

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

César Dias Ebling

**INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS AMILOGLICOSIDASE, GLICOSE OXIDASE E
TRANSGLUTAMINASE NA FORMULAÇÃO DE PÃO SEM GLÚTEN**

Porto Alegre
2019

César Dias Ebling

**INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS AMILOGLICOSIDASE, GLICOSE OXIDASE E
TRANSGLUTAMINASE NA FORMULAÇÃO DE PÃO SEM GLÚTEN**

Trabalho de Conclusão do Curso de
Tecnologia em Alimentos, do
Departamento de Nutrição da Federal
de Ciências da Saúde de Porto Alegre,
como requisito parcial para a obtenção
de grau de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Manuela Poletto Klein

Coorientadora: Roberta Cruz Silveira
Thys

Porto Alegre

2019

César Dias Ebling

**INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS AMILOGlicosidase, Glicose Oxidase e
Transglutaminase na formulação de pão sem glúten**

Aprovado em: 21/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Adriana Seixas

Doutora em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Poliana Deyse Gurak

Doutora em Ciências de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

CONCEITO FINAL: _____

RESUMO

O mercado consumidor de produtos sem glúten está crescendo. Porém, há uma dificuldade tecnológica quando se trata de pães sem glúten, pois esses produtos são pobres sensorialmente e não possuem qualidades de cor e textura desejáveis. Estudos com aplicações de enzimas em formulações de pão sem uso de farinha de trigo têm relatado melhorias nesses quesitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito isolado das enzimas amiloglicosidase (AG), glicose oxidase (GO) e transglutaminase (TG) em uma formulação completa de pão sem glúten através das análises de volume específico, de percentual de perda de massa, de altura média da fatia central, de textura em texturômetro e de estrutura do miolo pelo *software* ImageJ. Quando aplicadas na metade da concentração mínima indicada pelo fabricante, as enzimas glicose oxidase e transglutaminase proporcionaram menores valores de perda de massa e a enzima amiloglicosidase resultou em um pão com volume específico quase 3 vezes maior que a amostra controle. A transglutaminase na concentração máxima indicada pelo fabricante diminuiu 73% da mastigabilidade do pão e o uso desta enzima, no geral, resultou em pães com os menores valores de percentual de poros > 5 mm na estrutura do miolo. Não houve efeito significativo na altura média da fatia central das amostras com adição das enzimas. Coincidindo com os objetivos do trabalho, os pães com adição dessas enzimas apresentaram melhorias em termos de textura do miolo nos parâmetros de firmeza e mastigabilidade, bem como aumento do volume específico e porosidade das amostras.

Palavras-chave: Pão sem glúten. Enzimas. Amiloglicosidase. Glicose oxidase. Transglutaminase.

ABSTRACT

The consumer market for gluten free products is growing. However, there is a technological difficulty when it comes to gluten-free breads, as these products are sensorially poor and lack desirable color and texture qualities. Studies on enzyme applications in wheat flour-free bread formulations have reported improvements in this regard. The objective of this work was to evaluate the isolated effect of the enzymes amyloglycosidase (AG), glucose oxidase (GO) and transglutaminase (TG) in a complete gluten-free bread formulation through the analysis of specific volume, weight loss percentage, height middle slice, texturometer texture and crumb structure by ImageJ software. When applied at half the minimum concentration indicated by the manufacturer, the enzymes glucose oxidase and transglutaminase provided lower mass loss values and the enzyme amyloglycosidase resulted in a bread with a specific volume almost 3 times larger than the control sample. Transglutaminase at the maximum concentration indicated by the manufacturer decreased 73% of bread chewability and the use of this enzyme, in general, resulted in breads with the lowest pore > 5 mm percentage values in the crumb structure. There was no significant effect on the central slice average height of the samples with addition of enzymes. Coinciding with the objectives of the work, the breads with the addition of these enzymes showed improvements in crumb texture in firmness and chewability parameters, as well as increase in specific volume and porosity of the samples.

Keywords: Gluten free bread. Enzymes. Amyloglycosidase. Glucose oxidase. Transglutaminase.

1 INTRODUÇÃO

Independentemente de ser celíaco, alérgico às proteínas do trigo, sensível ao glúten, ou nenhuma dessas classificações, o público consumidor de produtos sem glúten está crescendo e há perspectiva de que esse nicho de mercado cresça em 32% até 2020 (ASSERJ, 2017). Geralmente, pães sem glúten são pobres em cor e textura e a massa não possui as propriedades viscoelásticas desejáveis (NGEMAKWE e colab., 2015), entretanto, estudos com aplicações de enzimas em formulações de pães sem uso de farinha de trigo têm relatado melhorias nesses parâmetros (DŁUZEWSKA e colab., 2015; SCARNATO e colab., 2016; PALABIYIK e colab., 2016).

No que tange ao mercado de produtos sem glúten, algumas pesquisas mostram uma crescente ascensão do consumo destes itens por parte dos consumidores. Um levantamento realizado pelo IBOPE (2017) mostrou que 18% dos consumidores procuram por informações sobre advertências relacionadas à saúde nos rótulos dos alimentos (*diet*, *light*, sem colesterol, gorduras *trans*, sem lactose, contém glúten, etc.). Méndez e Euphrasio (2017) verificaram que apenas 3% dos consumidores não comem pão de farinha de trigo por serem intolerantes ao trigo ou ao glúten, enquanto cerca de 11% dos consumidores de pão ou produtos de panificação comeriam mais esses produtos se existissem mais variedades sem glúten. Ainda, neste levantamento, foi constatado que 30% dos adultos brasileiros gostariam de ter disponíveis uma maior variedade de produtos “saudáveis”, não somente *light* ou orgânicos, mas também sem glúten, sem lactose e com colágeno.

Em paralelo, há uma dificuldade tecnológica quando se trata do desenvolvimento desses alimentos, visto que o glúten é responsável pelas propriedades viscoelásticas da massa de farinha de trigo (RENZETTI e colab., 2010) e é importante para a retenção do gás carbônico resultante da fermentação, assegurando o aumento do volume do produto final (GAN e colab., 1989). Dessa forma, pães sem glúten podem resultar em uma massa fraca ou com menor volume e pouco desenvolvida, além de outros defeitos de qualidade como cor e textura indesejáveis (PALABIYIK e colab., 2016). Na tentativa de substituir a farinha de trigo em formulações de pães, farinhas livres de glúten

como as de aveia, arroz e sorgo, são utilizadas combinadas com outros ingredientes, como ovos, hidrocoloides e enzimas (NGEMAKWE e colab., 2015).

