

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

RAQUEL TRONCOSO CHAVES MORENO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE PÃES SEM
GLÚTEN À BASE DE FARINHAS DE GRÃO QUEBRADO DE
ARROZ E DE GRÃO-DE-BICO**

Goiânia
2019



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

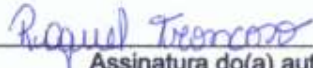
Nome completo do autor: Raquel Troncoso Chaves Moreno

Título do trabalho: Desenvolvimento de formulações de pães sem glúten à base de farinhas de grão quebrado de arroz e de grão-de-bico

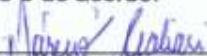
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 08 / 10 / 2009

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

RAQUEL TRONCOSO CHAVES MORENO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE PÃES SEM
GLÚTEN À BASE DE FARINHAS DE GRÃO QUEBRADO DE
ARROZ E DE GRÃO-DE-BICO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, como exigência para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Caliarí

Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Soares
Soares Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Artur
Mendes Bataus

Goiânia
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Troncoso Chaves Moreno, Raquel

Desenvolvimento de formulações de pães sem glúten à base de
farinhas de grão quebrado de arroz e de grão-de-bico [manuscrito] /
Raquel Troncoso Chaves Moreno. - 2019.

CXXII, 122 f.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Caliarí; co-orientador Dr. Manoel
Soares Soares Junior; co-orientador Dr. Luiz Artur Mendes Bataus.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Cicer arietinum L.. 2. Manihot esculenta Crantz. 3. Solanum
tuberosum L.. 4. Oryza sativa L.. 5. panificação sem glúten. I. Caliarí,
Márcio, orient. II. Título.

CDU 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 0004/2019 da sessão de Defesa de Dissertação de **Raquel Troncoso Chaves Moreno**, que confere o título de Mestre(a) em **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, na área de concentração em **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Ao/s **Trinta dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezenove**, a partir da(s) **09:00h**, no(a) **Sala 18 do Prédio Central da Escola de Agronomia**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **"DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE PÃES SEM GLÚTEN"**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Márcio Caliarí (PPGCTA/EA/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) **Dr.ª Alline Emannuele Chaves Ribeiro (EA/UFG)**, Professor(a) Doutor(a) **Tânia Aparecida Pinto de Castro Ferreira (FANUT/EA/UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho **"DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE PÃES SEM GLÚTEN À BASE DE FARINHAS DE GRÃO QUEBRADO DE ARROZ E DE GRÃO-DE-BICO"**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Márcio Caliarí (PPGCTA/EA/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **[Trinta dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezenove]**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

"DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE PÃES SEM GLÚTEN À BASE DE FARINHAS DE GRÃO QUEBRADO DE ARROZ E DE GRÃO-DE-BICO"



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL TRONCOSO CHAVES MORENO, Discente**, em 30/08/2019, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Caliarí, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2019, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Werbeth Bezerra De Sousa, Assistente em Administração**, em 30/08/2019, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tania Aparecida Pinto De Castro Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 30/08/2019, às 12:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alline Emannuele Chaves Ribeiro, Usuário Externo**, em 03/09/2019, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0855052** e o código CRC **E2C7897C**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Bernadete de Lourdes Troncoso Chaves e Cícero Martines Moreno, pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida. Ao meu irmão, Danilo Troncoso Chaves Matines, pela amizade e bom humor de sempre. A toda a minha família Troncoso, por todos os exemplos de sucesso, união, superação e perseverança. Vocês serão sempre referência e inspiração pra mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Caliar, e aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Manoel Soares Soares Junior e Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus, pela paciência e pela confiança em mim depositada, mas também pelos ensinamentos compartilhados, que foram essenciais para a execução desse trabalho e que tanto agregaram na minha caminhada pessoal e profissional.

Aos meus amigos e colegas de turma, Bruna Melo Miranda, Danilo José Machado de Abreu e Rayssa Dias Batista, por participarem dos momentos de aprendizado, de dúvidas, de dificuldades e de alegria. Agradeço a oportunidade de dividir essa etapa tão importante com pessoas especiais como vocês. Tenho certeza que ainda vamos compartilhar muitas realizações que virão pela frente.

Às minhas amigas Elaine Alves dos Santos e Tatiza Terra Barcellos, por compartilharem os momentos de conquistas, alegria e diversão, mas também por estarem sempre presentes nos momentos de dificuldade e nas incontáveis horas de trabalho no laboratório. A companhia de vocês tornou a jornada do mestrado mais leve e agradeço sempre a oportunidade de ter vocês na minha vida.

Aos meus colegas do Labdarsa, pelos conhecimentos e experiências compartilhados. À Elaine Carvalho Pinto, técnica de laboratório da Escola Senai Vila Canaã, pelo auxílio na utilização do espaço para formulação do produto desenvolvido nesse trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a Deus pela proteção, pelas boas instuições, pela força de sempre e pela conclusão de mais essa etapa.

“Aos outros, dou o direito de ser como são. A mim, dou o dever de ser cada dia melhor”.

(Chico Xavier)

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar quanto às propriedades químicas, físicas e físico-químicas os pães sem glúten elaborados a partir da mistura de farinha de grãos quebrados de arroz (FA), farinha de grão-de-bico (FGB), fécula de batata (FB) e fécula de mandioca (FM), adicionados de diferentes proporções de extrato enzimático de alfa amilase, amiloglucosidase e celulase. As farinhas e féculas utilizadas na pesquisa foram caracterizadas quanto às suas propriedades físicas (cor, granulometria), químicas (composição centesimal), físico-químicas (atividade de água, acidez total titulável e pH) e tecnológicas (ISS, IAA, propriedades de pasta e propriedades térmicas). A definição da concentração ideal de FGB foi realizada a partir de um DIC (ensaio 1) e a proporção ideal entre FA, FM e FB foi definida a partir de um delineamento de misturas (ensaio 2). Os pães foram analisados quanto ao volume específico, parâmetros de textura e parâmetros instrumentais de cor. Foram produzidos, ainda, extratos enzimáticos de alfa amilase e amiloglucosidase e celulase, sendo definida a atividade enzimática para cada enzima. Foram elaborados pães com diferentes concentrações dos extratos enzimáticos, sendo então avaliados de acordo com o volume específico, parâmetros de textura, parâmetros instrumentais de cor, teor de umidade e atividade de água, sendo que a formulação ideal, que apresentou maior volume específico e melhores parâmetros de dureza e mastigabilidade, passou pela caracterização físico-química. A farinha de grão-de-bico apresentou maior teor de fibras, proteínas, lipídios e cinzas. Para o teor de amilose, foram encontrados os valores de $19,77 \text{ g } 100^{-1}$ para farinha de grão-de-bico, $26,83 \text{ g } 100^{-1}$ para farinha de arroz, $28,36 \text{ g } 100^{-1}$ para fécula de mandioca e $29,60 \text{ g } 100^{-1}$ para fécula de batata. Em relação às propriedades tecnológicas, a farinha de arroz apresentou maior valor de retrogradação (337 RVU), e as féculas de mandioca e batata os maiores valores de quebra de viscosidade (367 RVU e 1285 RVU, respectivamente) e viscosidade máxima (514,58 RVU e 1447,71 RVU, respectivamente). De acordo com o DIC, o pão formulado com $35 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de FGB apresentou maior volume específico ($2,96 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) e valor de dureza de 12,55 N, e, por isso foi selecionado como sendo ideal. De acordo com o delineamento de misturas, a formulação com $50 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de FM, $25 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de FA e $25 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de FB apresentou maior volume específico ($3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), sendo então selecionada como ideal. Os extratos enzimáticos produzidos apresentaram atividade enzimática de $2,68 \text{ U mL}^{-1}$, $4,53 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,89 \text{ U mL}^{-1}$ para alfa amilase, amiloglucosidase e celulase, respectivamente. A formulação com a adição de 2 mL do extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase, apresentou volume específico significativamente maior ($3,26 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) e valor de dureza significativamente menor (4,72 N) em relação às demais formulações e, por isso, foi selecionada como sendo a ideal. De acordo com a análise físico-química, a adição do extrato enzimático reduziu o valor de carboidratos disponíveis e carboidratos totais do pão, mas não provocou alterações no teor de fibras, cinzas, pH e acidez total titulável. A partir dos resultados obtidos para as farinhas de grão-de-bico e de arroz e para as féculas de mandioca e de batata foi possível concluir que essas são apropriadas para a aplicação em produtos de panificação. A aplicação de 2 mL de extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase foi capaz de melhorar de forma significativa os valores de volume específico e dureza dos pães, além de reduzir o valor de carboidratos disponíveis, demonstrando que a utilização de enzimas amilolíticas podem ser uma alternativa viável para melhorar as características de volume específicos e parâmetros de textura de pães sem glúten.

Palavras chave: *Cicer arietinum* L., *Manihot esculenta* Crantz, *Solanum tuberosum* L., *Oryza sativa* L., panificação sem glúten, enzimas

DEVELOPMENT OF GLUTEN-FREE BREAD FORMULATIONS BASED ON BROKEN RICE AND CHICKPEA FLOURS

ABSTRACT

The objective of this work was to develop and characterize the chemical, physical and physicochemical properties of gluten-free breads prepared from the mixture of flour from broken rice grains (FA), chickpea flour (FGB), potato starch (FB) and cassava starch (FM), added with different proportions of enzymatic extract of alpha amylase, amyloglucosidase and cellulase. The flours and starches used in the research were characterized as to their physical, chemical and technological properties. To define the ideal concentration of each of the flour and starch in the mixture, two experimental designs were carried out, the first one being a completely randomized design (DIC), in which the best proportion of FGB in the formulation was defined, and the second the mixtures, in which the ideal proportions for FA, FM and FB were defined in the treatments. The loaves were analyzed for specific volume, texture parameters and instrumental parameters of color. Also, enzymatic extracts of alpha amylase and amyloglucosidase and cellulase were produced, and the enzymatic activity for each enzyme was defined. Breads with different concentrations of enzymatic extracts were prepared and evaluated according to the specific volume, texture parameters, color instrumental parameters, moisture content and water activity, where the ideal formulation was physicochemical characterization. Chickpea flour had higher fiber, protein, lipid and ash content. For the amylose content, the values of $19.77 \text{ g } 100^{-1}$ were found for chickpea flour, $26.83 \text{ g } 100^{-1}$ for rice flour, $28.36 \text{ g } 100^{-1}$ for cassava starch and $29.60 \text{ g } 100^{-1}$ for potato starch. In relation to the technological properties, rice flour had a higher retrogradation value (337 RVU), and cassava and potato starch had the highest viscosity drop values (367 RVU and 1285 RVU, respectively) and maximum viscosity (514.58 RVU and 1447.71 RVU, respectively). According to the DIC, bread formulated with $35 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ of FGB had a higher specific volume ($2.96 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) and a hardness value of 12.55 N, and therefore was selected as being ideal. According to the design of the mixtures, the formulation with $50 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ of FM, $25 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ of FA and $25 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ of FB presented a higher specific volume ($3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), being then selected as ideal. The enzymatic extracts produced enzymatic activity of 2.68 U mL^{-1} , 4.53 U mL^{-1} and 0.89 U mL^{-1} for alpha amylase, amyloglucosidase and cellulase, respectively. The formulation with the addition of 2 mL of the alpha amylase and amyloglucosidase enzyme extract presented significantly higher specific volume ($3.26 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) and a significantly lower hardness value (4.72 N) than the other formulations and, therefore, was selected as the ideal. According to the physico-chemical analysis, the addition of the enzyme extract reduced the value of available carbohydrates and total carbohydrates of the bread, but did not cause changes in fiber content, ashes, pH and titratable total acidity. From the results obtained for chickpea and rice flour and for manioc and potato starches it was possible to conclude that these are suitable for application in bakery products. The application of 2 mL of alpha amylase and amyloglucosidase enzymatic extract was able to significantly improve the specific volume and hardness values of the loaves, as well as to reduce the amount of available carbohydrates, demonstrating that the use of amylolytic enzymes may be an alternative feasible to improve the specific volume characteristics and texture parameters of gluten-free breads.

