante	Ácido Ascórbico	Enzima	Firmeza (N)	Coesividade	Elasticidade (m)	Mastigabilidade (N.m)	Gomosidade (N)				
1	-1	-1	-1		0,1	0,0030	0,3	2,5 ± 0,3	1,57 ± 0,03	0,0098 ± 0,0002	3,9 ± 0,5	392 ± 44				
2	+1	-1	-1		0,3	0,0030	0,3	1,7 ± 0,2	1,58 ± 0,02	0,0097 ± 0,0003	2,7 ± 0,3	275 ± 37				
3	-1	+1	-1		0,1	0,0110	0,3	2,3 ± 0,3	1,56 ± 0,04	0,0099 ± 0,0001	3,7 ± 0,5	362 ± 41				
4	+1	+1	-1		0,3	0,0110	0,3	2,0 ± 0,2	1,57 ± 0,01	0,0098 ± 0,0002	3,2 ± 0,2	317 ± 23				
5	-1	-1	+1		0,1	0,0030	0,9	4,0 ± 0,3	1,54 ± 0,06	0,0098 ± 0,0002	6,2 ± 0,7	613 ± 63				
6	+1	-1	+1		0,3	0,0030	0,9	3,1 ± 0,4	1,54 ± 0,02	0,0099 ± 0,0002	4,8 ± 0,7	477 ± 67				
7	-1	+1	+1		0,1	0,0110	0,9	3,8 ± 0,5	1,57 ± 0,03	0,0099 ± 0,0002	6,2 ± 0,9	610 ± 95				
8	+1	+1	+1		0,3	0,0110	0,9	3,8 ± 0,3	1,57 ± 0,01	0,0098 ± 0,0002	5,7 ± 0,2	556 ± 68				
9	-1,68	0	0		0,032	0,0070	0,6	3,0 ± 0,3	1,55 ± 0,04	0,0099 ± 0,0001	4,7 ± 0,6	465 ± 52				
10	+1,68	0	0		0,368	0,0070	0,6	2,5 ± 0,2	1,57 ± 0,01	0,0098 ± 0,0002	3,9 ± 0,3	388 ± 36				
11	0	-1,68	0		0,2	0,00028	0,6	3,6 ± 0,4	1,63 ± 0,02	0,0097 ± 0,0003	5,7 ± 0,8	581 ± 88				
12	0	+1,68	0		0,2	0,0137	0,6	2,8 ± 0,3	1,50 ± 0,01	0,0099 ± 0,0001	4,4 ± 0,6	425 ± 54				
13	0	0	-1,68		0,2	0,0070	0,096	2,0 ± 0,4	1,60 ± 0,03	0,0097 ± 0,0005	3,2 ± 0,3	324 ± 58				
14	0	0	+1,68		0,2	0,0070	1,104	3,4 ± 0,4	1,57 ± 0,01	0,0099 ± 0,0002	5,4 ± 0,8	530 ± 74				
15	0	0	0		0,2	0,0070	0,6	2,7 ± 0,3	1,53 ± 0,03	0,0098 ± 0,0002	4,2 ± 0,6	416 ± 60				
16	0	0	0		0,2	0,0070	0,6	2,6 ± 0,2	1,58 ± 0,02	0,0099 ± 0,0002	4,1 ± 0,4	418 ± 39				
17	0	0	0		0,2	0,0070	0,6	2,5 ± 0,3	1,51 ± 0,04	0,0099 ± 0,0002	4,0 ± 0,5	393 ± 42				

Tabela 5.9 – Regressões das superfícies para as propriedades sensoriais dos pães.

Propriedades Sensoriais	Equação da Regressão ^{a,b}	R ²
Firmeza	$\hat{Y}_1 = 2,6845 - 0,2062A - 0,0479B + 0,62444C + 0,20672B^2$	0,85
Coesividade	-	-
Elasticidade	$\hat{Y}_2 = 0,009837 - 0,00002394A - 0,00005882B + 0,00006202C$	0,90
Mastigabilidade	$\hat{Y}_3 = 4,2247 - 0,3551A - 0,0941B + 0,9701C + 0,3235B^2$	0,86
Gomosidade	$\hat{Y}_4 = 416,35 - 34,77A - 14,69B + 93,61C + 33,88B^2$	0,86

a- As variáveis independentes estão codificadas: A- Concentração de Emulsificante; B- Concentração de Ácido Ascórbico e C- Concentração de Enzima. $\hat{Y}$ são as estimativas das variáveis dependentes ajustadas: $\hat{Y}_1$ = firmeza ajustada; $\hat{Y}_2$ = elasticidade ajustada; $\hat{Y}_3$ = mastigabilidade ajustada; $\hat{Y}_4$ = gomosidade ajustada;

b- Os níveis de significância de todas as regressões ajustadas no modelo foram menores que 0,05.

Analisando a equação da regressão apresentada na Tabela 5.9, a Análise de Variância ANOVA, e as figuras de superfície de resposta e dos contornos para os valores do parâmetro firmeza apresentados nos anexos II, III e IV, respectivamente, têm-se que, para as concentrações mais elevadas de MTGase (0,9 e 1,104%), os valores de firmeza são mais altos, variando de 3,1 a 4,0 N, o que está de acordo com o valor encontrado para a firmeza (3,36 N) para o pão MTGase. Pode-se afirmar que a presença da enzima isoladamente, ou em combinação com outros aditivos, mas em altas concentrações promove endurecimento do miolo. Para concentrações de 0,3 a 0,6% não compromete a maciez do pão. Para concentrações mais elevadas de emulsificante, os valores para firmeza são os menores, pães com miolos mais macios, o que comprova a função do aditivo (Figura 5.16).

Figura 5.16 Comparação entre os valores de firmeza dos pães: 1- pão Controle; 2- pão Otimizado; 3- pão MTGase e 4- pão Zero.

Para os resultados da regressão da variável dependente, coesividade, verificou-se que são não significativos o efeito linear, o efeito quadrático e nem interação de nenhuma das variáveis independentes (emulsificante, ácido ascórbico e transglutaminase), não sendo possível ajustar o modelo.

Também para o parâmetro elasticidade, as mesmas condições foram analisadas e estão descritas nos anexos V, VI e VII. A interpretação para a ocorrência é que o emulsificante e o ácido ascórbico apresentaram efeito negativo sobre a elasticidade, enquanto que, a enzima MTGase parece influenciar positivamente este parâmetro. Não houve diferença significativa entre os resultados de elasticidade para os pães pão Controle, pão MTGase e o pão Otimizado. Porém no pão Zero, o valor para elasticidade cai pela metade (Figura 5.17).

Figura 5.17 Comparação entre os valores de elasticidade dos pães: 1- pão Controle; 2- pão Otimizado; 3- pão MTGase e 4- pão Zero.

Como a mastigabilidade é definida pelo produto da firmeza, coesividade e elasticidade, era de esperar que o comportamento para este parâmetro seria semelhante ao da firmeza, desde que os resultados para elasticidade e coesividade não influenciaram nas interpretações. Avaliando, então, a equação da regressão (Tabela 5.9), a análise de variância e as figuras de superfície de resposta e dos contornos entre os valores de mastigabilidade dos pães (Anexos VIII, IX e X, respectivamente), tem-se que altas concentrações de enzima aumentam a mastigabilidade, tornam o pão mais duro, sendo atenuado pela presença de emulsificante, como aconteceu para a firmeza (Figura 5.18).

Figura 5.18 Comparação entre os valores de mastigabilidade dos pães: 1- pão Controle; 2- pão Otimizado; 3- pão MTGase e 4- pão Zero.

Sabendo que a definição de gomosidade é o produto da firmeza pela coesividade, e que os resultados para coesividade são não significativos o efeito linear, efeito quadrático e nem interação de nenhuma das variáveis independentes, emulsificante, ácido ascórbico e transglutaminase, os resultados aqui também, para este parâmetro, são semelhantes aos resultados encontrados para a firmeza: altas concentrações de enzima aumentam a gomosidade, tornam o pão mais duro, sendo atenuado pela presença de emulsificante (Figura 5.19).

A equação da regressão está na Tabela 5.8, a análise de variância e as figuras de superfície de resposta e dos contornos estão apresentadas nos anexos XI, XII e XIII, respectivamente.

Figura 5.19 Comparação entre os valores de gomosidade dos pães: 1- pão Controle; 2- pão Otimizado; 3- pão MTGase e 4- pão Zero.

Os resultados das análises de TPA mostraram que as formulações dos pães desenvolvidas com enzima MTGase nas proporções estabelecidas pelo planejamento experimental definiram um produto que pode ser caracterizado por firmeza, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade e que a medida de coesividade não é adequada para caracterizar esse pão.

Gerrard et al. (1998) encontraram resultados que mostraram que MTGase têm uma profunda influência na massa. Tempos de relaxação foram maiores e superaram àqueles de massas padrões. Segundo esses autores, altos tempos de

relaxação geralmente correspondem a alta qualidade de farinha. Para estes ensaios, os oxidantes, ácido ascórbico e bromato, e a enzima MTGase foram utilizados e aumentaram o tempo de relaxação da massa. Resultados mostraram que para os oxidantes os efeitos foram muito menores e não aumentaram com o tempo, e que para a MTGase o efeito foi acumulativo, com mais ligações cruzadas entre proteínas sendo formadas se a enzima tiver mais tempo para agir.

5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas da farinha de trigo, do 3º lote, das massas e dos pães, como descritas nos itens 4.3.3.1 a 4.3.3.8 foram realizadas nos laboratórios da Escola de Engenharia Mauá e no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e simultaneamente ao ensaio do delineamento experimental para otimização da formulação do pão de forma.

5.4.1 Análises físico-químicas da farinha de trigo

Foram realizadas análises de umidade, cinzas, gordura, proteína, pH e acidez titulável para amostras de farinha de trigo. As análises foram feitas, pelo menos, em triplicatas e os resultados são apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 – Composição química da farinha de trigo utilizada na fabricação dos pães

	Conteúdo ^a (%)	Coeficiente de variação (%)	Conteúdo calculado em base seca (%)
Umidade	13,25 ± 0,03	0,23	
Cinzas	0,84 ± 0,01	1,2	0,97
Gordura	1,90 ± 0,02	1,0	2,19
Proteínas ^b	10,9 ± 0,3	2,8	12,6
Carboidratos ^c	73,11	-	84,3

a = os teores analisados estão apresentados em base úmida; b = o fator de conversão (N x 5,7); c = carboidratos, resultado obtido por diferença.

Os teores de umidade e cinzas determinados estão muito próximos daqueles fornecidos pelo fabricante, 13,50%, em base úmida, e 1,0%, em base seca, respectivamente. Para os outros componentes, os teores não foram fornecidos.

Na Tabela 5.11 estão apresentados os valores de pH e Acidez Titulável em suspensão alcoólica, além dos teores de glúten seco e úmido, e o número de queda (*Falling number*) para a farinha utilizada na fabricação dos pães, aqui também as análises foram feitas, com um número de repetições de, no mínimo, três vezes.

Tabela 5.11 – Valores de pH, acidez titulável, glúten úmido e seco e *falling number* para farinha de trigo.

	Resultados	Coefficiente de variação (%)
pH	6,25 ± 0,02	0,32
Acidez Titulável ^(a)	2,2 ± 0,1	4,5
Glúten Úmido (%)	27,1 ± 0,4	1,5
Glúten Seco (%)	9,5 ± 0,1	1,0
<i>Falling Number</i>	> 400 Segundos	

(a) = unidade “volume de NaOH 0,10 mol/L gasto para neutralizar a acidez de 100,0 g de farinha”

O teor de umidade da farinha armazenada deve-se encontrar com valores inferiores a 14%, em base úmida, permitido pela legislação. O teor de cinzas indica o grau de extração de farinha de trigo e é utilizado para classificação desta. Para valores inferiores a 0,65% em base seca, a farinha é classificada como especial, enquanto que para valores entre o intervalo 0,66 – 1,35% em base seca, a classificação é comum. Para o teor de glúten na faixa de 23-30%, a farinha é considerada de médio conteúdo

de glúten. O pH, em condições normais de armazenamento, deve estar entre 5,5 e 6,3; enquanto que, para a acidez titulável em suspensão alcoólica, o valor não deve ser superior a 4,0. Valores inferiores de pH ou superiores de acidez titulável, indicam alterações por condições desfavoráveis de armazenamento e essas medidas são utilizadas para indicar condições de panificação da farinha.