Segundo Gujral & Rosell (2004), oxidantes químicos estão sendo substituídos pelas enzimas em diferentes aplicações do ramo alimentício. Na panificação, isso é vantajoso já que na etapa de forneamento as enzimas são desnaturadas pelo calor, sendo caracterizadas não como aditivos e sim como coadjuvantes de tecnologia (ANVISA, 2014). Nesse sentido, além de oferecerem melhorias tecnológicas, as enzimas não precisam ser declaradas nos rótulos, oferecendo a esses produtos uma rotulagem mais compreensível. Com isso, os produtos de panificação fabricados com o uso de tecnologia enzimática acabam sendo inseridos no universo dos produtos relacionados à tendência de saudabilidade e bem-estar, que agregam valor aos consumidores, uma vez que remete a uma alimentação mais saudável e nutritiva e também fazem jus à tendência de sustentabilidade e ética, que sugere a utilização de ingredientes e aditivos sustentáveis no âmbito social, ambiental e econômico (“BRASIL FOOD TRENDS 2020”, 2010).

Há poucos estudos que exploram a aplicação de enzimas na formulação de pães sem glúten e a maioria faz o uso delas em uma formulação básica de farinha e água. O objetivo do trabalho, portanto, foi avaliar o efeito, em termos de volume e textura, da adição de enzimas em uma formulação completa de pão sem glúten à base de amido de milho, farinha de arroz e farinha de trigo sarraceno a partir da análise dos efeitos isolados das enzimas amiloglicosidase (AG), glicose oxidase (GO) e transglutaminase (TG).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os impactos da adição de enzimas em uma formulação de pão sem glúten a fim de melhorar as propriedades de volume e textura desse produto, e oferecer novas possibilidades para o desenvolvimento de pães sem glúten de maior qualidade no mercado, em termos de volume e textura.

1.1.2 Objetivos específicos

O trabalho apresenta como objetivos específicos:

- Aplicar e avaliar os efeitos isolados das enzimas amiloglicosidase, glicose oxidase e transglutaminase em formulação de pão sem glúten;
- Avaliar os efeitos das enzimas em termos de volume específico, percentual de perda de massa e altura média da fatia central;
- Estudar os efeitos da aplicação das enzimas em termos de textura através dos parâmetros de firmeza do miolo, mastigabilidade, elasticidade relativa e coesividade;
- Analisar o impacto das enzimas na estrutura do miolo dos pães através de análise de imagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GLÚTEN

O glúten é a principal proteína de armazenamento do trigo e é constituído por uma mistura heterogênea de proteínas, com solubilidade limitada em água, onde se destacam as gliadinas e gluteninas. A formação da massa viscoelástica capaz de reter o gás da fermentação do pão acontece quando o glúten é misturado com água (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), sob ação física. Através desse processo, ligações dissulfeto são formadas entre as proteínas (Figura 1).

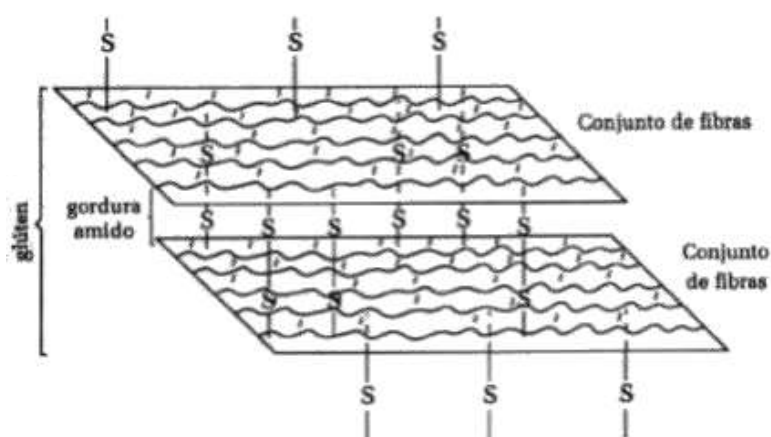


Figura 1: Ligações dissulfeto entre as proteínas ocorrem durante a formação da rede de glúten.

Fonte: Bobbio e Bobbio (1992)

O glúten é encontrado em grãos como trigo, cevada e centeio, e afeta diretamente a qualidade do pão, dando elasticidade à massa, ajudando-a a crescer e dando ao produto final uma textura agradável ao paladar (PALABIYIK e colab., 2016).

2.1.1 Doença celíaca e sensibilidade ao glúten

A doença celíaca é uma enteropatia crônica imunomediada no intestino delgado (Figura 2), vinculada à exposição ao glúten proveniente da alimentação em indivíduos geneticamente predispostos. Os limites da doença celíaca nem

sempre são claros e, por conta disso, há uma confusão considerável e uma carência de consenso no que tange aos critérios de diagnóstico da doença e às condições a ela relacionadas (LUDVIGSSON e colab., 2013).

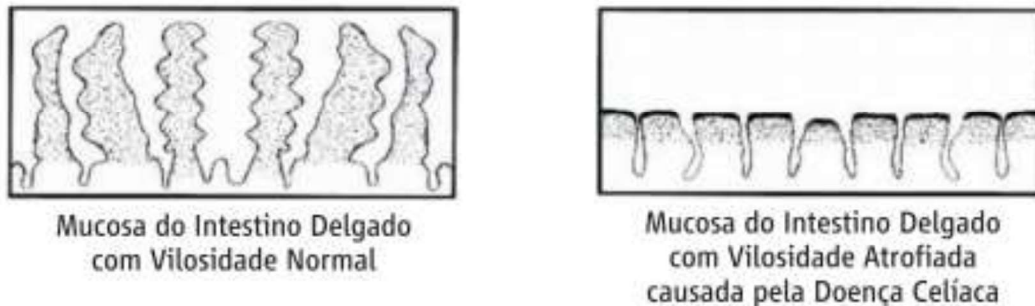


Figura 2: Diferenças de vilosidade na mucosa de intestinos delgado normal e de portador da doença celíaca

Fonte: FENACELBRA, 2010.