Key words: *Cicer arietinum* L., *Manihot esculenta* Crantz, *Solanum tuberosum* L., *Oryza sativa* L., gluten-free baking, enzymes.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.	Cálculo de cromaticidade (C^*) para as farinhas e féculas	32
Equação 2.	Cálculo do ângulo Hue para as farinhas e féculas	33
Equação 3.	Cálculo do índice de absorção em água (IAA) para as farinhas e féculas ..	34
Equação 4.	Cálculo do índice de solubilidade em água (ISA) para as farinhas e féculas	35
Equação 5.	Determinação dos valores de pseudocomponentes para o delineamento de misturas	66
Equação 6.	Cálculo do volume específico para os pães sem glúten	67
Equação 7.	Cálculo de cromaticidade (C^*) para casca e miolo dos pães sem glúten ...	68
Equação 8.	Cálculo do ângulo Hue para casca e miolo dos pães sem glúten	68
Equação 9.	Cálculo do volume específico para os pães sem glúten com adição de extrato enzimático	95
Equação 10.	Cálculo de cromaticidade (C^*) para casca e miolo dos pães sem glúten com adição de extrato enzimático	96
Equação 11.	Cálculo do ângulo Hue para casca e miolo dos pães sem glúten com adição de extrato enzimático	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Propriedades térmicas determinadas através de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	47
Figura 2.	Fluxograma do delineamento experimental para elaboração dos pães com farinha de grão-de-bico (FGB); farinha de arroz (FA); fécula de mandioca (FM); fécula de batata (FB)	64
Figura 3.	Pães elaborados com diferentes proporções de substituição da mistura de farinhas por farinha de grão-de-bico	73
Figura 4.	Resultados obtidos a partir do delineamento de misturas para os parâmetros de (A) Volume específico, (B) Dureza, (C) Coesividade, (D) Coordenada de cromaticidade b^* da casca dos pães elaborados em função das concentrações de farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	79
Figura 5.	Pães elaborados a partir de delineamento de misturas com diferentes níveis de substituição para farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	84
Figura 6.	A: Gel de poliacrilamida (1: marcador; 2: extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase; 3; extrato enzimático de celulase); B: Zimograma para o extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase; C: zimograma para o extrato enzimático de celulase	98
Figura 7.	Pães elaborados com a adição de diferentes volumes de extrato enzimático de alfa amilase, amiloglucosidase e celulase	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Perfil granulométrico para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	36
Tabela 2.	Parâmetros de cor para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	38
Tabela 3.	Composição centesimal, pH, acidez total titulável, atividade de água e teor de amilose para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB).....	40
Tabela 4.	Índice de solubilidade em água (ISA) e Índice de absorção em água (IAA) a 25°C para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	45
Tabela 5.	Propriedades térmicas da farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	47
Tabela 6.	Propriedades de pasta para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	50
Tabela 7.	Proporções estabelecidas para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de batata (FB) e fécula de mandioca (FM), para realização da primeira etapa de elaboração dos pães sem glúten	65
Tabela 8.	Concentrações máximas e mínimas determinadas para farinha de arroz (FA), fécula de batata (FB) e fécula de mandioca (FM) utilizadas para a formulação dos pães sem glúten	66
Tabela 9.	Planejamento experimental para avaliação da influência da farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB) nas propriedades físicas de pães sem glúten. Valores expressos em concentrações reais (%) e pseudocomponentes	67
Tabela 10.	Volume específico e parâmetros de textura dos pães com diferentes níveis de substituição da mistura por farinha de grão-de-bico (FGB)	70

Tabela 11.	Análise de parâmetros de cor dos pães com diferentes níveis de substituição da mistura por farinha de grão-de-bico (FGB)	71
Tabela 12.	Modelos para volume específico, parâmetros de textura e parâmetros de cor com coeficiente de nível de significância (P), coeficiente de determinação experimental (R^2) e coeficiente de determinação ajustado (R_{aj}^2) em função do nível de substituição da mistura de farinhas pela farinha de grão-de-bico	72
Tabela 13.	Análise de volume específico, parâmetros de textura, umidade e atividade de água dos pães elaborados em função das concentrações de farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	77
Tabela 14.	Análise dos parâmetros instrumentais de cor dos pães elaborados em função das concentrações de farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)	78
Tabela 15.	Modelos para volume específico, parâmetros de textura e parâmetros de cor com coeficiente de nível de significância (P), coeficiente de determinação experimental (R^2) e coeficiente de determinação ajustado (R_{aj}^2) em função da porcentagem de farinha de arroz (X1), e fécula de batata (X2). fécula de mandioca (X3)	80
Tabela 16.	Volume de extrato enzimático utilizado nas formulações de pães sem glúten	95
Tabela 17.	Resultados das análises de volume específico, parâmetros de textura, teor de umidade e atividade de água dos pães com adição de diferentes volumes dos extratos enzimáticos	100
Tabela 18.	Análise de parâmetros de cor dos pães com adição de diferentes volumes dos extratos enzimáticos	103
Tabela 19.	Análise físico-química, pH e acidez da formulação F4 e da formulação controle	105

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1	13
1.1	Introdução	13
1.2	Revisão bibliográfica	14
1.2.1	Glúten	14
1.2.2	Doença Celíaca	15
1.2.3	Grão-de-bico	16
1.2.4	Arroz	17
1.2.5	Féculas	18
1.2.6	Produtos de panificação sem glúten	20
1.2.7	<i>Streptomyces</i> e produção de enzimas	21
1.3	Objetivos	22
1.3.1	Objetivo geral	22
1.3.2	Objetivos específicos	22
	REFERÊNCIAS	24
2.	CAPÍTULO 2	29
	ARTIGO 1 - POTENCIAL DE FARINHAS DE ARROZ E DE GRÃO-DE-BICO E FÉCULAS DE BATATA E MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE PANIFICADOS	29
2.1	Introdução	30
2.2	Material e métodos	31
2.2.1	Material	31
2.2.2	Métodos	31
2.2.2.1	<i>Elaboração das farinhas de arroz e de grão-de-bico</i>	31
2.2.2.2	<i>Caracterização química, física, físico-química e tecnológica das farinhas e féculas</i>	32
2.2.2.2.1	<i>Perfil granulométrico</i>	32
2.2.2.2.2	<i>Parâmetros instrumentais de cor</i>	32
2.2.2.2.3	<i>Composição química</i>	33
2.2.2.2.4	<i>Atividade de água, acidez total titulável e potencial hidrogeniônico (pH)</i>	33
2.2.2.2.5	<i>Teor de amilose</i>	34
2.2.2.2.6	<i>Índice de absorção em água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)</i>	34
2.2.2.2.7	<i>Propriedades térmicas</i>	35
2.2.2.2.8	<i>Propriedades de pasta (RVA)</i>	35
2.2.2.3	<i>Análise estatística</i>	35
2.3	Resultados e discussão	36
2.3.1	Perfil granulométrico	36
2.3.2	Parâmetros instrumentais de cor	37

2.3.3	Composição química, teor de amilose, acidez total titulável e potencial hidrogeniônico (pH)	39
2.3.4	Índice de solubilidade em água (ISA) e índice de absorção em água (IAA)	45
2.3.5	Propriedades térmicas e propriedades de pasta	47
2.4	Conclusão	53
	REFERÊNCIAS	54
3.	CAPÍTULO 3	61
	ARTIGO 2 – DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE PÃES SEM GLÚTEN COM FARINHA DE ARROZ, FARINHA DE GRÃO-DE-BICO, FÉCULA DE BATATA E FÉCULA DE MANDIOCA	61
3.1	Introdução	62
3.2	Material e métodos	63
3.2.1	Material	63
3.2.2	Métodos	63
3.2.2.1	<i>Formulação dos pães</i>	63
3.2.2.2	<i>Planejamento experimental</i>	64
3.2.2.3	<i>Caracterização dos pães</i>	67
3.2.2.4	<i>Análise estatística dos dados</i>	69
3.3	Resultados e discussão	69
3.4	Conclusão	85
	REFERÊNCIAS	86
4.	CAPÍTULO 4	89
	ARTIGO 3 – PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE ALFA AMILASE, AMILOGLUCOSIDASE E CELULASE NA FORMULAÇÃO DE PÃES SEM GLÚTEN	89
4.1	Introdução	90
4.2	Material e métodos	91
4.2.1	Material	91
4.2.2	Métodos	91
4.2.2.1	<i>Produção e caracterização dos extratos enzimáticos</i>	91
4.2.2.1.1	<i>Fermentação semi-sólida</i>	91
4.2.2.1.2	<i>Determinação da atividade enzimática para celulase</i>	92
4.2.2.1.3	<i>Determinação da atividade enzimática para alfa amilase e amiloglucosidase</i>	92
4.2.2.1.4	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida do sulfato dodecil de sódio (SDS-Page)</i>	93
4.2.2.1.5	<i>Zimograma</i>	93
4.2.2.2	<i>Formulação dos pães</i>	94
4.2.2.3	<i>Planejamento experimental para aplicação das enzimas</i>	94

4.2.2.4	<i>Caracterização física dos pães</i>	95
4.2.2.5	<i>Caracterização físico-química dos pães sem glúten</i>	96
4.2.2.8	<i>Análise estatística</i>	97
4.3	Resultados	97
4.4	Conclusão	107
	REFERÊNCIAS	108
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
	ANEXO	113

1. CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Nas últimas décadas, vem ocorrendo um aumento progressivo no número de pacientes diagnosticados com doença celíaca ao redor do mundo. A doença celíaca é uma doença crônica, de origem genética, que se caracteriza principalmente por uma inflamação no intestino delgado desencadeada pela intolerância à ingestão de glúten, o que resulta na má absorção de nutrientes e provoca sintomas como perda de peso acentuada, diarreia sanguinolenta, anemia, fadiga, flatulência, cólica e distensão abdominal. Assim, a principal terapia aplicada ao controle da doença celíaca é a adesão a uma dieta isenta de glúten (MOHAMMADI et al., 2015).