Avaliando os resultados pode-se considerar a farinha utilizada em condições normais de uso quanto à umidade, acidez e pH. O teor de cinzas elevado justifica o miolo mais escurecido apresentado pelos pães. Os baixos teores de proteína e glúten vão de encontro ao objetivo do trabalho em promover aumento da qualidade da farinha. O elevado valor de *falling number*, baixa atividade enzimática, foi compensado pela adição de enzima α -amilase.

5.4.2 Análises físico-químicas das massas e pães

Foram realizadas análises de umidade e determinação de proteína para as massas antes da fermentação (M1), após 150 minutos de fermentação (M2) e do pão após o assamento. Todas as amostras foram retiradas durante o processo de fabricação dos pães e analisadas em seguida. Parte delas foi congelada a -30 °C e analisadas por cromatografia e eletroforese.

As massas e os pães dos denominados pão Zero, pão Controle e pão MTGase foram analisados. As amostras M1, M2 e dos pães foram submetidas às etapas de extração como descrito nos itens 4.3.5.1 e 4.3.5.2. As frações extraídas de albuminas,

globulinas, gliadinas e gluteninas foram separadas, e os respectivos teores analisados por Kjeldahl. Os resultados são apresentados na Tabela 5.12 e 5.13.

Tabela 5.12 – Teores de umidade e proteína das massas e pães.

Amostras	Umidade (%)	Proteína (%) [*]
pão Zero		
M ₁	39,2 ± 0,7 ^b	12,0 ± 0,3 ^a
M ₂	38,2 ± 0,5 ^b	12,0 ± 0,2 ^a
P	31,5 ± 0,9 ^a	11,76 ± 0,07 ^a
pão Controle		
M ₁	39,9 ± 0,3 ^b	12,0 ± 0,2 ^a
M ₂	39 ± 1 ^b	12,2 ± 0,2 ^a
P	32,5 ± 0,4 ^a	11,6 ± 0,1 ^a
pão MTGase		
M ₁	39,2 ± 0,5 ^b	12,4 ± 0,3 ^a
M ₂	38,6 ± 0,8 ^b	12,8 ± 0,2 ^a
P	34,9 ± 0,2 ^b	11,6 ± 0,3 ^a

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo Teste de Duncan.

Pão Zero = formulação base sem aditivação; pão Controle = formulação base acrescentada de 0,4% de emulsificante e 0,0140%; ácido ascórbico; pão MTGase = formulação base adicionada de 1% de enzima MTGase (% sobre farinha).

M₁ refere-se à massa antes da fermentação; M₂ refere-se à massa após 150 minutos de fermentação (Temperatura de 35 °C e 85% de umidade) e P o pão após 40 minutos de assamento a 140 °C; ^{*}= teor de proteína em base seca e fator de conversão (N X 5,7).

A quantidade de água no produto final adicionado de MTGase foi maior que para os outros pães, Controle e Zero, o que pode significar um expressivo aumento de rendimento no produto.

O aumento de absorção de água durante o desenvolvimento da massa não foi medido, pois se fixou um volume para todas as formulações. Sobre esse aspecto, Gerrard et al. (1998) relataram o aumento da absorção de água em 6% (de 62% para 68%) para pães adicionados de TGase, representando, portanto, um potencial de economia do custo para indústria de panificação, que poderia compensar o custo adicional da enzima. Segundo esses pesquisadores, a razão para o aumento de absorção da água ainda não está clara.

Tabela 5.13 – Teores das frações protéicas das massas e pães^(i, ii).

	Albuminas/Globulinas	Gliadinas	Gluteninas	Resíduos	Proteína Total
Farinha	1,85 ± 0,05	2,90 ± 0,01 ^a	5,4 ± 0,5 ^a	1,50 ± 0,03 ^a	12,6
Farinha + TG	-	-	4,8 ± 0,1 ^b	2,7 ± 0,2 ^b	12,8
Pão MTGase					
M1	1,44 ± 0,01	2,84 ± 0,06 ^{a,b}	4,00 ± 0,02 ^c	3,80 ± 0,05 ^c	12,4
M2	1,38 ± 0,09	2,95 ± 0,09 ^a	2,23 ± 0,01 ^d	5,90 ± 0,01 ^d	12,8
Pão	1,30 ± 0,01	2,85 ± 0,03 ^{a,b}	2,2 ± 0,3 ^d	5,04 ± 0,07 ^e	11,6
Pão Zero					
M1	1,56 ± 0,01	2,8 ± 0,2 ^{b,c}	5,0 ± 0,1 ^{b,e}	2,3 ± 0,2 ^f	12,0
M2	1,6 ± 0,1	2,75 ± 0,01 ^c	4,10 ± 0,06 ^c	3,0 ± 0,1 ^g	12,0
Pão	1,85 ± 0,06	2,95 ± 0,02 ^a	5,15 ± 0,02 ^e	1,7 ± 0,1 ^h	11,76

(i) Os teores das frações protéicas e da proteína total estão apresentados em base seca e o fator de conversão (NX5,7)

(ii) valores médios de 5 determinações.

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Os resultados da tabela acima para os teores de proteína nas diferentes frações, mostraram que as quantidades de proteínas nos resíduos das massas M1 são menores

que aquelas encontradas na M2. Essas diferenças significativas ($p < 0,05$) podem ser observadas tanto para o Pão Zero (2,3% para 3,0%) quanto para o Pão MTGase. (3,80% para 5,90%). Porém, a diferença entre as quantidades de proteínas das amostras do Pão MTGase é muito maior e que pode ser explicada pela presença da enzima que pode favorecer a polimerização das subunidades durante os 150 minutos de repouso da massa. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Aussenac, Carceller e Kleiber (2001) que trabalharam com diferentes métodos para verificar presença de polímeros de proteínas nos resíduos, após extração das proteínas solúveis das massas de pães, com diferentes tempos de mistura (1 a 10 minutos) e descanso (45 a 135 minutos). Eles verificaram que a quantidade de gluteninas que não foram extraídas pelo SDS diminuiu exponencialmente com o aumento do tempo de mistura, mas aumentou significativamente com o tempo de descanso da massa. Segundo esses mesmos autores, os mecanismos de despolimerização e repolimerização das frações de gluteninas, principalmente as de altos pesos moleculares, parecem explicar os resultados. A despolimerização ocorre durante o batimento promovendo a diminuição do tamanho dos polímeros de gluteninas por separação física dos agregados ou por quebra das ligações não-covalentes e covalentes, o que aumenta a extração das frações.

5.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ELETROFORÉTICAS

O método de fracionamento de Osborne modificado foi utilizado, e as proteínas de farinha de trigo foram separadas em 3 frações: albuminas e globulinas, gliadinas e gluteninas.

Desde a introdução por Bietz, em 1983, a cromatografia líquida tem sido largamente aplicada a proteínas de cereais e provado ser uma ferramenta altamente eficiente para investigação de gliadinas e subunidades de gluteninas. Segundo esse autor, o método, além de muito eficiente, é sensível na resolução para proteínas, rápido, reprodutível, e relativamente simples de manipular.

A quantificação de proteínas do trigo por CLAE tem sido empregada devido às vantagens apresentadas pela eluição em diferentes superfícies hidrofóbicas no extrato de gliadinas (ω -, α -, β - e γ -tipos de gliadinas), e de subunidades de pesos moleculares altos e baixos, no extrato de gluteninas (WIESER; SEILMEIER; BELITZ, 1994).

5.5.1 Caracterização das gliadinas da farinha, das massas e dos pães.

Após cada etapa de extração, para a perfeita separação dos sobrenadantes das suspensões foram feitas centrifugações. A eficiência da centrifugação foi assegurada, quando os sobrenadantes estavam claros e foram facilmente filtrados através de uma membrana de 0,45 μm . Como as farinhas aglomeravam-se imediatamente após a adição de solvente, as amostras foram intensivamente homogeneizadas antes de cada

extração com agitação vigorosa. Foram feitas agitações contínuas por 60 min a 4 °C, em câmara refrigerada, com exceção para o enxágüe das gliadinas (30 min), e centrifugações a 20500 x g por 20 min. Albuminas e globulinas foram extraídas na presença de solução salina. Os resíduos foram então ressolubilizados e as gliadinas separadas com etanol 70% (v/v).

Bietz et al. (1984) realizaram extrações exaustivas para gliadinas variando os tempos de extração com etanol 70%, de 5 min a 5 h, seguidas de centrifugações (10 min a 27000 x g). Verificaram que os cromatogramas apresentados pelos extratos obtidos foram idênticos, independente dos tempos utilizados. Concluíram então que, para a maioria das aplicações, 5 minutos de extração produz amostra representativa e que 5 horas pareceu não ser excessiva, consideraram então 30 minutos, o tempo adequado para essa etapa.

De acordo, ainda, com os resultados de Bietz et al. (1984), a retirada de gordura antes da extração das proteínas não foi necessária e uma prévia extração de globulinas e albuminas com uma solução salina (Tampão fosfato + NaCl) foi essencial. Capochi, Galleschi e Saviozzi (2000) também realizaram separações das albuminas e globulinas para garantir a não contaminação dessas proteínas nos resíduos das proteínas de glúten separadas posteriormente, e verificaram que adição de solução de NaCl e o não desengorduramento prévio das amostras não afetaram o desempenho dos perfis cromatográficos e eletroforéticos das proteínas.

Para os intervalos de eluição das gliadinas dos tipos α , β - e ω -gliadinas na coluna de fase reversa C18 houve sobreposição dos picos (Figura 5.20), de acordo com

resultados de ensaios comparativos entre C8 e C18 para extratos de gliadinas, gluteninas, albuminas e globulinas obtidos por Wieser, Antes e Seilmeier (1998).

Figura 5.20 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da farinha utilizando C18.

A melhor separação foi obtida numa coluna C8, como relatado pelos autores acima citados e a condição do sistema de eluição utilizado foi: A) Ácido Trifluoracético (TFA) (0,1%), v/v) e B) Acetonitrila (ACN) + TFA (99,9/0,1%, v/v), com o gradiente descrito na Tabela 4.5.

A coluna C8 foi, então, escolhida por apresentar as melhores separações, e o perfil cromatográfico está apresentado na Figura 5.21.

A vazão foi de 1,0 mL/min; detecção foi por UV absorbância de 210 nm. A cada corrida a coluna foi limpa com 90% de acetonitrila por 15 min e equilibrada com a concentração inicial durante 5 min.

A quantificação por CLAE parece ser superior que a maioria dos métodos (BIETZ e BURNOUF, 1985; WIESER, ANTES e SEILMEIER, 1998; AUSSENAC, CARCELLER e KLEIBER, 2001). As frações de gliadinas foram eluídas de acordo com as diferentes superfícies hidrofóbicas (ω , $\alpha + \beta$, e γ -tipos de gliadinas) no extrato de gliadinas, representado na Figura 5.21, como I, II, III, respectivamente.

Figura 5.21 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da farinha utilizando C8 nas condições de eluição apresentadas na Tabela 5.15, mostrando as diferentes frações. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Após definição das melhores condições de trabalho, desde a extração até as análises cromatográficas para as gliadinas, foram utilizadas essas técnicas adaptadas

com amostras da farinha, das massas e pães derivados do processo de panificação. O perfil cromatográfico está apresentado na Figura 5.22.