A doença celíaca atinge cerca de 1% da população mundial (LEONARD e colab., 2017). A Figura 3 é um gráfico adaptado a partir de uma revisão elaborada por Leonard e colaboradores (2017), o qual mostra a prevalência de celíacos na população em diferentes países. O Brasil apresenta prevalência de doença celíaca de 0,5% e a Argélia se destaca com a maior prevalência, de 5,6% em sua população.

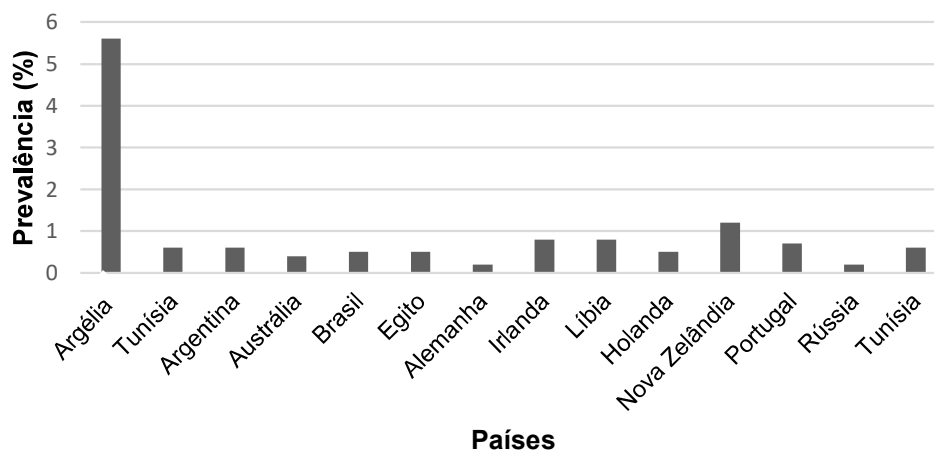


Figura 3: Gráfico ilustrativo da prevalência da doença celíaca no cenário mundial

Fonte: LEONARD e colab. (2017).

Além da doença celíaca, existe a sensibilidade ao glúten não celíaca, que é um conceito utilizado para descrever indivíduos que possuem alguns sintomas relacionados à ingestão de grãos que contém glúten, com uma melhoria quando este é retirado da dieta. A frequência da sensibilidade ao glúten não celíaca não é conhecida, devido à falta de marcadores biológicos validados para a sua detecção, mas estima-se que seja mais comum do que a doença celíaca (LEONARD e colab., 2017).

Existem estudos que acusam outras proteínas distintas do glúten, como responsáveis pela sensibilidade ao glúten não celíaca (SCHUPPAN e ZEVALLOS, 2015) e há pesquisas que mostram que sintomas como inchaço e diarreia, característicos da sensibilidade ao glúten não celíaca, também são causados pelos chamados FODMAPs (cujá sigla vem do inglês e significa *fermentable oligosaccharides, monosaccharides and polyols*), que consistem em compostos não digeríveis, mas altamente fermentáveis pelas bactérias do intestino. Entre esses compostos estão os oligossacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos e polióis (GIBSON e colab., 2015). Esses compostos estão presentes na dieta humana e em alguns alimentos se encontram em excesso (Tabela 1). Segundo Catassi (2015), os sintomas da intolerância aos FODMAPs e a sensibilidade ao glúten não celíaca podem ser sobrepostos, uma vez que os alimentos que contém glúten também contém elevados teores de FODMAPs.

Tabela 1: Alimentos com alta concentração de FODMAPs.

Frutose	Lactose	Oligossacarídeos	Polióis
Frutas: maçã, pera, pêssego, manga, melancia	Leites, sorvetes	Vegetais: alcachofra, aspargo, beterraba, couve, brócolis, ervadoce, alho, cebola, ervilha	Frutas: maçã, damasco, cereja, pera, nectarina, pêssego, ameixa, melancia, abacate
Mel	logurtes	Cereais: trigo e centeio (pão, macarrão, biscoitos)	Vegetais: couve-flor, cogumelo, ervilha
Adoçantes com frutose e xarope de milho com alto teor de frutose	Queijos	Leguminosas: grão de bico, lentilha, feijão	Adoçantes: sorbitol, maltitol, manitol
Concentrados de fruta, frutas desidratadas, sucos de fruta		Frutas: melancia, pêssego, caqui	

Fonte: Adaptado de Gibson e colab. (2015)

Pessoas celíacas e sensíveis ao glúten não celíacas são impossibilitadas de consumir uma gama de produtos alimentícios, incluindo pães e outros alimentos que levam farinha de trigo em sua composição. O pão, por exemplo, é um produto bastante consumido mundialmente e contribui significativamente para a ingestão calórica. Porém, pães sem glúten são difíceis de serem encontrados no mercado, por ser um tipo de produto restrito a lojas especializadas (REGINA e colab., 2013).

2.2 PÃES SEM GLÚTEN

Os pães sem glúten disponíveis no mercado deixam a desejar em termos de qualidade e aceitabilidade, em comparação aos os que contém glúten. Esses produtos apresentam características pobres de miolo, crosta e *flavor* (NAQASH e colab., 2017).

Arroz, milho, sorgo e trigo sarraceno são cereais recomendados para a dieta de pacientes que possuem a doença celíaca. Mas, quando aplicados em pães, com exceção do arroz, esses cereais podem causar efeitos negativos na

qualidade do produto. A farinha de arroz traz vantagens por possuir sabor doce, coloração branca, fácil digestibilidade e não ser alergênica. Além disso, é uma matéria-prima com baixo teor de proteínas e de sódio (SAEIDI e colab., 2018).

A substituição do glúten, devido às suas particularidades, é considerada o maior desafio na elaboração e no desenvolvimento de produtos sem glúten. Alguns aditivos como os hidrocoloides e outros compostos são empregados nesses produtos para tentar simular as propriedades reológicas e sensoriais conferidas pelo glúten (Tabela 2).

Além disso, as expectativas do nicho de consumidores para pães sem glúten são muito influenciadas pelas características dos pães tradicionais, fazendo com que pesquisadores e indústria de alimentos procurem opções de farinhas como alternativa da farinha de trigo. Assim, o uso destes ingredientes podem proporcionar possibilidades de produtos melhores no mercado (FRANCO, 2015).