O glúten é o principal composto protéico presente em cereais como trigo, centeio e cevada, e exerce importante papel tecnológico no desenvolvimento de massas alimentícias e produtos de panificação e confeitaria, interferindo no aumento do volume e retenção de ar na massa, textura, maciez e flexibilidade do miolo (DŁUŻEWSKA; MARCINIAK-LUKASIAK; KUREK, 2015).

Dessa forma, considerando o fato de que a farinha de trigo é um dos principais ingredientes utilizados para a formulação de produtos como pães e bolos, o desenvolvimento de produtos sem glúten de qualidade, que mantenham as características físicas e sensoriais semelhantes ao alimento convencional equivalente, ainda representa um grande desafio para as indústrias alimentícias (PALABIYIK et al., 2016).

A farinha de arroz é normalmente a mais utilizada para substituir a farinha de trigo em alimentos sem glúten devido à sua coloração, características nutricionais, sabor suave e baixas propriedades alergênicas. Porém, devido ao baixo teor de proteínas e fibras alimentares da farinha de arroz, é importante que sejam acrescentados outros componentes para garantir melhor valor nutricional ao produto (BURESOVÁ et al., 2017). A adição de farinha de leguminosas, como soja, grão-de-bico e ervilha pode ser considerada uma alternativa interessante para utilização em produtos sem glúten, especialmente por apresentarem elevado teor de proteínas, o que auxilia tanto na melhora do valor nutricional quanto nas propriedades tecnológicas da massa (NAQASH et al., 2017).

Além da adição de farinhas proteicas, outras estratégias podem ser utilizadas para que os produtos sem glúten atinjam melhores propriedades sensoriais e nutricionais, melhor textura da massa e maior volume, como adição de amidos nativos e pré-gelatinizados, enzimas, proteínas, fibras e hidrocolóides (NAQASH et al., 2017).

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Glúten

As proteínas que compõe o endosperma de cereais são consideradas misturas heterogêneas complexas, podendo ser classificadas em diferentes frações e tipos de acordo com a solubilidade, sequência de aminoácidos e peso molecular. Com base nas suas propriedades de solubilidade, as proteínas podem ser divididas em: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em etanol 60-70%) e gluteninas (solúveis em soluções ácidas ou alcalinas ou ainda em álcoois na presença de um agente redutor) (HAJAS et al., 2018).

O glúten é um composto protéico formado por frações de prolamina e glutenina e representa cerca de 70-80% das proteínas totais de grãos como trigo, centeio e cevada (LEXHALLER; TOMPOS; SCHERF, 2017). Quando colocado em presença de água e sob ação mecânica, o glúten é capaz de formar uma massa de aparência e textura pegajosa e elástica (SULZBACH; BRAIBANTE; STORGATTO, 2015).

A fração prolamina é composta predominantemente por porções monoméricas constituídas em grande parte pelos aminoácidos prolina e glutamina. De acordo com a sua composição de aminoácidos e o peso molecular, em cada tipo de cereal o grupo prolamínico adquire uma denominação diferente, sendo gliadina no trigo, hordeína na cevada e secalina no centeio. Já a porção glutenina é formada por cadeias poliméricas conectadas por ligações dissulfureto, podendo ser divididas em subunidades de alto peso molecular ($M_r = 67.000-87.000$) e subunidades de baixo peso molecular ($M_r = 32.000-39.000$) (HAJAS et al., 2018; BROMILOW et al., 2017).

O glúten pode ser classicamente definido como um agregado proteico elástico e coeso, que permanece quando a massa de trigo é lavada para remoção do amido e outros componentes solúveis (HAJAS et al., 2018). Assim, o glúten exerce importante papel tecnológico no desenvolvimento de massas alimentícias e produtos de panificação e

confeitaria, interferindo no aumento do volume e retenção de ar na massa, textura, maciez e flexibilidade do miolo e da massa. Apesar de sua função na tecnologia de alimentos, a ingestão de glúten pode desencadear reações de hipersensibilidade em indivíduos com predisposição genética, principalmente no desenvolvimento de doença celíaca (DŁUŻEWSKA; MARCINIAK-LUKASIAK; KUREK, 2015).

1.2.2 Doença Celíaca

A doença celíaca é considerada um problema de ordem mundial, estimando-se que atinja uma prevalência de 1:100-1:300 pessoas no mundo. No Brasil, estima-se que a doença celíaca atinja em torno de 0,3% da população, ou seja, 1 a cada 294 pessoas, sendo que muitos casos ainda permanecem desconhecidos devido às dificuldades de diagnóstico da doença (CAMPOS et al., 2018). É uma doença crônica de origem autoimune, que se desenvolve em indivíduos geneticamente suscetíveis como resultado da ingestão de proteínas formadoras de glúten naturalmente presentes em cereais como trigo, centeio e cevada. É considerada uma doença inflamatória do intestino delgado, associada a uma intolerância alimentar. (ESCUDEIRO-HERNÁNDEZ et al., 2017; MALALGODA; SIMSEK, 2017).

A predisposição genética da doença celíaca está associada principalmente ao gene HLA (antígeno de histocompatibilidade humana), especialmente a manifestação dos alelos HLA-DQA1 e HLA-DQB1, que estão presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos e possuem alta afinidade de ligação às prolaminas do glúten. Esses alelos de HLA induzem os linfócitos TCD4 ao reconhecimento dos peptídeos derivados da digestão das proteínas do glúten, desencadeando uma reação autoimune que, por sua vez, se manifesta através do aumento da expressão de uma citocina pró-inflamatória denominada interleucina 15 (IL15). A IL15 promove a ativação, proliferação e sobrevivência de linfócitos NK (*natural killer*) intra-epiteliais, levando a lesão do tecido intestinal devido a destruição das células epiteliais e atrofia das vilosidades (ESCUDEIRO-HERNÁNDEZ et al., 2017; SHANNAHAN; LEFFLER, 2017).

Em adultos, a doença normalmente se manifesta através de sintomas gastrointestinais como diarreia, dor e inchaço abdominal, flatulência, náuseas, vômitos e falta de apetite, mas também pode apresentar manifestações atípicas como desgaste do esmalte dentário, osteoporose, artrite, infertilidade, dores de cabeça, neuropatia periférica, ataxia, depressão, ansiedade e epilepsia. Associados aos sintomas e em decorrência da má absorção intestinal crônica de nutrientes, os pacientes diagnosticados com doença celíaca podem apresentar perda

de peso excessiva, fadiga e anemia ferropriva, além de deficiência de vitaminas do complexo B (B1-tiamina, B2-riboflavina, B3-niacina, B6-piridoxina, B12-cobalamina) e vitamina E. Em bebês e crianças com até 11 anos de idade, as manifestações da doença são normalmente mais sutis, como diarreia, fadiga e distensão abdominal. Na adolescência, porém, pode ocorrer atraso na puberdade, baixa estatura, sintomas neurológicos e anemia (DeGEORGE et al., 2017).

O principal objetivo do tratamento da doença celíaca é garantir a remissão dos sintomas e a recuperação da histologia intestinal, já que a atrofia e inflamação permanente das vilosidades estão relacionadas à maior morbidade e maior risco de malignidade da doença. Assim, o tratamento mais importante é a adesão rigorosa a uma dieta totalmente isenta de glúten, que pode garantir a melhora dos sintomas e normalização dos marcadores sorológicos em apenas alguns dias ou semanas, além da recuperação do tecido intestinal em cerca de 1 ou 2 anos (WATKINS; ZAWAHIR, 2017).

Entretanto, apesar de sua eficácia no controle da doença, a adesão a uma dieta livre de glúten pode representar inúmeros desafios, especialmente relacionados às restrições alimentares. É importante que o paciente celíaco adquira conhecimentos para promover adequadamente as suas novas escolhas alimentares, eliminando os alimentos que naturalmente contém glúten, como trigo, centeio e cevada e seus derivados, ou que contém traços de glúten por contaminação, como a aveia, além de aderir ao hábito de leitura dos rótulos de produtos industrializados. A alimentação fora de casa também representa um desafio devido aos riscos de contaminação cruzada entre os alimentos que contêm e os que não contêm glúten, que pode ocorrer pela simples manipulação desses alimentos utilizando a mesma bancada, equipamentos e utensílios (WATKINS; ZAWAHIR, 2017; LEBWHOL; SANDER; GREEN, 2017).

Após o diagnóstico, é necessário o acompanhamento regular por profissionais especializados, como médicos e nutricionistas, a fim de se avaliar as possíveis deficiências nutricionais, a manutenção da saúde óssea e intestinal e a própria manifestação da doença. O acompanhamento psicológico também pode ser importante, já que o tratamento e controle da doença exigem adaptações na rotina alimentar e vida social do paciente (LEBWHOL; SANDER; GREEN, 2017).

1.2.3 Grão-de-bico

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) é uma leguminosa capaz de se desenvolver em diferentes ambientes, com condições variadas de solo e clima, sendo cultivado em diversas regiões do planeta, como o subcontinente indiano, norte da África, Oriente Médio, Sul da Europa, Ásia, Américas e Austrália. As cultivares do grão-de-bico podem ser amplamente classificadas em dois grupos: desi e kabuli. As sementes kabuli são as mais utilizadas comercialmente para o consumo humano, pois são maiores e mais robustas, possuem formato arredondado e uniforme e coloração clara e amarelada. Já as sementes desi são pequenas e enrugadas, apresentam formato irregular e coloração escura (marrom, preta ou verde) (MOHAMMED; AHMED; SENGE, 2012).

Os grãos apresentam importante valor nutricional, sendo ricos em proteínas, fibra alimentar, carboidratos, vitaminas (complexo B e vitaminas A, C e K) e minerais como cálcio, fósforo, ferro e zinco, embora a composição química possa variar de acordo com as condições edafoclimáticas da região de cultivo, com a sazonalidade e com a presença de pragas e doenças que afetam as plantas (AGUILAR et al., 2015; ACHARJEE; SARMAH, 2013).

Entre os carboidratos que compõe o grão-de-bico estão os oligossacarídeos, como a rafinose e estaquiose, que podem exercer efeito prebiótico, pois atuam na modulação da microbiota intestinal, já que estimulam o crescimento de bifidobactérias no cólon. Em relação aos lipídios, os principais componentes são os ácidos graxos insaturados como ácido linoleico (ômega 6) e ácido oleico (ômega 9) (DADON; ABBO; REIFEN, 2017).

O grão-de-bico apresenta elevado conteúdo proteico (aproximadamente 18-28%), sendo considerado uma boa fonte de aminoácidos essenciais, especialmente de lisina. A proteína dos grãos possui maior valor biológico quando comparados a outras leguminosas como a soja e os feijões, além de demonstrar importantes propriedades funcionais como a capacidade de emulsificação, formação de espuma e alta absorção em óleo, características que tornam a leguminosa um ingrediente propício para aplicação em produtos de panificação sem glúten, a fim de melhorar a qualidade tecnológica da massa, garantindo maior volume e melhor textura e maciez do miolo (AGUILAR et al., 2015; DADON; ABBO; REIFEN, 2017).