As quantidades de amostras utilizadas foram: 2,0 gramas de farinha de trigo, 3,0 gramas para as massas (fermentadas, ou não) e também para os pães. As amostras foram retiradas durante o processo de fabricação dos pães e permaneceram embaladas e congeladas a -30 °C até o momento das análises. Para cada ensaio de fabricação de pão Controle, pão MTGase e pão Zero foram retiradas as amostras: M1 de massa obtida antes da fermentação; M2 de massa obtida após 150 minutos de fermentação e P do pão após assamento). Tais amostras foram destinadas à extração das proteínas e posteriores análises físico-químicas, cromatográficas e eletroforéticas.

Todas as extrações foram feitas em triplicatas, produzindo três cromatogramas para cada situação para garantir reprodutibilidade dos resultados. Os extratos protéicos foram armazenados nas mesmas condições das amostras para análises de eletroforese posteriores.

Figura 5.22 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da farinha de trigo. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Os perfis cromatográficos produzidos pelas proteínas extraídas das amostras retiradas durante o processo de fabricação do pão Zero, estão mostrados a seguir. A mistura de farinha de trigo com os ingredientes (gordura, sal, açúcar e enzima α -amilase) e água após 18 min, em média, de batimento, produziu uma massa denominada de ZM1, e o cromatograma correspondente está representado na Figura 5.23. Essa mesma massa sofreu fermentação de 150 minutos em câmara a 35 °C e 85% de umidade, e recebeu a denominação ZM2 (Figura 5.24). Após 40 min de assamento a 140 °C, temos o pão e uma amostra foi retirada (Figura 5.25).

Figura 5.23 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa ZM1 do pão Zero. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Figura 5.24 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa ZM2 do pão Zero. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Figura 5.25 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas do pão Zero. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Pequenas alterações nos perfis protéicos são notadas nas massas após batimento e após fermentação, sendo mais evidentes as mudanças nas frações de gliadinas obtidas do pão (Figura 5.25), porém é importante considerar aqui, o aquecimento e consequentemente a desnaturação das proteínas.

Durante o processo de fabricação do pão MTGase, foram retiradas amostras, que foram tratadas e submetidas às análises cromatográficas. Os perfis das proteínas extraídas das amostras retiradas após 14 min, em média, de batimento da mistura, está representado na Figura 5.26. Essa massa recebeu a denominação TGM1, e sofreu 150 min de fermentação, e foi chamada de TGM2. E seu cromatograma correspondente está mostrado na Figura 5.27. Após 40 min de assamento a 140 °C, retiramos a amostra do pão (Figura 5.28).

Figura 5.26 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa TGM1 do pão MTGase. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Figura 5.27 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa TGM2 do pão MTGase. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Figura 5.28 Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas do pão MTGase. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

O mesmo comportamento verificado anteriormente, é repetido aqui para as massas e o pão com MTGase, no qual apenas nesta última etapa do processo foi possível detectar alterações nas gliadinas após o assamento.

Finalmente para o pão Controle, também foi usado o mesmo procedimento para as amostras e análises. O cromatograma para a massa M1, denominada aqui de CM1 está apresentado na Figura 5.29, e para a massa M2, a CM2, o perfil está na Figura 5.30. Para o pão, após 40 min de assamento, as frações de gliadinas apresentaram os perfis mostrados na Figura 5.31

Figura 5.29: Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa CM1 do pão Controle. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Figura 5.30: Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas da massa CM2 do pão Controle. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Figura 5.31: Perfil cromatográfico para as frações de gliadinas do pão Controle. I= ω -gliadinas; II= α e β -gliadinas e III = γ -gliadinas.

Observando os perfis cromatográficos apresentados pelas gliadinas contidas nas massas M1 e M2 do pão Zero, pode-se concluir que não houve diferença no comportamento das proteínas logo após a mistura e durante o descanso. Parece que a tensão aplicada à massa durante o batimento não afeta a estrutura da molécula. O mesmo podendo ser considerado para os outros dois pães, pão MTGase e o Controle.

Apesar de a maioria dos trabalhos com proteínas do glúten estarem direcionados às gluteninas de altos e baixos pesos moleculares, e de que há evidências de interações inter e intra-moleculares entre essas frações afetarem positivamente os parâmetros de qualidade estudados, como textura de massa e miolo, e volume do produto acabado, Fido et al. (1997) afirmaram que não somente as gluteninas, mas também as gliadinas afetam a qualidade.

Embora geralmente, é concluído que as gliadinas têm efeitos negativos nas propriedades da massa e qualidade de panificação, Weegels et al. (1994) adicionaram grupos de gliadinas purificadas a farinhas e encontraram aumento de volume para o pão. Uthayakumaram et al. (2001) em estudos com adição suplementar de gliadina em massas resultaram em tempos de mistura mais curtos, maior resistência à quebra, elasticidade mais baixa e reduzido volume. Fido et al. (1997) trabalharam com frações individuais de gliadinas, adicionando-as também às farinhas e encontraram resultados ambíguos entre àqueles apresentados pela mixografia e extensografia, com relação à força da massa. Eles explicaram que as diferenças no comportamento estão relacionadas às estruturas e interações das diferentes frações de gliadinas no sistema.

Por outro lado, Rasiah et al. (2005) estudaram a ação da enzima glicose oxidase nas gliadinas, na forma reduzida e não reduzida pelo SDS. Eles concluíram que as ligações cruzadas que possivelmente poderiam ocorrer entre as frações não foram significativas. Para eles, as frações de gliadinas são pequenas, composta de cadeias polipeptídicas individuais, com grupos tióis (SH) e ligações cruzadas dissulfeto intramoleculares. Por esse motivo, durante o desenvolvimento da massa, a estrutura simétrica e compacta resiste ao estiramento, à orientação linear e à exposição dos grupos reativos.

Os resultados apresentados neste trabalho, também são consistentes com aqueles obtidos por Allen (1999), MacRitchie, Kasarda e Kuzmicky (1991) e MacRitchie (1987), que afirmaram que as gliadinas não estão disponíveis à oxidação e à formação de ligações cruzadas intermoleculares.

O perfil eletroforético das frações de gluteninas e gliadinas foi obtido em gel de poliacrilamida contendo SDS, como descrito no item 4.3.5.5, e está apresentado na Figura 5.32.

Figura 5.32 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, de frações de gliadinas. As colunas estão numeradas pelos números de 1 a 9, que representam: 1- Padrões de peso molecular; 2- M1 do pão Zero; 3- M1 do pão MTGase; 4- M2 do pão Zero; 5- M2 do pão MTGase; 6- pão Zero; 7- pão com MTGase; 8- Farinha; 9- Farinha com MTGase.

A eletroforese acima foi interpretada por análise densitométrica. Os perfis para as frações de gliadinas obtidas das amostras retiradas durante o processo de fabricação do pão Zero, em comparação com aquele apresentado pela farinha, estão representados na Figura 5.33.

Figura 5.33 Perfis densitométricos das frações de gliadinas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão Zero e da farinha de trigo. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão Zero após o assamento.

O perfil das gliadinas da farinha de trigo mostrou que existe uma predominância de proteínas de pesos moleculares que variam de 25 a 70 KDa. Segundo a literatura, as frações α - β - e γ -gliadinas são ricas em grupos tióis e os pesos moleculares variam entre 30 e 40 KDa. A fração de maior peso, as ω -gliadinas tem aproximadamente 70 KDa é a mais hidrofílica, pobre em grupos dissulfetos, e segundo Weegels et al. (1994), são as frações que apresentaram efeitos mais negativos com relação ao volume do pão. Durante a fabricação do pão, a predominância ainda é das frações com pesos entre 25 e 70 KDa como apresentado pela farinha. Porém, para os perfis das massas M1 e M2 e do pão, houve o aparecimento de um pico que representaria uma fração de 120 KDa, o que não é compatível com pesos moleculares para essas frações, a menos que se formem alguns agregados de proteínas durante a mistura, descanso e assamento da massa.

Os perfis densitométricos apresentados para as frações de gliadinas das amostras retiradas durante o processo de fabricação do pão MTGase, em comparação com aquele apresentado pela farinha adicionada de 1% de enzima transglutaminase, estão representados na Figura 5.34.

Figura 5.34 Perfis densitométricos das frações de gliadinas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão MTGase e da farinha de trigo adicionada de enzima. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão MTGase após o assamento.

O perfil apresentado para a farinha adicionada de enzima, mostrou um pico próximo aos 40 KDa, o que é compatível, pois a enzima transglutaminase utilizada apresenta peso molecular de 38 KDa. Também para essas amostras, foi possível identificar maior quantidade de frações de pesos moleculares variando entre 25 e 70 KDa, com o surgimento de algumas frações de pesos próximos a 120 KDa, como observado para o pão Zero. Ao serem comparados os perfis densitométricos das proteínas de pão Zero (Figura 5.33) com o pão MTGase (Figura 5.34), não são notadas diferenças marcantes e que aparentemente a presença de MTGase não afetou o desempenho das gliadinas durante a fabricação do pão de forma.

5.5.2 Caracterização das gluteninas da farinha, das massas e dos pães.

Após a separação das gliadinas no sobrenadante, o resíduo foi utilizado para extração das gluteninas, com tampão tetraborato, mercaptoetanol, glicina e uréia, como descrito no item 4.3.5.2. Após esta etapa, as gluteninas foram alquiladas na presença de 4-vinilpiridina, como descrito no item 4.3.5.3, para evitar a repolimerização das subunidades durante a análise.

A redução das ligações dissulfeto das gluteninas, necessário para analisar, devido ao alto peso molecular e pobre solubilidade, produz uma mistura de proteínas que têm sido chamadas de subunidades, embora nem todas dessas subunidades sejam ligadas por pontes dissulfeto; algumas são mantidas dentro dos agregados de gluteninas por interações secundárias ou não-covalentes. Glutenina reduzida, com

grupos sulfidrilas bloqueados para prevenir polimerização oxidativa, pode ser analisada por SDS-PAGE ou CLAE (BUSHUK, 1985).

A melhor separação também foi obtida na coluna C8, e a condição do sistema de eluição utilizado: A) Ácido Trifluoracético (TFA) (0,1%), v/v) e B) Acetonitrila (ACN) + TFA (99,9/0,1%, v/v), com o gradiente descrito na Tabela 4.6.

A Figura 5.35 mostra o perfil cromatográfico produzido pelas proteínas extraídas da farinha de trigo.

A vazão foi de 1,0 mL/min; detecção foi por UV absorvância de 210 nm. A cada corrida a coluna foi limpa com 90% de acetonitrila por 15 min e equilibrada com a concentração inicial durante 5 min.

Figura 5.35 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da farinha de trigo. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).

O perfil para as gluteninas extraídas da farinha está de acordo com aqueles apresentados por Johansson, Prietro-Linde e Jönsson (2001) e Wieser e Seilmeier

(1998) com a ordem de eluição das frações, as HMW-GS e em seguida as LMW-GS, é mantida nas condições aqui descritas (Figura 5.35). O resultado confirma informações anteriores, pois as frações de altos pesos moleculares são as menos hidrofóbicas.

Os perfis cromatográficos das frações glutenínicas da fabricação do pão Zero estão representados na Figura 5.36, ZM1 – a massa antes da fermentação; Figura 5.37, ZM2 – massa após 150 minutos de fermentação; e Figura 5.38, pão após o assamento.

Figura 5.36 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa ZM1 do Pão Zero. I=subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).

Figura 5.37 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa ZM2 do pão Zero. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).

Figura 5.38 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas do pão Zero. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).

E finalmente, as Figuras 5.39 a 5.41 mostram os perfis cromatográficos produzidos pelas frações de gluteninas extraídas das massas M1 e M2 e do pão adicionado de 1% de enzima, o pão MTGase.

Figura 5.39 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa TGM1 do pão MTGase. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).

Figura 5.40 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas da massa TGM2 do pão MTGase. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).

Figura 5.41 Perfil cromatográfico para as frações de gluteninas do pão MTGase. I = subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) e II = subunidades de baixo peso molecular (LMW-GS).