Tabela 2: Principais aditivos empregados em formulações de pães sem glúten

Categoria	Aditivos e compostos
Hidrocoloides	Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)
	Goma xantana
	Goma guar
	Carboximetilcelulose (CMC)
	Goma de semente de agrião
	Goma de alfarroba
	Agarose
Proteínas	Proteína isolada de soja
	Proteína isolada de ervilha
	Tremoço
	Albumina
	Ovo integral
	Caseinatos
	Proteína concentrada do soro do leite
	Proteína isolada do leite
	Zelna
	Colágeno
Enzimas	Transglutaminase
	Glicose oxidase
	Tirosinase
	Lacase
	Proteinase
	Amilase

Fonte: Adaptado de Wang e colab. (2017)

2.3 ENZIMAS

As enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica e são conhecidas como catalisadores biológicos, pois participam da maioria das reações do metabolismo de organismos vivos. Processos que utilizam enzimas tendem a ser mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis. Além disso, as enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas (MONTEIRO e SILVA, 2009).

A tecnologia enzimática exerce um papel importante em diferentes segmentos industriais como têxtil, no tratamento de água e efluentes, na obtenção de biocombustível, na indústria de alimentos, farmacêutica e entre outros. Na indústria alimentícia, enzimas de diferentes origens são aplicadas com diversas finalidades (Tabela 3). Sua aplicação em processos traz benefícios como: a rapidez de ação; a inexistência de toxicidade; a baixa dosagem de uso; a alta especificidade ao substrato; e aplicação sob condições brandas de temperatura e pH. Quando comparadas a catalisadores químicos, as enzimas são vantajosas em questões ambientais, por exigir menor gasto de energia em suas aplicações e por não acarretar toxicidade ao meio ambiente (COELHO e colab., 2008).

Tabela 3: Principais enzimas aplicadas no processamento industrial de alimentos

Enzimas	Origem	Aplicação
Amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Melhorador de massas e produção de xaropes
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Preparação de concentrados líquidos de café, clarificação de sucos
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminação da glicose dos sólidos do ovo
Invertase	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Obtenção de açúcar invertido
Lactase	<i>Sacharomyces fragilis</i>	Hidrólise da lactose
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> , <i>Mucor spp</i>	Sabor ao queijo
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> , <i>Penicillium</i>	Clarificação de vinho e de sucos de frutas
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Clarificação de cerveja e amaciamento de carne

Fonte: MONTEIRO e SILVA, 2009.

Por serem moléculas proteicas, as enzimas quando submetidas ao calor de cocção são desnaturadas e não permanecem ativas no produto, possibilitando a produção de alimentos com rotulagem mais simplificada na área da panificação. Algumas enzimas já são frequentemente utilizadas na indústria

de panificação (Tabela 4). Além disso, elas são consideradas a melhor e mais segura alternativa aos aditivos químicos e fornecem melhorias nas propriedades de manuseio de massa, qualidade do produto fresco e prazo de validade (PALABIYIK e colab., 2016).

Tabela 4: Principais enzimas utilizadas em produtos de panificação

Enzima	Função
Alfa-amilase	Hidrólise do amido, produção de maltose
Amilase maltogênica	Mantém o pão fresco por mais tempo
Hemicelulase (xilanase)	Estabilidade da massa
Glicose oxidase	Estabilidade da massa
Protease	Melhora a cor e o sabor do pão

Fonte: “Enzimas na panificação”, Aditivos & Ingredientes

Neste cenário, as enzimas podem apresentar efeitos inesperados ou imprevisíveis sobre as características da massa e do pão, que podem ser em decorrência de vários fatores como a especificidade por algum substrato, tipo e qualidade da farinha e padrão de ação das enzimas (ALTLNEL e SEZGIN ÜNAL, 2017).

Em relação aos produtos sem glúten, mais especificamente aos pães, estudos com aplicação de enzimas vêm sendo realizados com o objetivo de apresentar melhorias na qualidade desses alimentos (Tabela 5). Dłuzewska e colaboradores (2015) testaram a adição de transglutaminase em formulação de pão sem glúten e obtiveram uma melhoria no volume específico, na porosidade e umidade do miolo, bem como um frescor mais prolongado do pão. Nesse estudo, os autores também concluíram que o impacto dessa enzima depende do tipo de proteína utilizada na formulação e o melhor resultado foi observado em pão com proteína de soja.

Tabela 5: Algumas enzimas já estudadas em bases de farinha sem glúten

Enzimas	Farinha	Autores
Glicose oxidase	Arroz	(GUJRAL e ROSELL, 2004)
Glicose oxidase, lacase	Aveia	(RENZETTI e colab., 2010)
Protease e amilase	Arroz	(MARTÍNEZ e colab., 2013)
Amilase, esterase, hemicelulase, glicose oxidase e transglutaminase	Arroz Trigo sarraceno Milho	(PALABIYIK e colab., 2016)

Fonte: O autor.

Em uma pesquisa realizada por Gujral e Rosell (2004), a enzima glicose oxidase foi aplicada em uma formulação à base de farinha de arroz. Os autores observaram que a modificação reológica pela adição da enzima melhorou o volume específico do pão e as ligações cruzadas de proteínas promovidas pela glicose oxidase aumentaram a elasticidade e viscosidade da massa, constituindo uma rede de proteínas semelhante ao glúten.

2.3.1 Amiloglicosidase

Também conhecida como glicoamilase, a amiloglicosidase (AG, EC 3.2.1.3) é uma enzima glico-hidrolase que catalisa a hidrólise de ligações entre duas unidades de glicose (JAMES e LEE, 1997).

A AG e a α -glicosidase diferem na preferência pelo substrato, pois a enzima α -glicosidase atua melhor em pequenas moléculas de malto-oligossacarídeos e libera glicose em uma configuração *alfa*, enquanto que a AG hidrolisa longas cadeias de polissacarídeos, hidrolisando as ligações glicosídicas α -1-4 das extremidades não redutoras da cadeia (Figura 4) (VAN DER MAAREL e colab., 2002).