1.2.4 Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família *Poaceae*, sendo considerado um produto de expressiva importância econômica, pois constitui a alimentação básica da maioria da população mundial, sendo cultivado e consumido em todos os

continentes. É uma cultura que apresenta a capacidade de se adaptar a diversos ambientes, com diferentes condições de solo e de clima. Quando comparado a outras culturas, o arroz fica atrás apenas do trigo em extensão de área cultivada (EMBRAPA, 2004).

As camadas mais externas do grão apresentam maiores quantidades de proteínas, lipídios, fibras, minerais e vitaminas, enquanto o centro possui o amido como o principal constituinte. Dessa forma, o processo de polimento do arroz acaba eliminando grande parte dos nutrientes e mantendo o amido em maior quantidade. A composição química do arroz pode sofrer alterações de acordo com o genótipo dos grãos, as condições ambientais e do solo da região de cultivo, o manejo durante a colheita, armazenamento e beneficiamento, especialmente durante o processo de moagem para obtenção do grão polido ou da farinha (AMAGLIANI et al., 2017; MONKS et al., 2013).

Durante o processo de beneficiamento, os grãos de arroz passam por diferentes operações que têm a função de remover o farelo, composto por película, tegumento e germe, preservando o formato do grão inteiro. Além disso, o processamento do arroz pode gerar quantidade significativa de grãos quebrados, sendo que grande parte serão descartados, destinados à indústria cervejeira ou à produção de ração animal. Estima-se que, no Brasil, a cada 100 Kg de arroz com casca beneficiados, sejam gerados aproximadamente 14 Kg de grãos quebrados (AMAGLIANI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014).

Porém, a composição nutricional dos grãos quebrados é semelhante à do grão inteiro, o que poderia atribuir a este resíduo agroindustrial um importante potencial industrial para utilização como matéria prima na produção de farinha e amido modificado, além de apresentar custos reduzidos. A farinha de arroz vem sendo bastante utilizada para produção de alimentos infantis e também como substituta da farinha de trigo na elaboração de alimentos sem glúten devido à sua coloração, elevado teor de amido e às suas propriedades hipoalergênicas (PONGJARUVAT et al., 2014; WANG et al., 2017).

1.2.5 Féculas

O amido é considerado o principal carboidrato de reserva de energia das plantas, sendo que as suas propriedades estruturais e tecnológicas podem ser influenciadas pela origem botânica da fonte de extração. Assim, características como a morfologia do grânulo, o teor de amilose e a presença de outros componentes como proteínas e lipídios podem influenciar no comportamento e na formação de gel do amido. Os amidos possuem inúmeras aplicações industriais, seja na indústria de alimentos ou em outras áreas como farmacêutica, química e

têxtil, sendo mais comumente extraídos de tubérculos como batata e mandioca, ou de cereais como arroz, milho e trigo. (ZHU, 2018; AHMED et al., 2018).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma raiz tuberosa pertencente à família *Euphorbiaceae*, tem origem sul-americana, mas é extensivamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América Latina. É uma planta altamente tolerante às mais diversas condições edafoclimáticas, apresentando alta produtividade mesmo em regiões de clima bastante seco e solos pobres em nutrientes (ZHU, 2015).

A fécula ou amido de mandioca, também conhecido como polvilho doce, é um dos principais produtos obtidos a partir das raízes de mandioca, sendo definido como um pó fino, inodoro e insípido. O amido nativo é caracterizado por formar um gel opaco, com menor viscosidade, menor temperatura de gelatinização, alta tendência à retrogradação e baixa estabilidade ao congelamento e descongelamento (SILVA et al., 2016; SHENG et al., 2018; FIGUEROA-FLÓREZ et al., 2019).

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é um tubérculo que se desenvolve a partir dos caules subterrâneos da planta pertencente à família Solonaceae. É originária da Cordilheira dos Andes, na América do Sul, mas atualmente é cultivada em diversas regiões do planeta, sendo considerada uma das mais importantes culturas alimentares do mundo, atingindo uma estimativa de produção anual de aproximadamente 330 milhões de toneladas (SILVA; LOPES, 2015).

O amido de batata é caracterizado por apresentar grânulos maiores e de alta pureza, com a capacidade de formação de géis claros, espessos e viscoelásticos depois de gelatinizados. Quando comparado com outros amidos comerciais, o amido de batata possui menor temperatura de gelatinização, maior transparência e maior viscosidade (ZHANG et al., 2018; AHMED et al., 2018).

De maneira geral, os grânulos de amido nativo são polímeros constituídos por dois tipos de alfa glucanos: a amilopectina, um polímero altamente ramificado, de elevado peso molecular, com ligações da estrutura linear em α (1 $\rightarrow$ 4) e ligações da estrutura ramificada em α (1 $\rightarrow$ 6); e a amilose, um polímero de cadeia longa e linear, com ligações da estrutura na posição α (1 $\rightarrow$ 4) (DANKAR et al., 2018).

Em estado nativo, o amido é insolúvel em água fria devido às fortes ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias de amilose e amilopectina no interior do grânulo. Na presença de água e aplicação de calor, ocorre o rompimento dos grânulos de amido e consequente incorporação de água, promovendo, assim, o desordenamento da organização das cadeias e o inchamento do grânulo. Esse processo é denominado de gelatinização, pois

promove a formação de gel pelo aumento da viscosidade do meio (ZHU, 2015; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Quando o sistema gelatinizado é submetido ao resfriamento, ocorre o processo conhecido como retrogradação, em que as cadeias desordenadas passam por uma reorganização, voltando a associar-se através das interações moleculares e pontes de hidrogênio. Assim, a água é eliminada do interior do grânulo de amido, provocando a redução do volume e o aumento da firmeza do gel (ZHU, 2015; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

1.2.6 Produtos de panificação sem glúten

O trigo é um dos cereais mais consumidos no mundo, sendo a farinha de trigo o principal ingrediente para formulação de produtos de panificação. O endosperma do grão possui em sua composição algumas proteínas de armazenamento, como a gliadina e glutenina. Estas proteínas são responsáveis pela formação da rede de glúten nos produtos de panificação, o que garante a viscoelasticidade da massa e a retenção de ar durante o processo de fermentação (HATTA; MATSUMOTO; HONDA, 2015).

A farinha de arroz é considerada um dos principais ingredientes utilizados para substituição da farinha de trigo em produtos sem glúten devido à sua coloração, ao elevado teor de amido e à suas propriedades hipoalergênicas. Porém, os produtos de panificação formulados com farinha de arroz apresentam qualidade bastante inferior quando comparados aos produtos tradicionais elaborados com farinha de trigo, especialmente em relação às características físicas e sensoriais, como coloração da massa, sabor, volume reduzido e textura endurecida do miolo (PONGJARUVAT et al., 2014).

Assim, algumas estratégias para melhorar a qualidade de produtos de panificação sem glúten podem ser utilizadas, como a incorporação de alguns componentes como féculas, amidos pré-gelatinizados, hidrocolóides, proteínas, emulsificantes e enzimas. A aplicação desses componentes nas formulações pode garantir melhor estrutura da massa, melhor aceitabilidade do produto e aumento da vida de prateleira (AYALA-SOTO; SERNASALDÍVAR; WELTI-CHANGES, 2017).

O amido é o principal componente das féculas e da farinha de arroz, assumindo papel importante para garantir a estrutura da massa, pois atua como agente espessante, estabilizador de emulsão e agente de geleificação, além de melhorar a absorção e retenção de água. A gelatinização do amido pode, ainda, aumentar o volume e melhorar a consistência dos produtos (PALABIYIK et al., 2016).

As enzimas também podem ser utilizadas para melhorar a qualidade de produtos sem glúten, se apresentando como uma alternativa interessante para substituição dos aditivos químicos, já que não permanecem ativas após o cozimento devido à desnaturação de sua estrutura proteica pela temperatura elevada do processo. A aplicação das enzimas pode influenciar na otimização da fermentação, no aumento de volume da massa, cor da casca e do miolo, melhora do sabor, aceitabilidade do produto e aumento da vida de prateleira. Podem ainda ser utilizadas para a modificação enzimática das farinhas, influenciando nas propriedades de pasta e formação do gel (PALABIYIK et al., 2016).

1.2.7 *Streptomyces* e produção de enzimas

O *Streptomyces* faz parte da família *Streptomycetaceae*, sendo o maior gênero da classe das actinobactérias com mais de 500 espécies já descritas, podendo ser encontrados em ambientes terrestre ou marinhos. São consideradas bactérias aeróbicas, gram positivas e formadoras de micélio, que também se caracterizam por apresentarem elevada quantidade das bases nitrogenadas guanina e citosina em seu genoma (KASHIWAGI; OGINO; KONDO, 2017).

O *Streptomyces* é conhecido por ser uma espécie produtora de antibióticos, de fitohormônios e de metabólitos secundários, como peptídeos e policetídeos, que apresentam importantes atividades biológicas consideradas úteis para aplicação na medicina, veterinária e agricultura. Além disso, o *Streptomyces* também é capaz de secretar enzimas extracelulares, como celulase, xilanase, quitinase, pectinase, amilase, protease e lipase, que promovem a degradação e metabolização de diversos biopolímeros e de uma ampla gama de fontes de carbono (SINGH; CHHATPAR, 2010; KASHIWAGI; OGINO; KONDO, 2017).

A celulose é o principal constituinte estrutural da parede celular dos vegetais, onde é encontrada como microfibrilas com graus variáveis de cristalinidade. Em geral, as microfibrilas de celulose são constituídas por camadas de cadeias lineares de glucanos com ligações β (1-4), sendo interligadas por pontes de hidrogênio (KANNAM et al., 2017). A celulose é considerada o recurso renovável mais abundante da Terra, o que garante importante potencial biotecnológico em várias áreas industriais, como a indústria têxtil, fabricação de papel, fermentação de alimentos e tratamento de águas residuais (WAN et al., 2017).

As ligações glucosídicas β (1-4) da celulose podem ser hidrolisadas pela ação de enzimas denominadas celulasas, gerando como produtos primários glicose, celobiose e celooligosacrídeos. As celulasas são compostas por um complexo de enzimas, sendo que cada

uma delas exerce determinada função durante o processo de hidrólise: as endoglucanases, responsáveis por promover incisões nos polímeros de celulose, expondo as extremidades redutoras e não redutoras; as celobiohidrolases, que atuam sobre as extremidades redutoras e não redutoras, liberando celo-oligossacarídeos e unidades de celobiose; e as β -glucosidases, que clivam a celobiose para liberação da glicose, o que completa o processo de hidrólise (SINGHANIA et al., 2010).

As celulases apresentam amplas aplicações em processos industriais, principalmente no processamento de algodão, reciclagem de papel, extração de sucos de frutas, produção de etanol e aditivos para alimentação animal, porém a produção de celulases ainda apresentam custos elevados. Existe uma grande variedade de micro-organismos envolvidos na produção de celulase, incluindo fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias (SINGHANIA et al., 2010).