Comparando o comportamento dos perfis apresentados nas figuras acima, referentes às gluteninas, é possível observar que as diferenças apresentadas podem ser explicadas correlacionando aos resultados apresentados na Tabela 5.13. As diferenças entre os perfis da farinha, das massas M1 e M2 para os pães Zero e MTGase estão marcadamente nas subunidades de altos pesos moleculares (HMW-GS), as menos hidrofóbicas. É possível observar uma diminuição da quantidade de picos apresentados para a farinha (Figura 5.35) em relação às massas de quaisquer dos pães. O teor de gluteninas na farinha foi de 5,4%, enquanto que para as massas M1 ou M2, os teores foram inferiores, 4,00 para M1 e 2,23 para M2, no pão MTGase, e 5,0 M1 e 4,10 M2 para o pão Zero.

Para os perfis das massas do pão Zero, pode-se observar que houve uma diminuição da altura do pico para as HMW-GS, da M1 para a M2, o que pode significar que durante o descanso da massa houve diminuição das gluteninas solúveis, ou ainda, aumento das gluteninas não extraíveis, no resíduo. Os teores de gluteninas da M1 e M2 apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) e os seus valores foram respectivamente, 5,0% e 4,10% (Tabela 5.13).

Para os perfis da M1 e M2 do pão MTGase, além da redução observada entre elas, é possível verificar uma redução ainda maior quando comparado com os resultados do pão Zero. Em relação aos resultados da Tabela 5.13, os teores de gluteninas para M1 foi de 4,0% e para M2, 2,23%, com diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles. O que confirma a hipótese de que maior número de frações de gluteninas na presença da enzima sofre repolimerização, corroborando com os resultados de Aussenac, Carceller e Kleiber (2001).

Segundo Gerrard et al. (1998, 2000, 2001 e 2003), para massas e produtos a base de farinha de trigo, as proteínas desempenham um importante papel na qualidade e determinam as propriedades funcionais e reológicas desses sistemas. Esses autores mostraram que ligações cruzadas formadas entre as proteínas de trigo pela ação da MTGase influenciaram muito nas características dos pães e *croissants*.

Rasiah et al. (2005) verificaram também que ligações cruzadas específicas podem ser correlacionadas positivamente com propriedades macroscópicas apresentadas por certos alimentos. Nesse trabalho, com pães e *croissants*, as alterações ocorridas, tanto nas propriedades funcionais como nas estruturas moleculares das proteínas, puderam ser explicadas estudando a ação da glicose

oxidase sobre as todas as frações protéicas extraídas da farinha. As gliadinas não foram afetadas. Ligações cruzadas, dissulfeto e não-dissulfeto, ocorreram entre as frações protéicas solúveis em água, as albuminas e globulinas, que foram responsabilizadas pela significativa melhora na textura do miolo do pão. Enquanto que, o aumento de volume ocorrido nos *croissants* foi explicado pela presença de ligações cruzadas intermoleculares entre as frações de gluteninas.

Em vários estudos, a proporção relativa de polipeptídeos de pesos moleculares maiores foi relacionada com a qualidade de panificação (SINGH; DONOVAN; MacRITCHIE, 1990). A quantidade de frações específicas de gluteninas (SUTTON et al., 1990) e a quantidade total de subunidades de gluteninas HMW e LMW, também foram correlacionadas com os parâmetros reológicos.

Outros trabalhos realizados por Larrè et al. (2000), Caballero et al. (2005) e Caballero, Gomez e Rosell (2007), mostraram também que a adição de MTGase melhora a funcionalidade das proteínas da farinha através da formação de grandes polipeptídeos resultando em diminuição da solubilidade.

Apesar de a maioria dos pesquisadores afirmarem que as HMW-GS são as frações protéicas mais afetadas, Autio et al. (2005) com as LMW-GS, Bauer et al. (2003) com as α -gliadinas e Gerrard et al. (2001) com as albuminas e globulinas, relataram que tais frações também podem ser substratos para as MTGases.

A fase do processo de panificação onde a funcionalidade do glúten pode ser crítica é o desenvolvimento da massa. Pesquisadores mostraram que a quantidade de gluteninas insolúveis diminuiu durante a mistura e aumentaram novamente durante o

descanso da massa, embora a natureza do polímero antes da mistura seja diferente daquela após a mistura (VERABERBEKE et al., 2000a e 2000b).

Singh, Donovan e MacRitchie (1990) descreveram a importância da quantidade total dos polímeros de gluteninas nos vários parâmetros tecnológicos de panificação. Contudo, certa quantidade desses polímeros, permaneceu resistente aos sistemas de extração (solução de ácido acético ou SDS em tampão fosfato). Aquelas proteínas poliméricas não extraíveis parecem também estar correlacionadas com o desempenho da panificação, especialmente aos parâmetros tecnológicos relacionados com a mistura do que com a quantidade total da glutenina.

Foi sugerido que durante a mistura, o tamanho dos agregados de proteínas diminui por separação física desses agregados ou por quebra de ligações não covalentes ou covalentes (MacRITCHIE, 1987), e essa teoria se mantém até os dias de hoje.

Bonet et al. (2005) demonstraram que baixos níveis de MTGase resultam em efeitos positivos nas características do miolo e da casca de pães de farinha de trigo, bem como nas propriedades reológicas e físico-químicas da massa (ROSELL et al., 2003). Estes últimos ainda sugeriram que o efeito da MTGase é similar àquele dos oxidantes, e quando adicionado em níveis ótimos, resulta em melhoramento nas propriedades e qualidade do pão.

A ação da MTGase também transforma glúten fraco em glúten forte através do seu efeito no comportamento reológico (LARRÈ et al., 2000). A MTGase catalisa a conversão de proteínas solúveis para polímeros de proteínas de altos pesos moleculares pela formação das ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina.

Desta forma, MTGase induz as ligações cruzadas entre os polímeros de gluteninas, apesar do baixo conteúdo de lisina nas proteínas do glúten.

O melhoramento nas propriedades viscoelásticas do glúten sempre foi acompanhado pela formação de novos polímeros. A caracterização de polímeros protéicos por SDS-PAGE em condições redutoras mostrou que todos os tipos de proteínas que constituem o glúten foram capazes de formar polímeros através de ligações covalentes catalisadas pela MTGase. Contudo, ensaios de *immunoblotting* mostraram que mesmo em condições mais drásticas de reação (alta razão E/S ou 18 h de tempo de reação), algumas das α - e β -gliadinas e LMW-GS não foram envolvidas nessas ligações (LARRÈ et al., 2000). A menor participação das LMW-GS quando comparada com HMW-GS foi também avaliada. O exame dos conteúdos de glutamina e lisina dos dois tipos de subunidades de gluteninas revelou que o conteúdo de glutamina em ambos os tipos é muito alto e comparável, aproximadamente 1/3 do total de aminoácidos. Mas as frações HMW-GS contêm 6-8 moles de lisina/mol de proteína, enquanto que a LMW-GS possui somente 1 mol de lisina/mol de proteína (LARRÈ et al., 2000). Este baixo conteúdo de lisina de LMW-GS poderia explicar sua menor participação na formação de pontes intermoleculares (LARRÈ et al., 2000).

O perfil eletroforético das frações de gluteninas foi obtido em gel de poliacrilamida contendo SDS, como descrito no item 4.3.5.5.

Figura 5.42 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, de frações de gluteninas. As colunas estão numeradas pelos números de 1 a 9, que representam: 1- Padrões de peso molecular; 2- M1 do pão Zero; 3- M1 do pão MTGase; 4- M2 do pão Zero; 5- M2 do pão MTGase; 6- pão Zero; 7- pão MTGase; 8- Farinha; 9- Farinha com MTGase.

As amostras de gluteninas de farinha com ou sem MTGase, das massas e dos pães foram submetidas à SDS-PAGE, conforme apresentado na Figura 5.42 e os respectivos densitogramas reproduzidos nas Figuras 5.43 e 5.44.

Figura 5.43 Perfís densitométricos das frações de gluteninas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão Zero e da farinha de trigo. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão Zero após o assamento.

Comparando os perfis das proteínas da farinha pode-se constatar que, as frações que predominaram foram as de pesos moleculares maiores. Porém, foi possível também identificar frações de pesos moleculares entre 30 e 50 KDa, cujos comportamentos são idênticos aos daqueles apresentados pela M1 e M2. Para Payne e Corfield (1979), a maior fração de LMW-GS são as B-LMW-GS com pesos moleculares variando de 40 e 50 KDa e as C-LMW-GS com pesos moleculares de 30 a 40 KDa.

As frações de gluteninas de altos pesos moleculares, as mais hidrofílicas, após redução e quebra dos polímeros apresentam pesos entre 80 e 160 KDa (VERAVERBEKE et al., 2000a), que puderam também ser identificadas pelos perfis densitométricos. Os comportamentos das bandas das proteínas de pesos maiores até 80 KDa parecem ser idênticos quando comparando a M1 com a M2, enquanto que frações de pesos moleculares entre 60 e 70KDa só apareceram na M2 e no pão.

Os perfis densitométricos apresentados para as frações de gluteninas das amostras retiradas durante o processo de fabricação do pão MTGase, em comparação com aquele apresentado pela farinha adicionada de 1% de enzima transglutaminase, estão representados na Figura 5.44.

Figura 5.44 Perfis densitométricos das frações de gluteninas das amostras derivadas do processo de fabricação do pão MTGase e da farinha de trigo, e desta adicionada de enzima. M1 refere-se à massa obtida antes da fermentação; M2, após 150 minutos de fermentação, e o pão MTGase após o assamento.

Comparando aos perfis entre as massas M1 e M2 adicionadas de enzima, pode-se observar que, com menor intensidade nas frações de pesos moleculares maiores até 120 KDa, todas as outras sofreram alterações. Aquelas que têm pesos entre 80 e 100 KDa apresentaram redução significativa de altura, e as de 70 kDa, praticamente desapareceram. Essas reduções podem significar uma polimerização das frações, como sugerido por muitos autores, e cuja solubilidade é bastante diminuída podendo ser recuperada no resíduo. Os teores de gluteninas da M1 e M2 são 4,00 e 2,23 (Tabela 5.13), em base seca, respectivamente, enquanto que o resíduo analisado apresentou teores de proteínas que aumentaram de 3,80 para 5,90%, (Tabela 5.13), em base seca.

Outra comparação também pode ser feita com relação às mesmas etapas das massas nos pães diferentes. Pode-se observar que entre as massa M1 dos pães Zero e MTGase, já houve alteração. O pico que representa a massa molar de 90 KDa, é bem menor para o pão com enzima, e aquele de massa 80 KDa, praticamente não existe neste pão. O que também pode ser comprovado pelos dados da Tabela 5.13, onde os teores de gluteninas variaram de 5,0 para M1 do pão Zero e 4,0% para M1 do MTGase. E para as M2, as diferenças são maiores ainda, com redução mais evidente para o pico que representa 70 Kda. Os teores de gluteninas foram de 4,10% para o pão Zero e 2,23% para o pão MTGase (Tabela 5.13).

Khan e Bushuk (1979a) estudaram a influência das gluteninas na qualidade de panificação. As bandas formadas no SDS-PAGE, de pesos moleculares, variando de 13 e 35 KDa, foram consideradas como proteínas contaminantes de baixos pesos moleculares entre elas as albuminas, globulinas e gliadinas por apresentarem

mobilidades eletroforéticas similares. Para esses e muitos outros pesquisadores, foi assumido que a glutenina é uma molécula extremamente grande consistindo de subunidades de polipeptídeos unidas umas a outras por meio de ligações dissulfeto intermoleculares. E devido a esse tamanho, gluteninas que não sofreram redução poderiam não migrar através de gel de poliacrilamida a 5%.

Neste trabalho, foi usado gel de concentração a 6%, e também pode ser observado que em certas condições de análise, ocorreu uma alta concentração de proteínas na parte superior da eletroforese, o que pode ser interpretado, com base na informação do trabalho de Khan e Bushuk (1979a), como a não migração dos polímeros devido a seu alto peso molecular.