Em pães, o principal substrato para a AG é o amido. Em pães sem glúten o amido pode ser adicionado diretamente, como por exemplo o amido de milho, ou pode estar presente nas farinhas sem glúten, como a farinha de arroz. Em linhas gerais, a adição da amiloglicosidase em pães promove um aumento dos níveis de açúcar fermentescível (STRUYF e colab., 2017a), aumentando a

produção de gás carbônico durante a fermentação, com o conseqüente aumento do volume do pão.

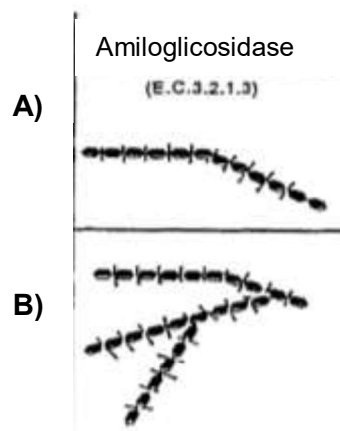


Figura 4: Modo de ação da enzima AG, onde os traços representam a posição da clivagem das moléculas de glicose no amido: amilose (A); e amilopectina (B).

Fonte: James e Lee (1997)

2.3.2 Glicose oxidase

A glicose oxidase (GO; EC 1.1.3.4) é uma enzima que catalisa a oxidação da β -D-glicose em glucono- δ -lactona, com a redução do oxigênio molecular em peróxido de hidrogênio (Figura 5) (HANFT e KOEHLER, 2007).

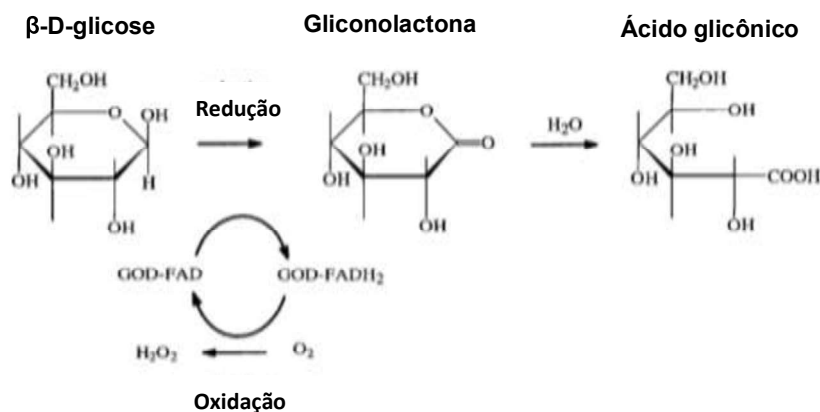


Figura 5: Mecanismo de reação da enzima glicose oxidase com a espontânea hidrólise da gluconolactona em ácido glicônico

Fonte: Witt e colab. (2000).

Com a aplicação da glicose oxidase em pães, com ou sem glúten, o peróxido de hidrogênio formado na reação enzimática promove a oxidação de grupos tíóis dos resíduos das cisteínas das proteínas, resultando na formação de ligações dissulfeto (Figura 6) (BONET e colab., 2006). Como consequência disso, as proteínas se unem por ligações cruzadas (*crosslinking*) e formam uma rede de proteínas que agregam propriedades estruturais e viscoelásticas ao produto.

Além de promover a formação dessa rede de proteína, a ação da GO também está indiretamente relacionada com a gelificação oxidativa das pentosanas solúveis, melhorando as propriedades reológicas da massa (BONET e colab., 2006).

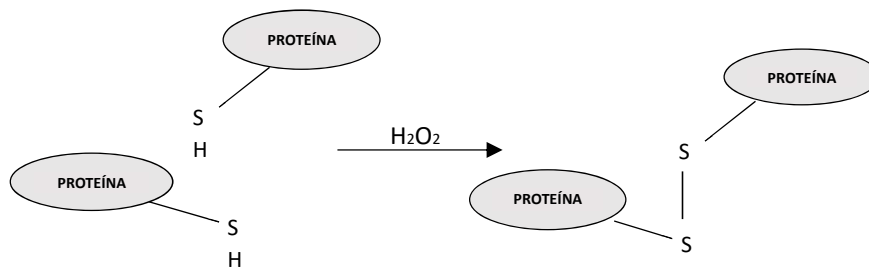


Figura 6: Formação das ligações dissulfeto entre resíduos de cisteínas em complexos de proteínas

Fonte: O autor.

2.3.3 Transglutaminase

A enzima transglutaminase (TG; EC 2.3.2.13) pode modificar proteínas através de três mecanismos: incorporação de uma amina; *crosslinking*; e desamidação. A TG catalisa a reação de transferência do grupamento acil entre os grupos carboxamida das ligações peptídicas dos resíduos de glutamina, que doam o grupamento, e aminas primárias, receptoras do grupamento acil (Figura 7.a). A TG também promove um *crosslinking* entre os resíduos de glutamina e lisina das proteínas ou peptídeos (Figura 7.b). Na ausência de substratos amina, a TG catalisa a desamidação dos resíduos de glutamina enquanto que as moléculas de água atuam como receptoras do grupamento acil (Figura 7.c) (MOTOKI e SEGURO, 1998).

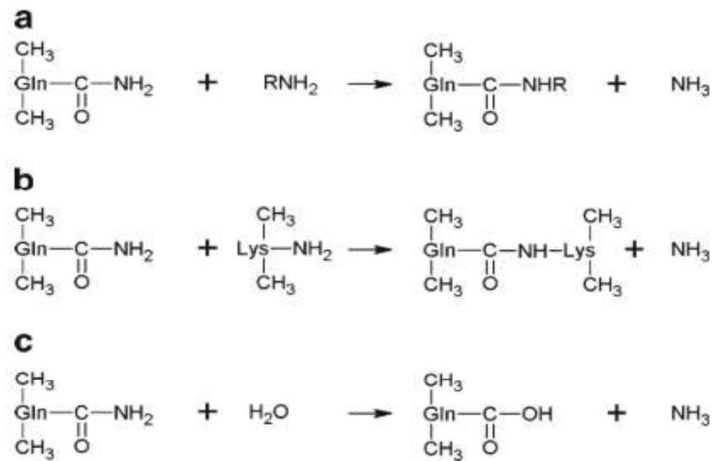


Figura 7 Fases das reações catalisadas pela enzima transglutaminase: incorporação de amina (a); *crosslinking* (b); e desamidação (c).