O amido é um carboidrato polimérico, que funciona como armazenamento de energia de determinados vegetais, podendo ser hidrolisado em novos polímeros ou moléculas de glicose através da ação de enzimas amilolíticas como a amilase, que atua no rompimento de ligações α 1 $\rightarrow$ 4, e a amiloglusidase, que promove o rompimento de ligações α 1 $\rightarrow$ 6 (OLIVEIRA et al., 2018).

As amilases podem ser genericamente divididas em duas categorias: as endoamilases, que hidrolisam as ligações de maneira aleatória no interior do grânulo de amido, originando oligossacarídeos lineares e ramificados de diferentes comprimentos de cadeia; e as exoamilases, que hidrolisam principalmente as extremidades não redutoras, resultando em produtos finais menores (GUPTA et al., 2003).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar quanto às propriedades químicas, físicas e físico-químicas os pães sem glúten elaborados a partir da mistura de farinha de grãos quebrados de arroz, farinha de grão-de-bico, fécula de batata e fécula de mandioca, adicionados de diferentes proporções de extrato enzimático de alfa amilase, amiloglucosidase e celulase.

1.3.2 Objetivos específicos

- Produzir a farinha de grão-de-bico e de arroz a partir dos grãos quebrados da indústria de arroz.
- Elaborar as misturas com farinhas de grão-de-bico e de arroz e féculas de batata e mandioca.
- Avaliar as características físico-químicas (pH, acidez total titulável e atividade de água), físicas (cor e granulometria) e químicas (composição centesimal, valor energético total e teor de amilose) das farinhas de arroz e de grão-de-bico e das féculas de batata e mandioca.
- Analisar as características tecnológicas (IAA, ISA, propriedades de pasta e propriedades térmicas) das farinhas de arroz e de grão-de-bico e das féculas de batata e de mandioca.
- Elaborar pães sem glúten com maior valor nutricional e mais sustentáveis, utilizando diferentes proporções da mistura com farinhas de arroz e de grão-de-bico e de féculas de batata e de mandioca.
- Avaliar as características físicas (cor, volume e parâmetros de textura), químicas e físico-químicas dos pães sem glúten elaborados com as diferentes proporções da mistura com as farinhas de arroz e grão-de-bico e com as féculas de batata e mandioca e selecionar a melhor mistura.
- Produzir o extrato enzimático de celulase, alfa amilase e amiloglucosidase.
- Elaborar os pães sem glúten aplicando diferentes concentrações dos extratos enzimáticos de celulase, alfa amilase e amiloglucosidase e selecionar a melhor formulação.
- Analisar as características físicas (volume específico, textura, cor), químicas e físico-químicas dos pães elaborados com as diferentes concentrações dos extratos enzimáticos de celulase, alfa amilase e amiloglucosidase.
- Analisar a composição química (umidade, proteínas, cinzas, lipídios, carboidratos totais, fibras totais e valor energético total) e físico-química (pH e acidez total titulável) do pão sem glúten selecionado adicionado de extrato enzimático e da formulação controle (pão sem glúten sem a adição de extrato enzimático).

REFERÊNCIAS

- ACHARJEE, S.; SARMAH, B.K. Biotechnologically generating ‘super chickpea’ for food and nutritional security. **Plant Science**, Limerick, v. 207, p. 108-116, 2013.
- AGUILAR, N.; ALBANELL, E.; MIÑARRO, B.; CAPELLAS, M. Chickpea and tiger nut flours as alternatives to emulsifier and shortening in gluten-free bread. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 62, n. 1, p. 225-232, 2015.
- AHMED, S.; ZHOU, X.; PANG, Y.; XU, Y.; TONG, C.; BAO, J. Genetic diversity of potato genotypes estimated by starch physicochemical properties and microsatellite markers. **Food Chemistry**, Londres, v. 257, p. 368–375, 2018.
- AMAGLIANI, L.; O’REGAN, J.; KELLY, A.L.; O’MAHONY, J.A. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 59, p. 18–26, 2017.
- AYALA-SOTO, F.E.; SERNA-SALDÍVAR, S.O.; WELTI-CHANES, J. Effect of arabinoxylans and laccase on batter rheology and quality of yeast-leavened gluten-free breads. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 73, p. 10–17, 2017.
- BROMILOW, S.; GETTINGS, L.A.; BUCKLEY, M.; BROMLEY, M.; SHEWRY, P.R.; LANGRIDGE, J.I.; MILLS, E.N.C. A curated gluten protein sequence database to support development of proteomics methods for determination of gluten in gluten-free foods. **Journal of Proteomics**, Holanda, v. 163, p. 67–75, 2017.
- CAMPOS, C.G.P.; MENDOZA, A.D.S.; RINALDI, E.C.A.; SKUPIE, S.V. Celiac disease and knowledge of primary care health professional. *Revista de Saúde Pública*, Paraná, v.1, n.2, p. 54-62, 2018.
- DADON, S.B-E.; ABBO, S.; REIFEN, R. Leveraging traditional crops for better nutrition and health - The case of chickpea. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige, v. 64, p. 39-47, 2017.
- DANKAR, I.; HADDARAHA, A.; OMAR, F.E.L. , PUJOLÀ, M.; SEPULCRE, F. Characterization of food additive-potato starch complexes by FTIR and X-ray diffraction. **Food Chemistry**, Londres, v. 260, p. 7–12, 2018.

DeGEORGE, K.C.; FRYE, J.W.; STEIN, K.M.; ROLLINS, L.K.; McCARTER, D.F. Celiac Disease and Gluten Sensitivity. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, Filadélfia, v. 44, n. 4, p. 693–707, 2017.

DŁUŻEWSKA, E.; MARCINIAK-LUKASIAK, K.; KUREK, N. Effect of transglutaminase additive on the quality of gluten-free bread. **CYTA – Journal of Food**, Reims, v.13, n.1, p.80–86, 2015.

JÚNIOR, A.M.M.; GOMES, A.S.; SANTOS, A.B. **Sistema de Cultivo de Arroz irrigado no Brasil**. Pelotas: Embrapa, 2004. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/179868/1/sistema-03.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2018.

SILVA, G.O.; LOPES, C.A. **Sistema de Produção da Batata**. EMBRAPA, 2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1028425/1/SistemadeProducaoBatata.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2018.

ESCUADERO-HERNÁNDEZ, C.; PLAZA-IZURIETA, L.; GARROTE, J.A.; BILBAOB, J.R.; CEGEC; ARRANZ, E. Association of the IL-15 and IL-15R α genes with celiac disease. **Cytokine**, San Diego, v. 99, p. 73–79, 2017.

FIGUEROA-FLÓREZ, J.; CADENA-CHAMORRO, E.M.; RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; SALCEDO-MENDOZA, J.; CIRO-VELÁSQUEZ, H. Cassava starches modified by enzymatic biocatalysis: effect of reaction time and drying method. **Revista DYNA**, Medellín, v. 86, n. 208, p. 162-170, 2019.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, Londres, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HAJAS, L.; SCHERF, K.A.; TÖRÖK, K.; BUGYI, Z.; SCHALL, E.; POMS, R.E.; KOEHLER, P.; TÖMÖSKÖZI, S. Variation in protein composition among wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to identify cultivars suitable as reference material for wheat gluten analysis. **Food Chemistry**, Londres, v. 267, p. 387-394, 2018.

HATTA, E.; MATSUMOTO, K.; HONDA, Y. Bacillolysin, papain, and subtilisin improve the quality of gluten-free rice bread. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 61, p. 41-47, 2015.

KANNAM, S.K.; OEHME, D.P.; DOBLIN, M.S.; GIDLEY, M.J.; DOWNTON, M.T. Hydrogen bonds and twist in cellulose microfibrils. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington Oxford, v. 175, p. 433-439, 2017.

KASHIWAGI, N.; OGINO, C.; KONDO, A. Production of chemicals and proteins using biomass-derived substrates from a *Streptomyces* host. **Bioresource Technology**, Nova York, v. 245, p. 1655–1663, 2017.

LEBWOHL, B.; SANDERS, D.S.; GREEN, P.H.R. Coeliac disease. **The Lancet**, publicação online, 28 de jul., 2017. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8). Acesso em: 20 out. 2018.

LEXHALLER, B.; TOMPOS, C.; SCHERF, K.A. Fundamental study on reactivities of gluten protein types from wheat, rye and barley with five sandwich ELISA test kits. **Food Chemistry**, Londres, v. 237, p. 320–330, 2017.

MALALGODA, M.; SIMSEK, S. Celiac disease and cereal proteins. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 68, p. 108-113, 2017.

MOHAMMED, I.; AHMED, A.R.; SENGE B. Dough rheology and bread quality of wheat–chickpea flour blends. **Industrial Crops and Products**, St. Martin d’Heres, v. 36, n. 1, p. 196-202, 2012.

MONKS, J.L.F.; VANIER, N.L.; CASARIL, J.; BERTO, R.M.; OLIVEIRA, M.; GOMES, C.B.; CARVALHO, M.P.; DIAS, A.R.G.; ELIAS, M.C. Effects of milling on proximate composition, folic acid, fatty acids and technological properties of rice. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 30, n. 2, p. 73–79, 2013.

NAQASH, F.; GANI, A.; GANI, A.; MASOODI, F.A. Gluten-free baking: Combating the challenges - A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige, v. 66, p. 98-107, 2017.

OLIVEIRA, C.A.O.; ANSELM, A.A.; KOLLING, D.F.; FINGER, M.I.F.; DALLA CORTE, V.F.; DILL, M.D. Farinha de arroz e derivados como alternativas para a cadeia produtiva do arroz. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 16, n. 1, p. 61-67, 2014.

OLIVEIRA, H.M.; PINHEIRO, A.Q.; FONSECA, A.J.M.; CABRITA, A.R.J., MAIA, M.R.G. The intensification of amyloglucosidase-based saccharification by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdã, v. 49, p. 128–136, 2018.

PALABIYIK, I.; YILDIZ, O.; TOKER, O.S.; CAVUS, M.; CEYLAN, M.M.; YURT, B. Investigating the addition of enzymes in gluten-free flours e the effect on pasting and textural properties. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 69, p. 633-641, 2016.

PONGJARUVAT, W., METHACANON, P., SEETAPAN, N., FUONGFUCHAT, A., GAMONPILAS, C. Influence of pregelatinised tapioca starch and transglutaminase on dough rheology and quality of gluten-free jasmine rice breads. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 36, p. 143-150, 2014.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. Química de alimentos: carboidratos – Amido. 2ª ed. São Paulo: Editora Blucher, 2007.

SHANNAHAN, S.M.D.; LEFFLER, D.A. Diagnosis and Updates in Celiac Disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, Filadélfia, v. 27, n. 1, p. 79–92, 2017.

SHENG, L.; LI, P.; WU, H.; LIU, Y.; HAN, K.; GOUDA, M.; TONG, Q.; MA, M.; JIN, Y. Tapioca starch-pullulan interaction during gelation and retrogradation. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 96, p. 432–438, 2018.