Larrè et al. (1993b) com as análises de SDS-PAGE dos produtos da reação total obtidos a várias concentrações de enzima e tempos de reação (2 e 18 horas) mostraram claramente que a polimerização ocorreu, e que a quantidade de produtos polimerizados estava relacionada com a quantidade de enzima usada e o tempo de reação. Além de ligações cruzadas, MTGase também pode catalisar a incorporação de aminas primárias ou deamidação. Nesse estudo, a incorporação de amina pode ser negligenciada porque assumiram que nenhum grupo amino reativo estava presente no glúten, exceto, aqueles das proteínas, significando que somente as ligações formadas seriam entre as proteínas do glúten.

A questão da deamidação como reação secundária da MTGase, pode ser levada em conta por causa da alta quantidade de glutamina no glúten. O nível de pH usado para as reações enzimáticas favorece a reatividade do ϵ -aminogruppo de lisina e não aquelas das moléculas da água fazendo essa reação secundária improvável. Essas

reações estão representadas nas Figuras 2.6, 2.7 e 2.8. Além disso, esta polimerização é acompanhada pela redução da solubilidade do glúten.

Com os resultados das análises cromatográficas e eletroforéticas deste trabalho mostrando mudanças nas frações protéicas das proteínas do trigo, e que essas alterações ocorreram principalmente nas subunidades de gluteninas de alto peso molecular, em acordo com a maioria dos trabalhos citados, pode-se constatar que os efeitos positivos macroscópicos encontrados para os parâmetros de qualidade do pão, como o volume específico e a textura, puderam ser correlacionados em níveis moleculares com o estudo do comportamento das frações de gliadinas e gluteninas. E ainda, estes resultados abrem caminho para uma série de questionamentos que podem ser estudados posteriormente, aumentando a possibilidade de inclusão da enzima como novo ingrediente na panificação, favorecendo assim o aumento de produção industrial com redução de custo e a viabilidade econômica do processo.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

1. As análises físicas (volume, dureza, firmeza, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade) indicaram que a transglutaminase tem efeito positivo no miolo, melhorando a qualidade do pão.
2. O uso da enzima permite reduzir as quantidades de emulsificantes e de ácido ascórbico na massa do pão de forma, o que compensaria o custo da enzima e constituiria uma alternativa de processo.
3. A concentração da enzima na massa deve ser controlada, já que em altas concentrações promove o endurecimento do miolo do pão.
4. As análises cromatográficas e eletroforéticas revelaram influência da enzima nas gluteninas, mas não nas gliadinas.
5. O descanso da massa reduziu a extratibilidade das gluteninas, sendo que nas massas contendo a enzima a redução foi mais pronunciada. Esse efeito contribuiria com o aumento da qualidade de panificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACC, APPROVED METHODS OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 10ª edição. Saint Paul: **American Association of Cereal Chemists**, 2000.

ASSOCIATION of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. Arlington: AOAC, 1995.

BIP (2007). Associação Brasileira de Panificação e Confeitaria. Disponível em: <http://www.abip.org.br>>. Acesso em 05/05/2007.

BITRIGO (2007). Associação Brasileira da Indústria de Trigo. Disponível em <http://www.abitrigo.com.br/historiadotrigo>>. Acesso em: 12/03/2007.

BITRIGO (2007a). Associação Brasileira da Indústria de Trigo. Disponível em <http://www.abitrigo.com.br/trigo/asp>>. Acesso em: 12/03/2007.

BITRIGO (2007b). Associação Brasileira da Indústria de Trigo. Disponível em <http://www.abitrigo.com.br/trigo/download.asp?cdnivel=108&nivel=1.2.2>. Acesso em: 0/03/2007.

JINOMOTO. Material Técnico. **TG for Fish Products**. AJINOMOTO USA, 1997.

ELLEN, W. G. Alternative oxidants as dough conditioners. **Cereal Foods World**, v. 44, p. 642-649, 1999.

MEILLE, V.; CASTELLO, P.; GARCIA, R.; RAKOTOZAFY, L.; POTUS, J.; NICOLAS, J. Influences de l'ajout de glucosa oxydase et de lipase sur l'évolution de la consistance et de la consommation d'oxygène de la pâte de farine de blé tendre au tours du pétrissage. **Sciences des Aliments**, v.20, p. 441-455, 2000.

ONDO, H., ADASHI, M., UMEDA, K., MATSUURA, A., NONAKA, M., UCHIO, R., ANAKA, H., MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from micro-organisms. **Agric. Biol. Chem.**, 53, p. 2613 – 2617, 1989.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico para o uso de Aditivos Alimentares para Produtos de Panificação e Biscoitos.** Resolução nº 383, 5 de agosto de 1999.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Uso do bromato de potássio na farinha e nos produtos de panificação.** Lei nº 10.273 , de 5 de setembro de 2001.

AUSSENAC, T.; CARCELLER, J.; KLEIBER, D. Changes in SDS solubility of glutenin polymers during dough mixing and resting. **Cereal Chemistry**, v. 78, nº 1. p. 39-45, 2001.

AUTIO, K.; LAURIKAINEN, T. Relationship between flour/ dough microstructure and dough handling and baking properties. **Trends in Food Science and Technology**, nº 8, p. 181-185, 1997.

AUTIO, K.; KRUUS, K.; KNAAPILA, A.; GERBER, N.; FLANDER, L.; BUCHERT, J. Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(4), p.1039-1045, 2005.

AUTIO, K.; FLANDER, L.; KINNUNEN, A.; HEINONEN, R. Bread quality relationship with rheological measurements of wheat flour dough. **Cereal Chemistry**, v. 78, nº 6. p. 654-657, 2001.

BABIKER, F. E.; KHAN, M. A. S.; MATSUDOMI, N.; KATO, A. Polymerization of soy protein digests by microbial transglutaminase for improvement of the functional properties. **Food Research International**, v. 29, nº7, p. 627-634, 1996.

BARNHAM, H. N. Jr.; JOHNSON, J. A. The influence of various sugars on dough and bread properties. **Cereal Chemistry**, v. 28, nº4, p.463-467, 1951.

BASMAN, A.; KÖKSEL, H.; PERRY, K. W. N. Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality of two wheat flours. **European Food Research and Technology**, 215, p. 419-424, 2002.

BAUER, N.; KOEHLER, P.; WIESER, H.; SCHIEBERLE, P. Studies on the effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. **Cereal Foods World**, v. 48, p. 351-357, 2003.

BERTRAN, G. L. Studies on crust color .I. The importance of the browning reaction in determining the crust color of bread. **Cereal Chemistry**, v. 30, n° 1, p.127-135, 1953.

BETTGE, A.D.; GIROUX, M. J.; MORRIS, C. F. Susceptibility of waxy starch granules to mechanical damage. **Cereal Chemistry**, v. 77, n° 6, p. 750-753, 2000.

BIETZ, J. A.; WALL, J. S. The effect of various extractants on subunit composition and associations of wheat glutenin. **Cereal Chemistry**, v. 52, n° 1, p. 124-129, 1975.

BIETZ, J. A. Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 255. p. 219-238, 1983.

BIETZ, J. A.; BURNOUF, T.; COBB, L. A.; WALL, J.S. Gliadin analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Optimization of extraction conditions. **Cereal Chemistry**, v. 61, n°1, p.124-129, 1984.

BIETZ, J. A. and BURNOUF, T. Chromosomal control of wheat gliadin: Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Theor. Appl. Genet.** 70:599-609, 1985.

BLOKSMA, A. H.; BUSHUK, W. Rheology and chemistry of dough. **Cereal Chemistry**, v. 65, n° 1, p.131-217, 1988.

BONET, A.; CABALLERO, P. A.; GÓMEZ, M.; ROSELL, C. M. Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect-damaged wheat. **Cereal Chemistry**, v. 82, n° 4, p. 425-430, 2005.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters; an introduction to design, data analysis, and model building**. New York, John Wiley, 1978.

BRANDT, L. **Emulsifiers in Baked Goods** – Applications, 1996. Disponível em <<http://www.foodproductdesign.com/archive/1996/0296AP.html>> Acesso 24/06/2005.

BRENNAN, J. G. Texture perception and measurement. In: PIGGOTT, J. R. **Sensory analysis of foods**. Massachusetts: Elsevier Science, 1988. p. 69 -101.

BROOKHART, P. P.; MAMAHON, P. L.; TAKAHASHI, M. Purification of guinea pig liver transglutaminase using phenylalanine-Sepharose 4B affinity column. **Anal. Biochem.**, 128, p. 202-205, 1983.

BURNOUF, T., BIETZ, J. A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of reduced glutenin, a disulphide-bonded protein of wheat endosperm. **J Chromatography**, 299: 185-199, 1984.

BUSHUK, W. Flour proteins: structure and functionality in dough and bread. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v. 30, n.7, p.447-451, 1985.

_____. Distribution of water in dough and bread. **Bakers Digest**, 40(5), p. 38-44, 1966.

BYERS, M.; MIFLIN, B.J.; SMITH, S. A quantitative comparison of the extraction of proteins fractions from wheat grain by different solvents and of the polypeptide and amino acid composition of the alcohol soluble protein. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 34, p. 447-462, 1983.

CABALLERO, P. A.; GOMEZ, M.; ROSELL, C. M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. **Journal of Food Engineering**, 81; p. 42-53, 2007.

CABALLERO, P. A.; BONET, A.; ROSELL, C. M.; GOMEZ, M. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and thermal properties of insect damaged wheat flour. **Journal of Cereal Science**, 42(1); p. 93-100, 2005.

CAPOCHI, A.; GALLESCHI, L.; SAVIOZZI, F. Isolation of wheat high molecular weight glutenin subunits from durum wheat. **Cereal Chemistry**, v. 77, N° 2, p. 105-106, 2000.

CAUVAIN, S. P; YOUNG, L.S. **Technology of breadmaking**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 354p.

CHAMBERLAIN, N.; COLLINS, T. H.; McDERMOTT, E. E. Alpha-amylase and bread properties. **Journal of Food Technology**, n° 16, p. 127-152, 1981.

CHIANG, S.; CHEN, C.; CHANG, C. Effect of wheat flour protein compositions on the quality of deep-fried gluten balls. **Food Chemistry**, 97, p. 666-673, 2006.

COLLAR, C.; ANDREU, P.; MARTÍNEZ, J. C.; ARMERO, E. Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: a response surface methodology study. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n° 6, p. 467-475, 1999.

COLLAR, C.; ARMERO, E. **Recent Research Developments in Nutrition**, 1, p. 115-143, 1996.

COLLAR, C.; BOLLAÍN, C. Impact of microbial transglutaminase on the viscoelastic profile of formulated bread doughs. **Eur. Food Res. Technol.** 218, p. 139-146, 2004.

CONNELLAN, J. M.; CHUNG, S. I.; WHETZEL, N. K.; BRADLEY, L. M.; FOLK, J. E. Structural properties of guinea pig liver transglutaminase. **The Journal of biological chemistry**, 246, p. 1093-1098, 1971.

CORNELL, H. J.; HOVELING, A. W. **Wheat Chemistry and Utilization**, Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1998: 426p.

CROWLEY, P.; GRAU, H.; ARENDT, E. K. Influence of additives and mixing time on crumb grain characteristics of wheat bread. **Cereal Chemistry**, v. 77, n° 3, p. 370-375, 2000.

DAHLE, K. L.; MONTGOMERY, E. P. A method for measuring strength and extensibility of bread crumb. **Cereal Chemistry**, v. 55, n° 2, p. 197-203, 1978.

DALLAGO, R. M.; NASCIMENTO FILHO, I.; ZANELLA, R.; MARONEZE, A. M. Determinação de bromato em melhoradores de farinha por cromatografia de troca iônica com detecção espectrofotométrica. **Química Nova**, v. 28, n° 4, p. 1-8, 2005.

EL-DASH, A. A. Standardized mixing and fermentation procedure for experimental baking test. **Cereal Chemistry**, v. 55, n° 4, p. 436-446, 1978.

EMPRAPI TRIGO (2007). Embrapa Trigo / Socioeconomia. Disponível em <http://www.cnpt.embrapa.br/noticias/2007/clippagem/clipp_01_2.pdf>. Acesso em: 20/03/2007.