Fonte: Kieliszek e Misiewicz (2014)

A aplicação da TG na indústria de alimentos possui grande potencial como agente de firmeza, elasticidade e capacidade de retenção da água através de uma reação enzimática simples (LI e colab., 2013). Estudos sobre a ação da TG em pães com farinha sem glúten mostraram resultados promissores em termos de propriedades estruturais da massa, aumento da qualidade do produto, aumento do volume específico, pela formação de redes de proteínas (SCARNATO e colab., 2016; DŁUZEWSKA e colab., 2015).

2.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PÃES

Além de análises sensoriais por painelistas treinados, existem medidas instrumentais que possibilitam avaliar a qualidade de produtos de panificação (ESTELLER e LANNES, 2005). Essas análises incluem medidas simples como as de volume específico, de umidade e de percentual de perda de massa, além de medidas que exigem equipamentos e/ou técnicas mais avançadas como as de porosidade do miolo, de cor e de textura.

Segundo Esteller e Lannes (2005), o volume específico mostra a relação entre teor de sólidos e fração de ar existente na massa assada. Produtos com baixo volume específico apresentam aspecto desagradável ao consumidor, além

de serem associados com falhas na mistura dos ingredientes, difícil mastigação e pouca aeração da massa.

A perda de massa corresponde à perda de água e de compostos orgânicos durante o forneamento (DA ROSA MACHADO e THYS, 2019). Na indústria, a perda excessiva de umidade durante o processo de forneamento pode acarretar em um produto de baixo peso, trazendo prejuízos financeiros ao produtor, além de gerar uma crosta seca e afetar negativamente o frescor do pão, causando um envelhecimento precoce dos mesmos (KOTOKI e DEKA, 2010).

A avaliação da textura do miolo de pães pode ser feita através de um texturômetro. Esse equipamento fornece dados como firmeza, elasticidade, coesividade e mastigabilidade das amostras a partir de compressões realizadas na amostra. A firmeza equivale à força máxima necessária para comprimir a amostra; a elasticidade relativa é a razão entre a força restante medida após 20 segundos após atingir a força máxima de compressão (KORCZYK – SZABÓ e LACKO – BARTOŠOVÁ, 2014); e a coesividade é expressa através da relação entre as áreas do primeiro e do segundo ciclo da curva força-tempo do gráfico gerado pelo texturômetro (MATUDA, 2004). A mastigabilidade é obtida através do produto da firmeza, da coesividade e da elasticidade (SZCZESNIAK, 2002). A Tabela 6 descreve o reflexo dos parâmetros de textura gerados pelo texturômetro e das propriedades físicas nas características sensoriais dos pães.

Tabela 6: Relação entre os parâmetros de textura e as propriedades físicas e sensoriais dos pães

Parâmetros	Propriedades Físicas	Propriedades Sensoriais
Firmeza	Força necessária para obter uma determinada deformação	Força necessária para comprimir alimento sólido entre os dentes molares ou entre a língua e o palato (alimento semissólido)
Coabilidade	O quanto o material pode ser deformado antes de se romper	O grau que um alimento é comprimido entre os dentes até se quebrar
Elasticidade	O quanto o material deformado retorna à condição original após remoção da força de deformação	Grau que o alimento retorna ao seu formato original após ser pressionado entre os dentes
Mastigabilidade	Energia requerida para mastigar um alimento sólido até o ponto apto para ser engolido	Tempo necessário para mastigar um alimento, a uma taxa constante de aplicação de força, para atingir uma consistência adequada para deglutição

Fonte: Adaptado de Szczesniak 2002)

Programas de análise de imagem, como o ImageJ, são utilizados para avaliação da estrutura do miolo de pães através da análise dos alvéolos formados pelo gás gerado durante a fermentação. Segundo Korczyk-Szabó e Lacko-Bartošová (2014), pães com maior porosidade e de poros pequenos e regulares no miolo são desejáveis.

O ImageJ é um *software* desenvolvido em linguagem Java para processar e analisar imagens. Com este *software* é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits (HANNICKEL e colab., 2002). O programa divide uma imagem em objeto e plano de fundo e computa dados a partir dos pixels. Com isso, é possível obter os parâmetros relacionados à estrutura do miolo, como o número de alvéolos, o tamanho de cada célula de gás, a média da área dos alvéolos e a área coberta por células de gás.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A elaboração dos pães com a aplicação das enzimas e as análises de volume específico, percentual de perda de massa, altura média da fatia central e os parâmetros dados pelo *Software ImageJ* foram realizados nos laboratórios do Complexo de Alimentos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). As análises de textura foram realizadas no laboratório 121 do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Ingredientes

3.1.1.1 Formulação base do pão sem glúten

A formulação base para a elaboração dos pães sem glúten foi adaptada do trabalho de Machado e Thys (2019). Entretanto, neste trabalho, a farinha de trigo sarraceno foi utilizada como fonte proteica. Tomando como 100% o peso da mistura entre o amido de milho e da farinha de arroz (3:7), os constituintes da formulação com seus respectivos percentuais estão mostrados na Tabela 7. Todos os ingredientes foram adquiridos no comércio local em Porto Alegre (RS).

Tabela 7: Ingredientes que foram utilizados na formulação base do pão sem glúten

Ingredientes	Percentual sob o peso do amido de milho e da farinha de arroz (%)
Amido de milho	70
Farinha de arroz	30
Farinha de trigo sarraceno	20
Óleo de soja	4
Fermento biológico seco instantâneo	2,5
Sal	2
Açúcar	2
Carboximetilcelulose (CMC)	1
Goma xantana	1
Mono- e diglicerídeos de ácidos graxos	0,5
Enzima (AG, GO ou TG*)	De acordo com o item 3.1.1.2
Água	150

*AG: amiloglicosidase; GO: glicose oxidase; TG: transglutaminase

Fonte: Adaptado de Machado e Thys (2019)

3.1.1.2 Enzimas

As enzimas comerciais utilizadas nas diferentes formulações foram gentilmente cedidas pela empresa Prozyn, na forma de pó. A glicose oxidase (GLUCOZYN 250) e a amiloglicosidase (PANZYN GA 100) são enzimas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* e a transglutaminase (GLUTEMAX TG) é proveniente da bactéria *Streptoverticillium mobaraense*, ambos microrganismos classificados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, reconhecidos como seguros.