SILVA, P.A.; MELO, W.S.; CUNHA, R.L.; CUNHA, E.F.M.; LOPES, A.S.; PENA, R.S. Characterization of roots and cassava starch from three cassava varieties produced in the state of Pará. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 18, n. 2, p. 147-154, 2016.

SINGH, A.K.; CHHATPAR, H.S. Optimization of protease production by *Streptomyces* sp. A6 using statistical approach for reclamation of shellfish waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Holanda, v. 26, n. 9, p. 1631-1639, 2010.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEYA, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial celulasas. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SULZBACH, A.C.; BRAIBANTE, M.E.F.; STORGATTO, G.A. The Biochemistry of Gluten through Thematic Workshops. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 767-776, 2015.

WAN, J.; HAN, J.; WANG, Y.; NI, L.; WANG, L.; LI, C. Switch on/off of cellulase activity based on synergetic polymer pair system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 126, p. 1-7, 2017.

WANG, S.; LI, P.; ZHANG, T.; YU, J.; WANG, S.; COPELAND, L. In vitro starch digestibility of rice flour is not affected by method of cooking. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 84, p. 536-543, 2017.

WATKINS, R.D.; ZAWAHIR, S. Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity. **Pediatric Clinics of North America**, Filadélfia, v. 64, n. 3, p. 563–576, 2017.

ZHANG, L.; ZHAO, Y.; HUA, W.; QIAN, J-Y.; DING, X-L.; GUAN, C-R.; LU, Y-Q.; CAO, Y. Multi-scale structures of cassava and potato starch fractions varying in granule size. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington Oxford, v. 200, p. 400–407, 2018.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington Oxford, v. 122, p. 456–480, 2015.

ZHU, F. Relationships between amylopectin internal molecular structure and physicochemical properties of starch. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige , v. 78, p. 234–242, 2018.

2. CAPÍTULO 2

ARTIGO 1 - POTENCIAL DE FARINHAS DE ARROZ E DE GRÃO-DE-BICO E FÉCULAS DE BATATA E MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE PANIFICADOS

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de utilização de farinhas de grão-de-bico e arroz e de féculas de batata e de mandioca para a formulação de panificados a partir da caracterização química, física, físico-química e tecnológica. As características físicas das farinhas e féculas foram analisadas a partir do perfil granulométrico e dos parâmetros instrumentais de cor. Para a composição química e físico-química foram determinados: proteínas, lipídios, cinzas, umidade, carboidratos disponíveis, fibra alimentar, solúvel e insolúvel, valor energético total, teor de amilose, atividade de água, pH e acidez total titulável. Para a caracterização tecnológica foram avaliados o índice de solubilidade e absorção em água, as propriedades térmicas e propriedades de pasta. Quando comparada à farinha de arroz e às féculas de batata e mandioca, a farinha de grão-de-bico apresentou maior conteúdo de proteínas ($17,08 \text{ g } 100^{-1}$), lipídios ($5,70 \text{ g } 100^{-1}$), cinzas ($2,99 \text{ g } 100^{-1}$) e fibra alimentar total ($14,48 \text{ g } 100^{-1}$). As féculas de batata e mandioca apresentaram conteúdo reduzido de proteínas, lipídios, cinzas e fibra alimentar, porém apresentaram elevado teor de carboidratos disponíveis, demonstrando a qualidade e pureza do material utilizado. Para o teor de amilose, foram encontrados os valores de $19,77 \text{ g } 100^{-1}$ para farinha de grão-de-bico, $26,83 \text{ g } 100^{-1}$ para farinha de arroz, $28,36 \text{ g } 100^{-1}$ para fécula de mandioca e $29,60 \text{ g } 100^{-1}$ para fécula de batata. Em relação às propriedades tecnológicas, a farinha de arroz apresentou maior valor de retrogradação (337 RVU), e as féculas de mandioca e batata os maiores valores de quebra de viscosidade (367 RVU e 1285 RVU, respectivamente) e viscosidade máxima (514,58 RVU e 1447,71 RVU, respectivamente). Assim, foi possível concluir que as farinhas e féculas analisadas apresentam propriedades físicas, físico-químicas e tecnológicas com potencial de aplicação na produção de produtos de panificação.

Palavras-chave: *Cicer arietinum* L., *Manihot esculenta* Crantz, *Solanum tuberosum* L., *Oryza sativa* L., propriedades térmicas, propriedades de pasta.

2.1 Introdução

Farinhas são definidas como “produtos obtidos das partes comestíveis de uma ou mais espécies de cereais, leguminosas, frutos, sementes, tubérculos e rizomas por moagem ou outros processos tecnológicos considerados seguros para produção de alimentos”, e amidos ou féculas são “produtos extraídos de partes comestíveis de cereais, tubérculos, raízes ou rizomas” (BRASIL, 2005).

O amido é um polímero de glicose presente na parede celular dos vegetais, que atua como a principal fonte de reserva de energia das plantas. O grânulo de amido é composto por porções de amilose, formada por cadeias lineares unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$, e porções de amilopectina, que apresenta ramificações unidas por ligações $\alpha(1-6)$. A amilose é mais propensa à retrogradação e capaz de formar géis mais rígidos e filmes mais fortes, enquanto a amilopectina apresenta um processo mais lento de retrogradação e resulta em géis menos consistentes e filmes mais fracos. Assim, a origem botânica do amido, bem como o teor de amilose e amilopectina presente no grânulo, pode influenciar as suas propriedades de pasta e estrutura do gel (WITCZAK et al., 2016).

O amido de mandioca, também conhecido como fécula ou polvilho doce, é um dos principais produtos obtidos a partir das raízes de mandioca, sendo caracterizado por formar um gel mais opaco e com menor temperatura de gelatinização (SILVA et al., 2016; SHENG et al., 2018; FIGUEROA-FLÓREZ et al., 2019). Já o amido de batata pode ser caracterizado por formar um gel mais transparente, com menor temperatura de gelatinização e maior viscosidade (ZHANG et al., 2018; AHMED et al., 2018).

A composição nutricional do grão-de-bico pode sofrer alterações de acordo com as condições de solo e clima da região de cultivo. Porém, de uma maneira geral, os grãos apresentam elevado teor de carboidratos (50-70%) e maior conteúdo de lipídios e fibras quando comparados à outras leguminosas. O grão-de-bico é considerado uma boa fonte de proteína e aminoácidos essenciais, além de apresentar importante conteúdo de vitaminas do complexo B, vitamina A, C e K, e minerais como cálcio, ferro, fósforo e zinco. Normalmente, o grão-de-bico é consumido como grão inteiro, mas também pode ser utilizado como

ingrediente na forma de farinha para o enriquecimento proteico de diversas preparações (MOHAMMED; AHMED; SENGE, 2012; ACHARJEE; SARMAH, 2013).

O arroz é considerado uma das principais culturas alimentares do mundo, sendo cultivado e consumido em mais de 100 países. O grão maduro é colhido com casca e precisa ser processado para ser consumido, pois apenas a cariopse é comestível. A variabilidade de espécies, condições do ambiente de cultivo e formas de processamento podem influenciar a composição e as propriedades dos grãos de arroz e de suas frações de moagem, mas normalmente os grãos polidos apresentam cerca de 80% de carboidratos e 6% de proteínas (AMAGLIANIA et al., 2017). Durante o beneficiamento do arroz são gerados em média 14% de grãos quebrados, considerados um subproduto de baixo valor comercial da indústria arrozeira. Porém, os grãos quebrados apresentam a mesma composição química dos grãos inteiros, podendo ser utilizados na elaboração de farinhas que, por sua vez, são aplicadas na indústria de alimentos e na produção de panificados (SILVA; ASCHERI, 2009).

Assim, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização química, física, físico-química e tecnológica de farinhas de grão-de-bico e de arroz e de féculas de mandioca e de batata, visando verificar o potencial de aplicação na produção de produtos panificados.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material

Os grãos quebrados utilizados na elaboração da farinha de arroz foram doados pela empresa Cristal Alimentos, situada na BR 153, em Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil. A fécula de mandioca foi doada pela empresa FEBELA Agroindustrial Ltda., localizada na cidade de Bela Vista de Goiás, Goiás, Brasil. O grão-de-bico utilizado para elaboração da farinha e a fécula de batata (Moinho de Pedra, Goianira, Goiás) foram adquiridos no mercado local da cidade de Goiânia, Goiás, Brasil.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Elaboração das farinhas de arroz e de grão-de-bico

As farinhas de arroz e de grão-de-bico foram elaboradas no setor de Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

Para obtenção da farinha de grão-de-bico, os grãos crus foram inicialmente mantidos em imersão em água, a temperatura ambiente, por aproximadamente 24 horas. Em seguida, a água foi descartada, os grãos úmidos foram triturados em multiprocessador (Philips Walita Ri7630, Itapevi, Brasil) e, então, secos em estufa com circulação de ar forçada (Tecnal TE-394/3, Piracicaba, Brasil) a 45C° até que atingissem aproximadamente 10% de umidade.

Os grãos quebrados de arroz e os grãos-de-bico triturados foram moídos em moinho de facas e as farinhas foram peneiradas em peneira com malha de 60 mesh para padronização da granulometria. As farinhas de arroz e de grão-de-bico elaboradas foram acondicionadas em sacos de polietileno e congeladas até o momento de sua utilização e realização das análises.

2.2.2.2 Caracterização química, física, físico-química e tecnológica das farinhas e féculas

2.2.2.2.1 Perfil granulométrico

O perfil granulométrico das farinhas e das féculas foi realizado utilizando-se equipamento vibratório (Bertel, 4819, Caieiras, Brasil), em velocidade constante, por tempo determinado de 10 minutos. Foram utilizados um fundo e uma série de peneiras com as seguintes aberturas de malha: 0,595mm, 0,250mm, 0,177mm, 0,149mm, 0,125mm e 0,074mm. Para determinação do perfil granulométrico foi realizada a pesagem das peneiras contendo o material retido (ZANOTTO; BELLAYER, 1996). A análise foi realizada em triplicata.