EMPRAPA TRIGO (2007a). Embrapa Trigo / Socioeconomia. Disponível em <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>>. Acesso em: 20/03/2007.

FAERGEMAND, M.; QVIST, K. B. Transglutaminase: Effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. **Food Hydrocolloids**, v.11, n° 3, p. 287-292, 1997.

FAERGEMAND, E.M.; MURRAY, B. S.; DICKINSON, E.; QVIST, K. B. Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 343-346, 1999.

FALCONE, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. **J. Plant. Physiol.**; 142, p. 263-273, 1993.

FAO/OMS. World Health Organization (WHO). Evaluation of certain food additives and naturally occurring toxicants, **Tech. Report Series**, n° 828, p.29-30, 1992.

FDA (FOOD and DRUG ADMINISTRATION) Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov./label/html>>. Acesso em 23/03/2007.

FIDO, R. J.; BEKES, F.; GRAS, P. W.; TATHAM, A. S. Effects of α -, β -, γ -, ω -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. **Journal of Cereal Science**, 26: 271-277, 1997.

FOLK, J. E.; COLE, P. W. Structural requirements of specific substrates from guinea pig liver transglutaminase. **J. Biol. Chem.**, 241, p. 5518-5525, 1965.

FOLK, J. E.; COLE, P. W. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. **J. Biol. Chem.**, 240, p. 2951-2960, 1966.

FOLK, J. E. Transglutaminase. **Ann. Rev. Biochem.**, 49, p. 517-531, 1980.

FOLTRAN, A. L. M.; PINTO, A. A.; MELLO, F. M.; SÁ, T. F. Estudo da utilização da enzima transglutaminase na fabricação do requeijão. Escola de Engenharia Mauá, São

Caetano do Sul, Trabalho de Graduação da Escola de Engenharia Química e de Alimentos do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2001.

FRAZIER, P. J.; DANIELS, N. W. R.; RUSSEL EGGITT, P. W. Rheology and continuous breadmaking process. **Cereal Chemistry**, v. 52, n° 3, p. 106-130, 1975.

GARCIA, R.; RAKOTOZAFY, L.; TELEF, N.; POTUS, J.; NICOLAS, J. Oxidation of ferulic acid or arabinose-esterified ferulic acid by wheat germ peroxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3290-3298, 2002.

GERRARD, J. A.; FAYLE, S. E.; WILSON, A. J.; NEWBERRY, M. P.; ROSS, M.; KAVALE, S. Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 63, n° 3, p. 472-475, 1998.

GERRARD, J.A.; NEWBERRY, M.P.; ROSS, M.; WILSON, A.J.; FAYLE, S.E.; KAVALE, S. Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 65, n° 2, p. 312-314, 2000.

GERRARD, J. A.; FAYLE, S. E.; BROWN, P. A.; SUTTON, K. H.; SIMMONS, L.; RASIAH, I. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. **Journal of Food Science**, v. 66, n° 6, p. 782-786, 2001.

GERRARD, J. A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 389-397, 2003.

GIANNOU, V.; KESSOGLOU, V. and TZIA, C. Quality and safety of bread made from frozen dough. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 9 -108, 2003.

GIL, M. J.; CALLEJO, M. J.; RODRIGUEZ, G. Effect of water content and storage time on white pan bread quality: instrument evaluation. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 205, p. 268-273, 1997.

GRAY, J. A.; BEMILLER, J. N. Bread staling: molecular basis and control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p. 1-22, 2003.

GROSSOWICZ, N.; WAINFAN, E.; BOREK, E.; WZELSCH, H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **The Journal of Biological Chemistry**, 187, p. 111-125, 1950.

HOSENEY, R. C. **Principles of Cereal Science and Technology**, St. Paul, Minnesota. American Association of Cereal Chemists, Inc., 1992, 327p.

_____. Bread baking. **Cereal Foods World**, nº 39, p. 180-183, 1994.

HUEBNER, F. R.; BIETZ, J. A. Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 327, p. 333-342, 1985.

IAL - NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, V.1, São Paulo, 2005.

IBGE (2007). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php>. Acesso em: 20/03/2007.

IBGE (2007a). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia>>. Acesso em: 20/03/2007.

IBGE (2007b). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa022.00707.shtm>>. Acesso em: 20/03/2007.

JACKSON, E. A.; HOLT, L. M.; PAYNE, P. I. Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localization of their controlling genes. **Theor. Appl. Genet.**, v. 66, p: 29-37, 1983.

JACOBS, H.; DELCOUR, J. A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.8, p.2895-2905, 1998.

JOHANSSON, E.; PRIETO-LINDE, M. L.; JÖNSSON, J. Ö. Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. **Cereal Chemistry**, v. 78, n° 1, 19-25, 2001.

JOHNSON, J. A.; ROONEY, L.; SALEM, A. Chemistry of bread flavor. **Advan. Chem. Ser.** v.56, p. 153-160, 1966.

JUNQUA, M.; DURAN, R.; GANCET, C.; GOULAS, P. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 48, p. 730-734, 1997.

KANAJI, T., OZAKI, H., TAKAO, T., KAWAJIRI, H., IDE, H., MOTOKI, M., SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. Strain s-8112. **J. Biol. Chem.**, 268, 11565-11572, 1993.

KASHIWAGI, T.; YOKOYAMA, K.; ISHIKAWA, K. O.; EJIMA, D.; MATSUI, I.; SUZUKI, E. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **J. Biol Chem.**, v. 277, n°46, p. 44252-44260, 2002.

KAUFMAN, S. P.; HOSENEY, R. C.; FENNEMA, O. Dough reology – a review of structural models and the role disulfide interchange reactions. **Cereal Foods World**, v. 31, n° 11, p. 820-824, 1986.

KHAN, K.; BUSHUK, W. Studies of Glutenin. XII. Comparison by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. **Cereal Chemistry**, v. 56, n° 2, p. 63-68, 1979a.

KHAN, K.; BUSHUK, W. Studies of Glutenin. XIII. Gel filtration, isoelectric focusing, and amino acid composition studies. **Cereal Chemistry**, v. 56, n° 6, p. 505-512, 1979b.

KIEFFER, R.; WIESER, H.; HENDERSON, M. H.; GRAVELAND, A. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. **Journal of Cereal Science**, v. 27, n° 1, p. 53-60, 1998.

KIM, S.K.; D'APPOLONIA, B. L. Bread staling studies II. Effect of protein content and storage temperature on the role of starch. **Cereal Chemistry**, v. 54, n° 4, p. 216-219, 1977.

KÖKSEL, H.; SIVRI, D.; NG, P. K. W.; STEFFE, J. F. Effects of transglutaminase enzyme on fundamental rheological properties of sound and bug-damaged wheat flour doughs. **Cereal Chemistry**, v. 78, n°1, p. 26-30, 2001.

KROG, N. Theoretical aspects of surfactants in relation to their use in breadmaking. **Cereal Chemistry**, v. 58, n° 3, p.158-164, 1981.

KRUGER, J. E.; MARCHYLO, B. A.; HATCHER, D. Preliminary assessment of a sequential extraction scheme for evaluating quality by reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrophoretic analysis of gliadin and glutenins. **Cereal Chemistry**, v. 65, n°3, p. 208-214, 1988.

KULP, K. Pentosans of wheat endosperm. **Cereal Science Today**, v.13, n° 11, p. 414-417, 1968.

KULP, K.; LORENZ, K.; BRÜMMER, J. Frozen and refrigerated doughs and batters. **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (AACC)**, p. 63-148, 1995.

KURAISHI, C.; SAKAMOTO, J.; SOEDA, T. Application of transglutaminase for food processing. **Hydrocolloids**, 2, p. 281-285, 2000.

_____. Process for producing cheese using transglutaminase. **United States Patent n° 5.681.598**. October, 1997.

_____. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Review International**, 17, p. 221-246, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARRÉ, C.; CHIARELLO, M.; DUDEK, S.; CHENU, M. G.; GUEGUEN, J. Action of transglutaminase on the constitutive polypeptides of pea legumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1816-1820, 1993a.

LARRÉ, C.; KEDZIOR, Z. M.; CHENU, M. G.; VIROBEN, G.; GUEGUEN, J. Action of transglutaminase on an 11S seed protein (pea legumin): influence of the substrate conformation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.1121-1126, 1992.

LARRÉ, C.; CHIARELLO, M.; BLANLOEIL, Y.; CHENU, M. G.; GUEGUEN, J. Gliadin modifications catalyzed by guinea pig liver transglutaminase. **Journal of Food Chemistry**, 17, p.267-282, 1993b.

LARRÉ, C.; NICOLAS, Y.; DESSERME, C.; COURCOUX, P.; POPINEAU, Y. Preparative separation of high and low molecular weight subunits of glutenin from wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 25, p. 143-150, 1997.

LARRÉ, C.; DENERY-PAPINI, S.; POPINEAU, Y.; DESHAYES, G.; DESSERME, C.; LEFEBVRE, J. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 77, n° 1, p. 32-38, 2000.

LARSEN, N.G.; GREENWOOD, D. R. Water addition and the physical properties of mechanical dough development doughs and breads. **Journal of Cereal Science**, v. 13, p. 195-205, 1991.

LÁSTZTITY, R. Prediction of Wheat Quality – Success and Doubts. **Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.**, v. 46, n° 1-2, p. 39-49, 2002.

LAUBER, S.; HENLE, T.; KLOSTERMEYER, H. Relationship between crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yogurt. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 210, p. 305-309, 2000.

LEW, E. J. L.; KUZMICKY, D. D.; KASARDA, D. D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. **Cereal Chemistry**, v.69, n.5, p.508-515, 1992.

LILLARD, D. W.; SEIB, P. A.; HOSENEY, R. C. Isomeric ascorbic acids and derivatives of L-ascorbic acid: their effect on the flow of dough. **Cereal Chemistry**, v. 59, n4, p. 291-296, 1982.

LORENZEN, P. C.; SCHLIMNE, E. **Properties and potencial fields of application of transglutaminase preparations in dairing.** Bulletin of the IDF, 332, p. 47-59, 1998.

MACEDO, P.; MARRANO, C.; KEILLOR, J. W. A direct continuous spectrophotometric assay for transglutaminase activity. **Analytical Biochemistry**, 285, p. 16-20, 2000.

MacRITCHIE, F. Evaluation of contributions from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking. **Journal of Cereal Science**, 6, p. 259-268, 1987.

MacRITCHIE, F.; KASARDA, D. D.; KUZMICKY, D. D. Characterization of wheat protein fractions differing in contributions to breadmaking quality. **Cereal Chemistry**, v. 68, n° 1, p. 122-130, 1991.

MAPA (2003) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <[http:// www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br) >. Acesso em: 19/03/2007.

MARCHYLO, B. A.; KRUGER, J. E.; HATCHER, D. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of wheat storage proteins as a potential quality prediction tool. **Journal of Cereal Science**, v. 9, p. 179-194, 1989.

MARSH, D. Mixing and dough processing In CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Technology of Breadmaking**, London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 81-119.

MASCI, S. LAFIANDRA, D.; PORCEDDU, E.; LEW, E. J. L.; TAO, H. P. KASARDA, D. D. D-glutenin subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. **Cereal Chemistry**, v.70, n° 5, p.581-585, 1993.

MATHEIS, G.; WHITAKER, J. R. A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. **J. Food Biochem.**, 11, p. 309-327, 1987.

MEIYING, Z.; GUOCHENG, D.; JIAN, C. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, p. 477-481, 2002.

MILLER, K. A.; HOSENEY, R. C. Effect of oxidation on the dynamic rheological properties of wheat flour–water doughs. **Cereal Chemistry**, v. 76, n° 2, p. 100-104, 1999.

MOORE, M. M.; HEINBOCKEL, M.; DOCKERY, P.; ULMER, H. M.; ARENDT, E. K. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 83, n°1, p. 28-36, 2006.