A dosagem de enzima recomendada (Tabela 8) é sob o peso de farinha de trigo e, portanto, neste caso, será considerado o somatório do peso do amido de milho e da farinha de arroz. Concentrações equivalentes à metade da dosagem mínima indicada pelo fabricante foram avaliadas, visto que a faixa de concentração indicada pelo fabricante é para pães elaborados com farinha de trigo.

Tabela 8: Faixas de dosagem recomendadas pelo fabricante das enzimas

Enzimas	Dosagem recomendada pelo fabricante (g/100 kg de farinha)
Amiloglicosidase	30 – 300
Glicose oxidase	15 – 40
Transglutaminase	0,5 – 1,0

Fonte: O autor.

Sendo assim, foram avaliadas as concentrações mínimas e máximas indicadas pelo fabricante, assim como a metade da concentração mínima indicada. As formulações foram nomeadas de acordo com Tabela 9.

Tabela 9: Concentrações das enzimas utilizadas nas formulações de pão sem glúten

Formulações	Concentrações das enzimas
AG 15	15 g de amiloglicosidase por 100 kg de farinha
AG 30	30 g de amiloglicosidase por 100 kg de farinha
AG 300	300 g de amiloglicosidase por 100 kg de farinha
GO 7,5	7,5 g de glicose oxidase por 100 kg de farinha
GO 15	15 g de glicose oxidase por 100 kg de farinha
GO 40	40 g de glicose oxidase por 100 kg de farinha
TG 0,25	0,25 g de transglutaminase por 100 kg de farinha
TG 0,5	0,5 g de transglutaminase por 100 kg de farinha
TG 1,0	1,0 g de transglutaminase por 100 kg de farinha

Fonte: O autor.

3.1.2 Equipamentos e utensílios

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica (Even BL-3200AS BI), exceto as enzimas, que foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AUW220D). A mistura dos ingredientes foi realizada em batedeira planetária de bancada (Oster), sendo as enzimas previamente diluídas na água constituinte da formulação. A massa assim preparada foi disposta em fôrmas de metal (300 g), fermentada em fermentadora (Klimapão) durante 50 min a 35 °C e fornada por 10 min a 220 °C em forno de lastro (Tedesco Turbo FTT80E). Após assados e resfriados, os pães foram embalados em sacos plásticos impermeáveis à umidade e armazenados em caixa plástica organizadora para proteção das amostras contra impactos físicos para as posteriores análises.

A análise de qualidade da textura das amostras foi realizada em um texturômetro TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK) equipado com um probe de 36 mm de diâmetro. Para medir o volume específico do pão foram utilizadas sementes de painço, recipientes plásticos e proveta de 1L. A altura da fatia central e o percentual de perda de massa das amostras foram quantificadas com o uso de régua e balança de precisão, respectivamente.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Fluxograma da elaboração do pão

A formulação base utilizada nas análises, bem como o processo de elaboração (Figura 8) das amostras de pães foram baseados no trabalho publicado por Machado e Thys (2019). Os pães foram elaborados em 10 bateladas, sendo uma para a elaboração da amostra controle e o restante para a aplicação de cada uma das concentrações das enzimas. Cada batelada foi dividida em 3 amostras para as posteriores análises.

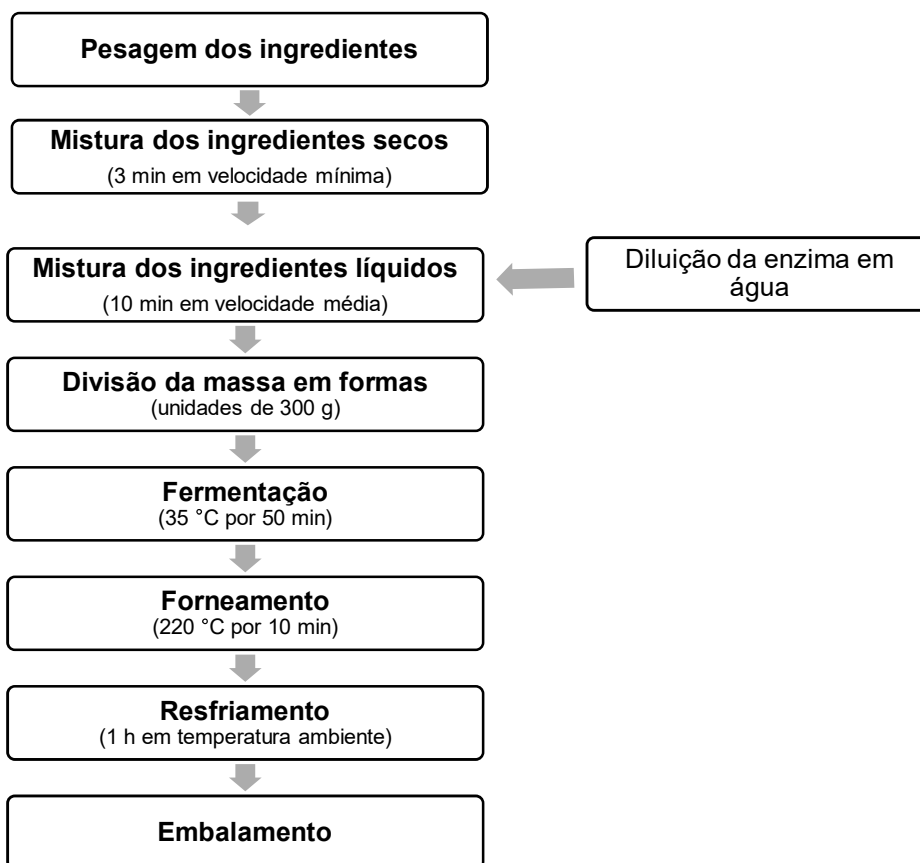


Figura 8: Fluxograma do processo de elaboração dos pães sem glúten

Fonte: O autor

3.2.2 Análise em texturômetro

A qualidade da textura do miolo do pão foi avaliada e expressa em termos de firmeza (N), mastigabilidade (N), elasticidade relativa (%) e coesividade, seguindo o método nº 74-09 da AACC (*American Association of Cereal Chemists*). Para isso, fatias de pães de 20 mm de espessura foram analisadas em analisador de textura equipado com um *probe* cilíndrico de alumínio de 36 mm com 5,0 g de força de contato. As velocidades de compressão do pré-teste, teste e pós-teste foram de 2,0; 1,7 e 2,0 mm/s, respectivamente. As análises no texturômetro foram realizadas após 20 h do forneamento.