2.2.2.2.2 Parâmetros instrumentais de cor

As análises dos parâmetros instrumentais de cor das farinhas e das féculas foram realizadas utilizando-se um colorímetro (Bankinh Meter Minolta, BC-10, Ramsey, USA), de acordo com o sistema CIE L*a*b*. Os resultados foram expressos em: valores de L* (luminosidade), que variam do preto (0) ao branco (100); valores de a*, que variam do verde (-60) ao vermelho (+60); e valores de b*, que variam do azul (-60) ao amarelo (+60). (HARDER; CANNIATTI-BRAZACA; ARTHUR, 2007). Foram realizadas 10 replicatas para a análise dos parâmetros instrumentais de cor. Também foram calculados o índice Croma (C*) e ângulo Hue, de acordo com as equações 1 e 2:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Equação 1})$$

$$H^* = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

C* = cromaticidade

H* = ângulo Hue

Tan⁻¹ = arco tangente

a* = coordenada de cromaticidade entre verde e vermelho

b* = coordenada de cromaticidade entre azul e amarelo

2.2.2.2.3 Composição química

As análises de composição química das farinhas e das féculas foram realizadas em quadruplicata, segundo as normas descritas por AOAC (2012), de acordo com os seguintes procedimentos: o teor de proteína foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl (AACC 46-13), seguindo as etapas de digestão, destilação e titulação, e utilizando-se 6,25 como fator de conversão em proteína bruta para farinha de grão-de-bico, fécula de batata e fécula de mandioca, e 5,95 como fator de conversão para farinha de arroz; o teor de lipídios foi determinado utilizando-se extrator Soxhlet e éter de petróleo (AOAC 920.39 C); a umidade foi determinada por dessecação da amostra em estufa a 105°C até atingir peso constante (AOAC 920.39); o teor de cinzas foi determinado por carbonização da amostra, seguida por incineração completa em mufla a 550°C (AOAC 900.02); o teor de fibras totais foi determinado a partir do método enzimo-gravimétrico. O teor de carboidratos totais e valor energético total foram calculados de acordo com FAO (2003). O teor de carboidratos disponíveis foi determinado por diferença, subtraindo-se o valor de fibras totais do valor de carboidratos totais (subtraindo-se de cem os valores obtidos para umidade, cinzas, proteínas e lipídios). O valor enérgico foi estimado através dos valores de conversão de Atwater, multiplicando-se o conteúdo de carboidratos disponíveis e o de proteínas por 4, de lipídios por 9 e o de fibra alimentar total por 2, sendo que a soma desses produtos constituiu o valor energético total.

2.2.2.2.4 Atividade de água, acidez total titulável e potencial hidrogeniônico (pH)

As análises de atividade de água, acidez total titulável e pH foram realizadas de acordo com as normas descritas por AOAC (2012). As análises foram realizadas em quadruplicata.

A atividade de água foi determinada utilizando-se higrômetro Acqua Lab (Decagon Devices, Series 3TE, Pullman, USA), á temperatura constante ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$). O pH foi determinado utilizando-se potenciômetro (Tecnal, TEC-51, Piracicaba, Brasil). A acidez total titulável foi determinada através de titulação com solução de NaOH 0,1N para as farinhas de arroz e de grão-de-bico e 0,01N para as féculas de batata e de mandioca.

2.2.2.2.5 Teor de amilose

O teor de amilose das amostras foi analisado de acordo com metodologia proposta por Juliano (1979). Foi utilizada como indicador uma solução de iodeto de potássio, sendo que o complexo formado foi medido por espectrofotometria. Em 150mg de amostra foi adicionado 1mL de álcool etílico 95% e 9mL de solução NaOH 1,0N. A solução foi aquecida em banho-maria a 70°C durante 9 minutos. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico e o volume completado com água destilada. Foram retiradas amostras do amido gelatinizado em quantidades de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5mL e acidificadas com ácido acético nas quantidades de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1mL, respectivamente. Foi então acrescentado o indicador de iodo nas quantidades de 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,20 mL, respectivamente, e, em seguida, água destilada em 9,8; 9,7; 9,5; 9,4; 9,2 mL, respectivamente. Os tubos foram mantidos em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos, sendo então realizada a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 590nm. A curva de calibração foi obtida através de diluições de amilose de batata. A análise foi realizada em triplicata.

2.2.2.2.6 Índice de absorção em água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)

O IAA e o ISA em água foram determinados de acordo com metodologia proposta por Anderson et al. (1969). Em um tubo de centrífuga previamente tarado foram colocados 1,25 g de amostra e 15 mL de água destilada a aproximadamente 28°C . Os tubos foram, então, levados para agitação em banho-maria Dubnoff (TECNAL, TE-0532, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 25°C . Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos em centrífuga (Best Etetronics, TGWS, Xangai, China). O líquido sobrenadante foi colocado em placa de Petri previamente tarada, que foi levada para estufa até atingir peso constante. Os tubos contendo o precipitado foram pesados em balança analítica para determinação do IAA. A análise foi realizada em triplicata.

O IAA foi calculado a partir da equação 3:

$$IAA = \frac{RC}{A} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

RC= massa do resíduo da centrifugação (g)

A= massa da amostra (g)

O ISA foi calculado pela relação entre o peso do resíduo da evaporação e o peso da amostra em base seca, de acordo com a equação 4:

$$ISA = \left(\frac{RE}{A} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

RE= peso do resíduo de evaporação (g)

A= peso da amostra (g)

2.2.2.2.7 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas das amostras das farinhas e das féculas foram obtido através de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (TA Instruments, Q20, New Castle, UK), em cápsula hermética com adição de água, considerando variação de temperatura de 40° C a 160° C e taxa de aquecimento de 10°C por minuto. Foi utilizada uma cápsula hermética vazia como referência. Foram determinadas a variação de entalpia (ΔH) e as temperaturas inicial (T_o), de pico (T_p) e final (T_c). A análise foi realizada em triplicata.

2.2.2.2.8 Propriedades de pasta (RVA)

As características visco-amilográficas das amostras de farinha foram determinadas através de equipamento Rapid Vico Analyser (RVA) (Perten, RVA 4500, Huddinge, Suécia), utilizando-se como padrão a umidade em 14%. Foram obtidos os valores de viscosidade mínima, quebra de viscosidade, viscosidade final, tendência á retrogradação, temperatura de pico e temperatura de gelatinização.

2.2.2.3 Análise estatística

Os dados foram expressos através de média e desvio padrão.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Perfil granulométrico

A tabela 1 representa os resultados obtidos para análise de granulometria das farinhas e féculas utilizadas nesse estudo. A fécula de batata apresentou maior índice de uniformidade das partículas, enquanto a fécula de mandioca obteve menor índice de uniformidade. As farinhas de arroz e grão-de-bico apresentaram cerca de 60% das partículas retidas nas peneiras de 80 e 60 mesh, respectivamente.

Tabela 1. Perfil granulométrico para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)

Peneira ABNT (mesh)	Abertura da malha (mm)	Porcentagem de farinha retida em cada peneira			
		FGB (%)	FA (%)	FM (%)	FB (%)
30	0,595	5,54 ± 0,456	0,60 ± 0,007	0,84 ± 0,007	0,27 ± 0,035
60	0,250	62,89 ± 3,50	5,93 ± 0,579	2,27 ± 0,325	0,39 ± 0,028
80	0,177	25,48 ± 3,80	61,16 ± 0,98	9,23 ± 0,912	1,06 ± 0,102
100	0,149	0,24 ± 0,148	12,16 ± 3,97	8,18 ± 0,212	0,88 ± 0,032
120	0,125	0,28 ± 0,042	17,69 ± 0,77	27,33 ± 0,50	2,19 ± 0,308
200	0,074	0,02 ± 0,014	4,08 ± 0,028	42,84 ± 0,85	2,49 ± 0,162
Fundo	0	0,01 ± 0,005	1,07 ± 0,205	5,31 ± 1,838	93,71 ± 1,02
Módulo de finura	-	4,71	3,51	1,73	0,16

Valores expressos em média e desvio padrão

A legislação brasileira estabelece parâmetros específicos de granulometria apenas para farinha de trigo, sendo então aplicada para comparação das farinhas e féculas utilizadas na pesquisa. Considerando que a granulometria estabelecida pela Instrução Normativa nº8/2005

é de 0,250 mm, a farinhas de arroz e as féculas de batata e mandioca possuem esta característica semelhante à farinha de trigo comercializada, já que a maior porcentagem das partículas encontraram-se nas peneiras com abertura de malha menor ou igual a 0,250 mm (BRASIL, 2005).

Wu et al. (2019) analisaram pães sem glúten elaborados com farinha de arroz de diferentes granulometrias. Os pães formulados com farinha ultrafina, com partículas de tamanho variando entre 0,020-0,086 mm, apresentaram menor volume específico, maior dureza e quase nenhuma porosidade do miolo quando comparados aos pães formulados com farinha de maior granulometria, com partículas de tamanho variando entre 0,043-1,91 mm e entre 0,024-1,08 mm. Segundo os autores, o alto nível de moagem das farinhas pode danificar a estrutura do grânulo de amido, interferindo nas propriedades de viscosidade e elasticidade da massa e dificultando a sua aplicação em produtos de panificação.

Hera, Rosell e Gomez (2014) elaboraram pães sem glúten com farinhas de arroz de diferentes granulometrias, com partículas de tamanho menor que 0,132 mm e com tamanhos de 0,132-0,200 mm, observando diferenças significativas no aumento do volume e na redução da dureza dos pães quando foram utilizadas as farinhas de maior granulometria. Partículas mais finas tendem a absorver mais água e formar uma massa mais fraca, o que dificulta a retenção do gás liberado durante a fermentação, gerando pães com volume reduzido e dureza elevada.

De acordo com os resultados apresentados nos estudos de Wu et al. (2019) e Hera, Rosell e Gomez (2014), foi possível compreender que farinhas que apresentam granulometria aproximadamente entre 0,100 e 0,200 mm são capazes de produzir pães com maior retenção de ar na massa, maior volume específico e menos dureza. Assim, considerando que as farinhas de arroz e grão-de-bico avaliadas nessa pesquisa apresentaram a maior porcentagem de partículas retidas nas peneiras de 60 e 80 mesh, podem ser consideradas apropriadas para a utilização em produtos de panificação.

2.3.2 Parâmetros instrumentais de cor

A tabela 2 apresenta os valores obtidos a partir da análise dos parâmetros instrumentais de cor para FGB, FA, FM e FB.

Tabela 2. Parâmetros de cor para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)

	FGB	FA	FM	FB
L*	92,33 ± 0,05	92,83 ± 0,15	98,36 ± 0,20	97,86 ± 0,05
a*	1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,23 ± 0,05	0,13 ± 0,05
b*	15,03 ± 0,05	7,3 ± 0,1	2,56 ± 0,05	2,43 ± 0,05
Croma	15,06 ± 0,06	7,31 ± 0,1	2,57 ± 0,05	2,43 ± 0,05
Hue	86,19 ± 0,36	86,87 ± 0,73	84,78 ± 1,41	86,85 ± 1,41

Díaz et al. (2018) analisaram diferentes amostras de amido de mandioca, indicando valores de L* que variaram entre 97 e 98, resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para as féculas de mandioca e de batata. Segundo os autores, valores elevados para o parâmetro de luminosidade (L*) estão associados à qualidade dos amidos, indicando maior pureza dos produtos.

Os parâmetros de a* e b* para as féculas de batata e mandioca desse estudo apresentaram valores próximos à neutralidade, podendo também ser um indicativo da pureza do produto e das condições adequadas do seu processamento, já que para Díaz et al. (2018) a presença de minerais e outros contaminantes está relacionada à alteração de cor das féculas.