MOTOKI, M.; NIO, N.; TAKINAMI, K. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. **Agric. Biol. Chem.**, 36, p. 1257-1261, 1984.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use in food processing. **Trends Food Sci. Technol.**, 9, p. 204-210, 1998.

NAES, T.; BJERKE, F.; FAERGESTAD, E. M. A comparison of design and analysis techniques for mixtures. **Food Quality and Preference**, v.10, n° 3, p. 209-217, 1999.

NAKAMURA, M; KURATA, T. Effects of L-ascorbic acid on the reological properties of wheat flour dough. **Cereal Chemistry**, v.74, n.5, p.647-650, 1997.

NICOLAS, Y.; MARTINANT, J. P.; DENERY-PAPINI, S. and POPINEAU, Y. Analysis of wheat storage proteins by exhaustive sequential extraction followed by RP-HPLC and nitrogen determination. **Journal of Science Food Agriculture**, 77, p. 96-102, 1998.

NONAKA, M.; MATSUURA, Y.; NAKANO, K.; MOTOKI, M. Improvement of the pH-solubility profile of sodium caseinate by using Ca^{+2} -independent microbial transglutaminase with gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 347-349, 1997.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSUURA, A. Polymerization of cereal proteins by Ca^{+2} -Independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, n° 10, p. 2619-2623, 1989.

OLIVEIRA, L. L. de. **Utilização da Transglutaminase na Fabricação de Queijos Frescos Empregando Diferentes Processos de Coagulação**. 190 f. Tese de Doutorado da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003.

OSBORNE, T. B. **The proteins of the wheat kernel**. Publication of the Carnegie Institution Washington, 84 Judd and Detawailer, Washington, USA, 1907.

PATERAS, I. M. C. Bread spoilage and staling. IN CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Technology of Breadmaking**, London: Blackie Academic & Professional, 1998, p. 240-261.

PAYNE, P. I.; NIGHTINGALE, M. A.; KRATTIGER, A. F.; HOLT, L. M. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality in British-grown wheat varieties. **Journal Science Food Agriculture**, 40: 51-65, 1987.

PAYNE, P. I.; CORFIELD, K. G. Subunit composition of wheat glutenin proteins isolated by gel filtration in dissociating medium. **Planta**, 145, p. 83-88, 1979.

PENFIELD, M. P.; CAMPBELL, A. M. **Experimental Food Science**, San Diego: Academic Press, 1990. 541 p.

POLIZEL, T. S. **Determinação das condições ótimas de processo na fabricação de pão de forma**. Trabalho de Iniciação Científica - Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, 2004.

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

QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnologia de la panificación**. Zaragoza: Acribia, 1991, 485p.

RAO, G. V.; RAO, P. H. Methods for determining rheological characteristics of doughs: a critical evaluation. **Journal of Food Science Technology**, v.30, n° 2, p.77-87, 1993.

RASIAH, I. A.; SUTTON, K. H.; LOW, F. L.; LIN, H. M.; GERRARD, J. A. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. **Food Chemistry**, 89, p. 325-332, 2005.

ROSELL, C. M.; WANG, J.; AJA, S.; BEAN, S.; LOOKHART, G. Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. **Cereal Chemistry**, v. 80, n° 1, p.52-55, 2003.

SABLANI, S. S.; BAIK, O.; MARCOTTE, M. Neural networks for predicting thermal conductivity of bakery products. **Journal of Food Engineering**, v.52, p. 299-304, 2002.

SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y., MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, 59, n°4: 866-871, 1994.

SCHEEREN, P. L.; MIRANDA, M. Z. Trigo brasileiro tem nova classificação: novos critérios adotados a partir da safra de 1999. Embrapa Trigo, **Comunicado Interno**, n° 18, dez.1999.

SCHILLER, G.W. Bakery flour specifications. **Cereal Foods World**, v.29, n° 10, p. 647-651, 1984.

SCHROEDER, L. F. **Farinhas Mistas. Trigo e Soja**, Porto Alegre, n 92, p. 4-6, 1987.

SEGURO, K.; KUMAZAWA, Y.; KURAISHI, C.; SAKAMOTO, I.I.; MOTOKI, M. The ϵ -(γ -glutamyl) lysine moiety in crosslinked casein is available source of lysine for rats. **Journal of Nutrition**, 126, p. 2557-2562, 1996.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos**. São Paulo, Livraria Varela, 1996, p. 184-192.

SHELTON, D. R.; D'APPOLONIA, B. L. Carbohydrate functionality in the baking process. **Cereal Foods World**, v. 30, n° 7, p. 437-442, 1985.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; TATHAM, A. S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. **Journal of Cereal Science**, 15, p. 105-120, 1992.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Dissulphide bonds in wheat gluten proteins. **Journal of Cereal Science**, 25, p. 207-227, 1997.

SHUKLA, T. P. Chemistry of dough development. **Cereal Foods World**, v. 46, n° 7, p. 337-339, 2001.

SINGH, N. K.; DONOVAN, I. L.B.; MacRITCHIE, F. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour protein. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. **Cereal Chemistry**, v. 67, n° 2, p.150-161, 1990.

SINGH, H. Modification of food proteins by covalent crosslinking. **Trends Food Sci Technol.**, n° 2, p. 196-200, 1991.

SMS, STABLE MICRO SYSTEMS. Extensibility of dough and measure of gluten quality (TA-XT2 application study REF: DOU/KIE), 1995.

SOARES, L. H. B.; ASSMANN, F.; AYUB, M. A. Z. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 37, p. 295-299, 2003

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making, Review. **Food Chemistry**, v. 52, n° 4, p. 353-360, 1995.

STAUFFER, C. E. Principles of dough formation. In CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Technology of Breadmaking**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 262-295.

STEAR, C. A. **Handbook of Breadmaking Technology**, London: Elsevier Applied Science, 1990, p. 467-478.

SUTTON, K. H.; HAY, R. L.; MOUAT, C. H.; GRIFFIN, W. B. The influence of environment, milling and blending on assessment of the potential breadmaking quality of wheat by RP-HPLC of glutenins subunits. **Journal of Cereal Science**, v. 12, p. 145-153, 1990.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, S.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 64, p. 2344-2351, 2000.

SZCZESNIAK, A. S. Applying rheology to dough and baked goods. **Cereal Foods World**, 33:841-843, 1988.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v.13, n.4, p. 215-225, 2002.

TANIMOTO, S. Y.; KINSELLA, J. E. Enzymatic modification of proteins: Effects of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β -lactoglobulin. **J. Agric. Food Chem.**, 36, p. 281-285, 1988.

TIPPLES, K. H.; PRESTON, K. R.; KILBORN, R. H. Implications of the term "strength" as related to wheat and flour quality. **Bakers Digest**, p. 16-20, 1982.

TOUFEILI, I.; DAGHER, S.; SHADAREVIAN, S.; NOUREDOLINE, A.; SARAKBI, M.; FARRAN, M. T. **Cereal Chemistry**, 71, p.594-601, 1994

TRUONG, V. D.; CLARE, D. A.; CATIGNANI, G. L.; SWZISGOOD, H. E. Cross-liking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1170-1176, 2004.

UTHAYAKUMARAN, S.; GRAS, P.; STODDARD, F. L.; BEKES, F. Effect of varying protein content and glutenin-to-gliadin ratio on the functional properties of wheat dough. **Cereal Chemistry**, v.76, n° 4, p. 389-394, 1999.

UTHAYAKUMARAN, S.; NEWBERRY, M.; KEENTOK, M.; STODDARD, F. L.; BEKES, F. Basic rheology of bread dough with modified protein content and glutenin-to-gliadin ratios. **Cereal Chemistry**, v. 77, n° 6, p. 744-749, 2000.

UTHAYAKUMARAN, S.;TÖMÖSKÖZI, S.; TATHAM, A. S.; SAVAGE, A. W. J.; GIANIBELLI, M. C.; STODDARD, F. L.; BEKES, F.Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. **Cereal Chemistry**, v. 78, n° 2, p. 138-141, 2001.

Van LONKHUIJSEN, H. J.; HAMER, R. J.; SCHREUDER, C. Influence of specific gliadins on the breadmaking quality of wheat. **Cereal Chemistry**, v. 69, n° 2, p. 174-177, 1992.

VEMULAPALLI, V.; MILLER, K. A.; HOSENEY, R. C. Glucose oxidase in breadmaking systems. **Cereal Chemistry**, v. 75, n° 4, p. 439-442, 1998.

VERAVERBEKE, W. S.; LARROQUE, O. R.; BÉKÉS, F.; DELCOUR, J. A. *In vitro* polymerization of wheat glutenin subunits with inorganic oxidizing agents. I. Comparison

of single-step and stepwise oxidations of high molecular weight glutenin subunits. **Cereal Chemistry**, v. 77, n° 5, p. 582-588, 2000a.

VERAVERBEKE, W. S.; LARROQUE, O. R.; BÉKÉS, F.; DELCOUR, J. A. *In vitro* polymerization of wheat glutenin subunits with inorganic oxidizing agents. II. Stepwise oxidation of low molecular weight glutenin subunits and a mixture of high and low molecular weight glutenin subunits. **Cereal Chemistry**, v. 77, n° 5, p. 589-594, 2000b.

WEEGELS, P. L.; MARSEILLE, J. P.; BOSVELD, P.; HAMER, R. J. Large scale separation of gliadins and their bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, 20, p. 253-264, 1994.

WEEGELS, P. L.; HAMER, R. J.; SCHOFIELD, J. D. Critical review. Functional properties of wheat glutenin. **Journal of Cereal Science**, 23, p. 1-18, 1996.

WIESER, H.; ANTES, S.; SEILMEIER, W. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Cereal Chemistry**, v. 75, n° 5, p. 644-650, 1998.

WIESER, H.; SEILMEIER, W.; BELITZ, H. D. Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. **J. Cereal Sci.**, V. 19, p. 149-155, 1994.

YAHATA, E.; MARUYAMA-FUNATSUKI, W.; NISHIO, Z.; YAMAMOTO, Y.; HANAOKA, A.; SUGIYAMA, H.; TANIDA, M.; SARUYAMA, H. Relationship between the dough quality and content of specific glutenin proteins in wheat mill streams, and its application to making flour suitable for instant Chinese noodles. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 70 (4), p. 788-797, 2006.

YASUEDA, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from Red Sea bream (*Pagrus major*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 58, p. 2041-2045, 1994.

YLIMAKI, G.; HAWRYSH, Z. J.; HARDIN, R. T.; THOMSON, A. B. R. Response surface methodology in the development of rice flour yeast breads: sensory evaluation. **Journal of Food Science**, v. 56, n° 3, p.751-757, 1991.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 64, p. 447-454, 2004.

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

ZHU, Y; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase- a Review of its production and application to food processing. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 44, p. 277-282, 1995.

ZHU, Y; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: Analysis of amino acid metabolism using mass balances. **Enzyme and Microbial Technology**, 23, p. 216-226, 1998a.

ZHU, Y; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BRUIN, E.; BOL, J. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 49, p. 251-257, 1998b.

ANEXO I

Tabela I.1 - Formulação do pão Controle, do pão Zero e do pão MTGase.

Ingredientes	(%) sobre a farinha		
	pão Controle	pão Zero	pão MTGase
Farinha de trigo	100	100	100
Água ⁽¹⁾	54	54	54
Fermento	1	1	1
Sal	2	2	2
Açúcar	4	4	4
Gordura	4,5	4,5	4,5
α -amilase ⁽²⁾	0,0025	0,0025	0,0025
Ácido ascórbico ⁽³⁾	0,0140	-	-
Emulsificante ⁽⁴⁾	0,4	-	-
Enzima MTG	-	-	1,0
Total	165,9	165,5	166,5

pão Zero: sem aditivos; pão Controle: segundo recomendação do fabricante.

- 1- Porcentagem definida pelo grau de absorção da farinha de trigo, método AACC 54-21, 1995);
- 2- Enzima α -amilase (25 ppm, definida pela medida do "Falling Number" fornecida pelo moinho);
- 3- Ácido ascórbico P.A – limite máximo fornecido pelo fabricante.
- 4- Emulsificante (DATEM) – limite máximo fornecido pelo fabricante.