3.2.3 Análise de imagem em *Software ImageJ*

Através do *software* ImageJ (Figura 9), os seguintes parâmetros foram obtidos: número de alvéolos; tamanho de cada célula de gás (mm); média da

área dos alvéolos (mm^2); e área coberta por células de gás (mm^2). Com esses parâmetros foi possível obter informações de: porosidade, que consiste no percentual da área da fatia do pão coberta por alvéolos; densidade de células, que é o número de alvéolos formados por cm^2 ; e o percentual de poros maiores que 5 mm.

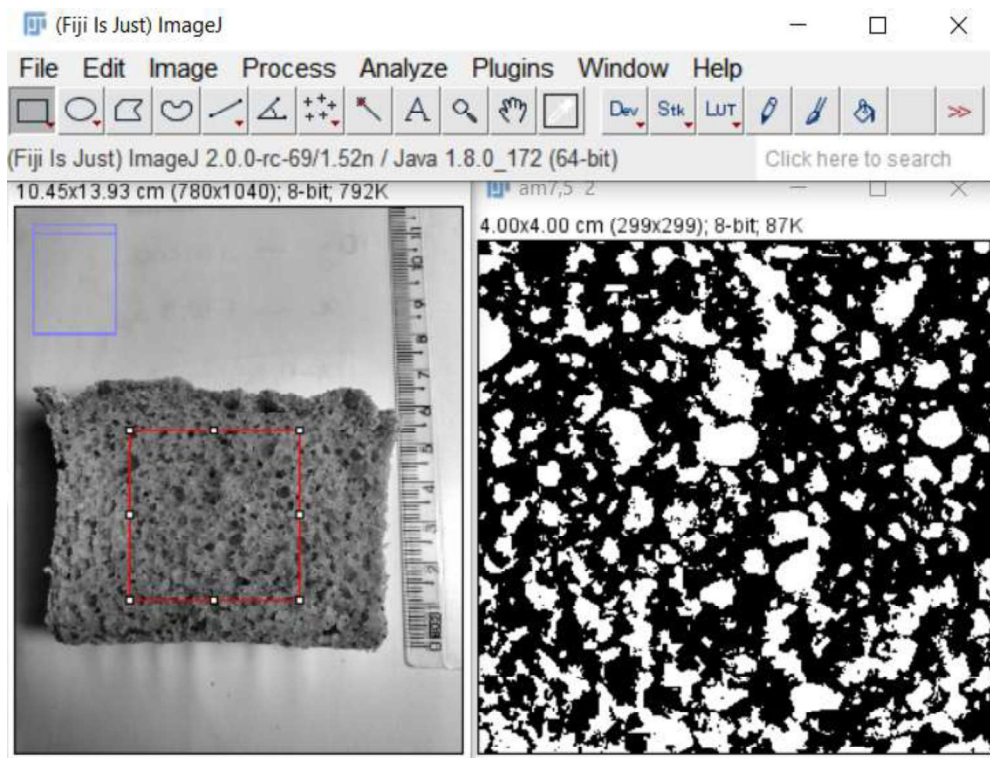


Figura 9: Amostra de pão sem glúten submetido ao *software* ImageJ para análise de estrutura do miolo

Fonte: O autor

3.3.4 Volume específico

Após pesagem das amostras, os volumes foram determinados pelo método do deslocamento de sementes de painço, que consiste na medida em proveta das sementes que transbordam do refratário após cobertura total da amostra de pão. O volume específico, por sua vez, foi calculado através da relação entre o volume e a massa das amostras de pães (EL-DASH, 1978).

3.3.5 Percentual de perda de massa

As amostras foram pesadas antes e após o forneamento e o percentual de perda de massa foi obtido através da equação abaixo.

$$\% \text{ percentual de perda de massa} = \left| \frac{m_2 - m_1}{m_1} \right| \cdot 100,$$

em que m_1 é referente à massa da amostra antes do forneamento e m_2 é referente à massa da amostra depois de forneada.

3.3.6 Altura média da fatia central

A média da altura da fatia central das amostras foi calculada através de marcações feitas manualmente em folha pautada (ALMEIDA, 2011). Conforme ilustrado nas Figuras 10.a. e 10.b., as amostras foram colocadas sob a folha de modo que a base ficasse alinhada. Seis pontos foram marcados, a distância deles até a base foi medida com uma régua e a média das alturas foi calculada.

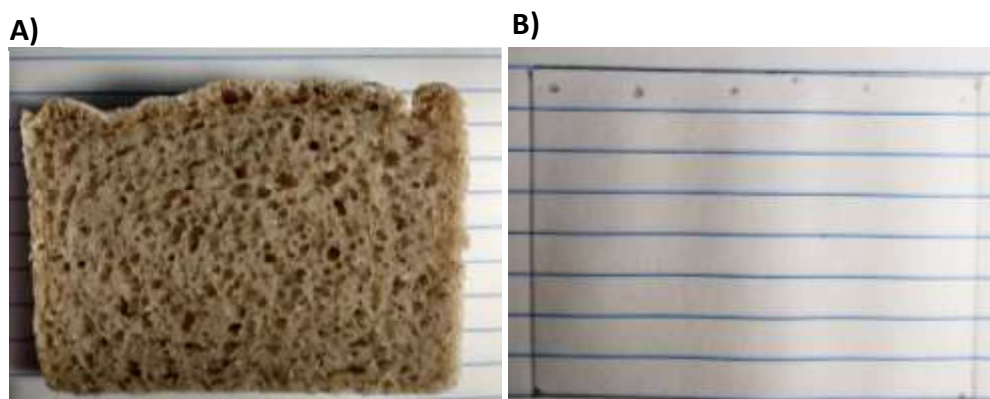


Figura 10: Cálculo da altura média da fatia central. As amostras foram colocadas sob folha pautada (A) e marcações na altura da fatia foram feitas para medição e cálculo da média (B)

Fonte: O autor

3.3.7 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre as análises, realizadas em triplicata, foram avaliadas por análise de variância de fator único (ANOVA) e teste de Tukey com significância de 5%, através da planilha de Excel disponibilizada pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).