Tabela I.2 – Condições de processo da fabricação do pão de forma.

Variáveis	pão Zero	pão Controle	pão MTGase
Tempo de batimento (min)	18	18	14
Tempo de descanso (min)	15	15	15
Tempo de fermentação (min)	150	150	150
Tempo de assamento (min)	40	40	40
Temperatura da farinha (°C)	5	4	4
Temperatura da água adicionada (°C)	3	3	2
Temperatura da massa (°C)	23	24	23
Temperatura da estufa (°C)	35	35	35
Temperatura do forno (°C)	140	140	140

ANEXO II

1 – Firmeza

Com os parâmetros do modelo codificado já excluídos, ($p > 0,05$), e a regressão ajustada com os dados da Tabela 5.8, obteve-se o modelo equacional codificado, mostrado na equação apresentada na Tabela 5.9.

Foram eliminados os seguintes fatores: as interações AA, CC, AB, AC e BC, pois os efeitos nestes pontos não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Para obter a amplitude do modelo acima, realizou-se a análise de variância da regressão através da ANOVA (Tabela II.1).

Tabela II.1 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a firmeza.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média dos desvios quadráticos	Razão F	Valor de P
Regressão	4	6,49400	6,49400	17,06	0,000
Erro Residual	12	1,14179	1,14179		
Falta de Ajuste	10	1,12213	1,12213	11,42	0,083
Erro Puro	2	0,01966	0,01966		
Total	16	7,63579			

Com a tabela acima, é possível obter a amplitude do modelo, como descrito abaixo:

$$R^2 = SQ_{\text{regressão}} / SQ_{\text{Total}} \quad \therefore \quad R^2 = 0,85$$

A relação entre os valores de firmeza previstos pelo modelo na equação (Tabela 5.9) em função dos valores observados está representada na Figura II.1.

Figura II.1 Relação entre os valores de firmeza previstos pelo modelo (Tabela 5.8) em função dos valores observados.

ANEXO III

1- Firmeza

Através dos valores de R e F e do gráfico obtido com os pontos próximos da reta, pode-se dizer que o modelo codificado é satisfatório.

Como a regressão é significativa ($p < 0,05$) e a falta de ajuste não é significativa ($p > 0,05$) ao nível de 5% de significância pode-se representar o modelo graficamente em superfície de resposta. O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura III.1.

Figura III.1 Superfície de resposta, para a firmeza, em função das concentrações de emulsificante(A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

Avaliando as figuras de superfície de resposta para a firmeza, têm-se que:

- 1- para a primeira figura onde mantém-se as concentrações de enzima no ponto central (0,6%), aumentando-se a concentração de emulsificante e do ácido ascórbico ocorre diminuição da firmeza;
- 2- para a segunda figura onde mantém-se as concentrações de ácido ascórbico no ponto central (70 ppm), aumentando-se a concentração do emulsificante e da enzima ocorre aumento da firmeza.
- 3- para a terceira figura onde mantém-se as concentrações de emulsificante no ponto central (0,2%), aumentando-se a concentração de enzima ocorre aumento da firmeza.

ANEXO IV

1 - Firmeza

O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura IV.1.

Figura IV.1 Contornos da resposta para a firmeza, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

ANEXO V

2 – Elasticidade

Com os parâmetros do modelo codificado já excluídos, ($p > 0,05$), e a regressão modelada com os dados da Tabela 5.8, obteve-se o modelo de regressão codificado, mostrado na equação apresentada na Tabela 5.9.

Foram eliminados os seguintes fatores: as interações AA, BB, CC, AB, AC e BC, pois os efeitos nestes pontos não foram estatisticamente significativos.

A fim de obter a amplitude do modelo acima, realizou-se a análise de variância da regressão através da ANOVA (Tabela V.1).

Tabela V.1 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a elasticidade.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média dos desvios quadráticos	Razão F	Valor de P
Regressão	3	0,00001076	0,00001076	17,76	0,000
Erro Residual	13	0,00000263	0,00000263		
Falta de Ajuste	11	0,00000247	0,00000247	2,97	0,278
Erro Puro	2	0,00000015	0,00000015		
Total	16	0,00001339			

Com a tabela acima, é possível obter a amplitude do modelo, como descrito abaixo:

$$R^2 = \text{SQ}_{\text{regressão}} / \text{SQ}_{\text{Total}} \quad \therefore \quad R^2 = 0,80 \quad \therefore \quad R = 0,90$$

A relação entre os valores de elasticidade previstos pelo modelo na equação (Tabela 5.8) em função dos valores observados está representada na Figura V.1.

Figura V.1 Relação entre os valores de elasticidade previstos pelo modelo (Tabela 5.8) em função dos valores observados.

ANEXO VI

2- Elasticidade

Através dos valores de R e F e do gráfico obtido (pontos próximos da reta) pode-se dizer que o modelo codificado é satisfatório.

Como a regressão é significativa ($p < 0,05$) e a falta de ajuste não é significativa ($p > 0,05$) ao nível de 5% de significância pode-se representar o modelo graficamente em superfície de resposta. O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura VI.1.

Figura VI.1 Superfície de resposta, para a elasticidade, em função das concentrações de emulsificante(A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

Avaliando as figuras de superfície de resposta para a elasticidade, têm-se que:

- 1- para a primeira figura onde mantém-se as concentrações de enzima no ponto central (0,6%), aumentando-se a concentração de ácido ascórbico ocorre aumento da elasticidade, enquanto que para emulsificante não se observa variação importante;
- 2- para a segunda figura onde mantém-se as concentrações de ácido ascórbico no ponto central (70 ppm), aumentando-se a concentração da enzima ocorre aumento da elasticidade, enquanto que para emulsificante não se observa variação importante;
- 3- para a terceira figura onde mantém-se as concentrações de emulsificante no ponto central (0,2%), aumentando-se a concentração de enzima e ácido ascórbico ocorre aumento da elasticidade.

ANEXO VII**2- Elasticidade**

O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura VII.1.

Figura VII.1 Contornos da resposta para a elasticidade, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

ANEXO VIII

3 – Mastigabilidade

Com os parâmetros do modelo codificado já excluídos, ($p > 0,05$), e a regressão realizada com os dados da Tabela 5.8, obteve-se o modelo equacional codificado, mostrado na equação apresentada na Tabela 5.9.

Foram eliminados os seguintes fatores: as interações AA, CC, AB, AC e BC, pois os efeitos nestes pontos não foram estatisticamente significativos.

Com o objetivo de se obter a amplitude do modelo acima, realizou-se a análise de variância da regressão através da ANOVA (Tabela VIII.1).

Tabela VIII.1 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a mastigabilidade.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média dos desvios quadráticos	Razão F	Valor de P
Regressão	4	16,0719	16,0719	18,11	0,000
Erro Residual	12	2,6629	2,6629		
Falta de Ajuste	10	2,5814	2,5814	6,34	0,144
Erro Puro	2	0,0815	0,0815		
Total	16	18,7347			

Com a tabela acima, é possível obter a amplitude do modelo, como descrito abaixo:

$$R^2 = SQ_{\text{regressão}} / SQ_{\text{Total}}$$

$$R^2 = 0,86$$

$$R = 0,93$$

A relação entre os valores de mastigabilidade previstos pelo modelo na equação (Tabela 5.9) em função dos valores observados está representada na Figura VIII.1.

Figura VIII.1 Relação entre os valores de mastigabilidade previstos pelo modelo (Tabela 5.8) em função dos valores observados.

ANEXO IX

3 - Mastigabilidade

Através dos valores de R e F e do gráfico obtido (pontos próximos da reta) pode-se dizer que o modelo codificado é satisfatório.

Como a regressão é significativa ($p < 0,05$) e a falta de ajuste não é significativa ($p > 0,05$) ao nível de 5% de significância pode-se representar o modelo graficamente em superfície de resposta. O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura IX.1.

Figura IX.1 Superfície de resposta, para a mastigabilidade, em função das concentrações de emulsificante(A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

Avaliando as figuras de superfície de resposta para a mastigabilidade, têm-se que:

- 1- para a primeira figura onde mantém-se as concentrações de enzima no ponto central (0,6%), aumentando-se a concentração de emulsificante ocorre diminuição da mastigabilidade, enquanto que para ácido ascórbico não se observa variação importante;
- 2- para a segunda figura onde mantém-se as concentrações de ácido ascórbico no ponto central (70 ppm), aumentando-se a concentração da enzima ocorre aumento da mastigabilidade, enquanto que para o emulsificante ocorre diminuição;
- 3- para a terceira figura onde mantém-se as concentrações de emulsificante no ponto central (0,2%), aumentando-se a concentração de enzima ocorre aumento da mastigabilidade, enquanto que para o ácido ascórbico ocorre aumento pouco expressivo para a mastigabilidade.

ANEXO X

3 – Mastigabilidade

O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura X.1.

Figura X.1 Contornos da resposta para a mastigabilidade, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

ANEXO XI

4 – Gomosidade

Com os parâmetros do modelo codificado já excluídos, ($p > 0,05$), e a regressão realizada com os dados da Tabela 5.8, obteve-se o modelo de regressão codificado, mostrado na equação apresentada na Tabela 5.9.

Foram eliminados os seguintes fatores: as interações AA, CC, AB, AC e BC, pois os efeitos nestes pontos não foram estatisticamente significativos.

A fim de obter a amplitude do modelo acima, realizou-se a análise de variância da regressão através da ANOVA (Tabela XI.1).

TABELA XI.1 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo codificado para a gomosidade.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média dos desvios quadráticos	Razão F	Valor de P
Regressão	4	154096	154096	16,40	0,000
Erro Residual	12	28137	28137		
Falta de Ajuste	10	27472	27472	8,26	0,113
Erro Puro	2	665	665		
Total	16	182233			

Com a tabela acima, é possível obter a amplitude do modelo, como descrito abaixo:

$$R^2 = SQ_{\text{regressão}} / SQ_{\text{Total}} \quad R^2 = 0,84 \quad R = 0,92$$

A relação entre os valores de gomosidade previstos pelo modelo na equação (Tabela 5.8) em função dos valores observados está representada na Figura XI.1.

FIGURA XI.1 RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE GOMOSIDADE PREVISTOS PELO MODELO (TABELA 5.8) EM FUNÇÃO DOS VALORES OBSERVADOS.

ANEXO XII

4 - Gomosidade

Através dos valores de R e F e do gráfico obtido (pontos próximos da reta) pode-se dizer que o modelo codificado é satisfatório.

Como a regressão é significativa ($p < 0,05$) e a falta de ajuste não é significativa ($p > 0,05$) ao nível de 5% de significância pode-se representar o modelo graficamente em superfície de resposta. O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura XII.1.

Figura XII.1: Superfície de resposta, para a gomosidade, em função das concentrações de emulsificante(A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).

Avaliando as figuras de superfície de resposta para a gomosidade, têm-se que:

- 1- para a primeira figura onde mantém-se as concentrações de enzima no ponto central (0,6%), aumentando-se a concentração de emulsificante ocorre diminuição da gomosidade, enquanto que para ácido ascórbico não se observa variação importante;
- 2- para a segunda figura onde mantém-se as concentrações de ácido ascórbico no ponto central (70 ppm), aumentando-se a concentração da enzima ocorre aumento da gomosidade, enquanto que para variações nas concentrações de emulsificante, a variação na gomosidade é pouca expressiva;
- 3- para a terceira figura onde mantém-se as concentrações de emulsificante no ponto central (0,2%), aumentando-se a concentração de enzima ocorre aumento da gomosidade, enquanto que para o ácido ascórbico ocorre aumento pouco expressivo para a gomosidade.

ANEXO XIII

4 – Gomosidade

O modelo da equação (Tabela 5.9) é representado na Figura XIII.1.

Figura XIII.1: Contornos da resposta para a gomosidade, comparando a interação entre os termos emulsificante (A), ácido ascórbico (B) e transglutaminase (C).