O valor elevado do parâmetro b* para a farinha de grão-de-bico está relacionado, possivelmente, à coloração amarelada das sementes que, segundo Oliveira, Schmiele e Steel (2017), é devido a sua composição de vitaminas e minerais, especialmente ao conteúdo de carotenoides. As sementes de grão-de-bico apresentam importante conteúdo de beta caroteno, que atua como precursor da vitamina A, além de luteína e zeaxantina, considerados potentes antioxidantes (OLIVEIRA; SCHMIELE; STEEL, 2017; DADON; ABBO; REIFEN, 2017).

Essa característica da FGB pode ser considerada uma vantagem para a sua utilização em alguns produtos. Para Aguilar et al. (2015), devido à sua coloração amarelada, a FGB pode ser utilizada na formulação de panificados, principalmente de pães sem glúten, para intensificar a coloração da massa, tornando-os produtos mais atrativos ao consumidor. Além disso, os pães produzidos com FGB apresentam a casca mais escura devido à reação de Maillard, provocada pela interação entre proteínas e carboidratos presentes na farinha, o que também contribui para maior aceitação do produto.

Os resultados obtidos para o parâmetro b* da farinha de arroz indicam que a coloração amarelada pode estar diretamente relacionada à quantidade de farelo presente nos grãos quebrados de arroz. Segundo Roy et al. (2008), a quantidade de farelo nos grãos pode variar

de acordo com a variedade do arroz, com as condições ambientais e práticas de cultivo, sendo que a coloração dos grãos polidos e da farinha pode sofrer alterações e apresentar tonalidade mais escurecida e amarelada de acordo com o grau de remoção do farelo durante o processo de moagem e beneficiamento, essas características podem se acentuar para os grãos quebrados de arroz já que esses carregam mais impurezas que os grãos polidos.

O Croma (C^*) é utilizado para identificar o nível de saturação da cor, estando diretamente relacionado à concentração do pigmento na amostra e, portanto, quanto mais altos os valores de Croma, maior é a intensidade da cor percebida pelos seres humanos. O ângulo Hue está relacionado à tonalidade original da cor e, assim, próximo de zero a cor tende ao vermelho, em torno de 90° tende ao amarelo, em 180° ao verde e em 270° ao azul. (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013). Os valores obtidos para o ângulo Hue demonstraram que a tonalidade das amostras analisadas se aproxima de uma coloração amarelada, porém as féculas apresentaram maior tendência à neutralidade devido aos valores bastante reduzidos de Croma. O valor de Croma obtido para FGB, associado ao parâmetro b^* , indica que a tonalidade amarelada é aparente e pode interferir de forma positiva ou negativa na coloração do produto final, dependendo do produto desejado.

2.3.3 Composição química, teor de amilose, acidez total titulável e potencial hidrogeniônico (pH)

A tabela 3 representa os resultados obtidos a partir das análises químicas e físico-químicas para FGB, FA, FM e FB.

Tabela 3. Composição centesimal, fibra alimentar total, fibra insolúvel, fibra solúvel, pH, acidez total titulável, atividade de água e teor de amilose para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)

Análise	FGB	FA	FM	FB
Umidade ¹	7,70 ± 0,113	10,53 ± 0,147	10,61 ± 0,043	10,37 ± 0,336
Cinzas ¹	2,99 ± 0,027	0,62 ± 0,016	0,13 ± 0,012	0,38 ± 0,002
Proteína ¹	17,08 ± 0,048	6,72 ± 0,103	0,36 ± 0,047	0,24 ± 0,023
Lipídios ¹	5,70 ± 0,069	1,05 ± 0,051	0,12 ± 0,008	0,24 ± 0,018
Fibra alimentar total ¹	14,48 ± 0,74	3,13 ± 0,76	0,4 ± 0,46	0,3 ± 0,64
Fibra insolúvel ¹	11,96 ± 0,48	1,72 ± 0,46	0	0
Fibra solúvel ¹	2,52	1,41	0	0
Carboidratos disponíveis ¹	52,02	77,93	88,35	88,44
Valor energético total ²	356,73	354,40	356,87	357,58
pH ³	6,52 ± 0,07	6,19 ± 0,07	6,32 ± 0,08	6,54 ± 0,02
Acidez Total Titulável ³	0,85 ± 0,037	0,17 ± 0,009	0,05 ± 0,001	0,04 ± 0,0008
Atividade de água	0,42 ± 0,016	0,51 ± 0,001	0,50 ± 0,001	0,44 ± 0,003
Teor de amilose ¹	19,77	26,83	28,36	29,60

Valores expressos em média e desvio padrão. ¹expresso em g 100 g⁻¹; ²kcal 100 g⁻¹; ³g de NaOH 100 g⁻¹

A RDC n°263 de 22 de setembro de 2005, que aprova o “Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos”, estabelece valores máximos para o teor de umidade como sendo 15 g 100g⁻¹ para farinhas, 21 g 100g⁻¹ para fécula de batata e 18 g 100g⁻¹ para fécula de mandioca. Assim, o teor de umidade das farinhas de arroz e de grão-de-bico e das féculas de batata e mandioca utilizadas no estudo está de acordo com o preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2005).

Segundo Cardoso et al. (2019), a umidade de farinhas abaixo de 14 g 100g⁻¹ é importante para garantir maior tempo de vida útil ao produto, pois é um fator determinante

para a inibição do crescimento e desenvolvimento de fungos e micro-organismos. Sendo assim, pode-se afirmar que as farinhas e féculas desse estudo estão em uma faixa segura de umidade para inibição do crescimento e desenvolvimento de fungos e micro-organismos.

Devido á ausência de legislação brasileira específica para fécula de batata e farinha de arroz e de grão-de-bico, foram considerados os valores de referência para pH (4,0-7,0) e acidez total titulável (1 g KOH 100 g⁻¹) sugeridos para farinha de trigo e fécula de mandioca, de acordo com a Instrução Normativa nº8/2005 e a Instrução Normativa nº23/2005, respectivamente.

O pH das amostras de farinhas e féculas analisadas nessa pesquisa variou de 6,19 a 6,54 (Tabela 3). O valor de pH é um parâmetro importante para determinação da qualidade de farinhas e féculas, pois alterações excessivas no pH podem indicar a aplicação de tratamentos químicos ao produto, como o branqueamento por cloro (CARDOSO et al., 2019). Além disso, a redução do pH e o aumento da acidez total titulável podem ser indicativos de contaminação microbiológica, já que a atividade biológica de fungos e bactérias levam á rancidez hidrolítica, promovendo o aumento dos teores de ácidos graxos livres. O aumento da acidez total titulável também pode indicar a ocorrência da rancidez oxidativa dos lipídios devido á condições inadequadas de embalagem e armazenamento, resultando em alterações indesejáveis nas características sensoriais das farinhas e féculas (ORTOLAN; HECKTHEUER; MIRANDA, 2010).

Segundo Elgeti, Jekle e Becker (2015), para que a aeração da massa dos pães advinda da fermentação possa resultar em um miolo fino e com baixa densidade, o meio deve oferecer condições favoráveis ao micro-organismo, como temperatura, umidade, disponibilidade de substrato, força iônica e valor de pH. De acordo com Couri e Giada (2016), as farinhas utilizadas na panificação devem apresentar pH e acidez dentro dos limites adequados estabelecidos pela legislação (pH entre 4,0 e 7,0 e acidez máxima de 1 g g⁻¹), já que modificações nesses parâmetros podem interferir de forma negativa nos efeitos da fermentação, além de provocar alterações indesejáveis na coloração e sabor do produto final. As farinhas e féculas analisadas nessa pesquisa obtiveram valores de pH e acidez dentro dos limites estabelecidos pela legislação e, portanto, apresentaram características adequadas para aplicação em produtos de panificação, além de indicar as condições adequadas de conservação, armazenamento e processamento dos produtos.

Para a farinha de grão-de-bico, o valor de cinzas determinado é semelhante ao encontrado por Kaur, Singh e Sodhi (2005) de 3,1g 100g⁻¹ e Gómez et al. (2008) de 3,31g 100g⁻¹. Segundo Dadon, Abbo e Reifen (2017), o consumo regular de grão-de-bico pode

contribuir de forma significativa para o aporte de minerais como potássio, fósforo, cálcio, ferro, manganês e zinco da dieta humana.

Para a farinha de arroz (FA), o valor de cinzas foi semelhante aos resultados descritos por Amagliani et al. (2017) de $0,8 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e Cho, Lee e Eun (2019) de $0,99 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$.

Em trabalho de revisão realizado por Zhu (2015), foram relatados valores de cinzas para fécula de mandioca que variaram de $0,03$ a $0,33 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, demonstrando que o valor encontrado neste estudo para fécula de mandioca é semelhante ao encontrado por outros autores. Martínéz et al. (2019) analisaram o amido de diferentes variedades de batata, encontrando teores de cinzas que variaram de $0,22$ a $0,29 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, valores ligeiramente menores ao determinado nessa pesquisa, possivelmente pelas diferenças nas condições de produção. Considerando que a legislação brasileira sugere $0,75 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ (BRASIL, 2005) como o teor máximo de cinzas para produtos amiláceos derivado de mandioca, as amostras avaliadas encontram-se dentro do padrão estabelecido.

As cinzas podem ser definidas como o resíduo mineral fixo resultante da incineração da matéria, estando relacionado às características intrínsecas e composição do alimento. Porém, valores acima do esperado podem ser indicativos de contaminação do produto por material estranho devido à inadequações ou falhas nas etapas de processamento, transporte ou armazenamento (SOUZA et al., 2008). Todas as farinhas e féculas utilizadas na pesquisa apresentaram teor de cinzas semelhante ao encontrado por outros autores, demonstrando a provável ausência de contaminação e a qualidade dos produtos.

A FGB apresentou valores de lipídios e proteínas próximos aos descritos por Kaur, Singh e Sodhi (2005) de $5,5 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para lipídios e de $19,9 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para proteínas e por Gómez et al. (2008) de $6,2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para lipídios e de $23,46 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para proteínas. Além de ser considerado um alimento fonte de proteínas de origem vegetal (BRASIL, 1998; BRASIL, 2005), as características de qualidade da farinha de grão-de-bico vem tornando-a uma alternativa para melhorar as propriedades tecnológicas e sensoriais de produtos de panificação sem glúten e como substituto do ovo em receitas veganas, devido às funções de emulsificação e formação de espuma das proteínas e lipídios presentes nos grãos (AGUILAR et al., 2015; BASHIR; AGGARWAL, 2016).

Os valores encontrados nesse estudo para os teores de proteínas e lipídios da farinha de arroz apresentaram pequenas diferenças daqueles encontrados por Amagliani et al. (2017) e Cho, Lee e Eun (2019), respectivamente, de $0,5 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para lipídios e de $6,3 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, e $0,59 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para lipídios e de $8,61 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para proteínas. Segundo Monks et al. (2013), a composição química do arroz pode ser influenciada por diversos fatores, sofrendo alterações

de acordo com o genótipo dos grãos, as condições ambientais e do solo da região de cultivo, o manejo durante a colheita, armazenamento e beneficiamento, especialmente durante o processo de moagem para obtenção do grão polido ou da farinha.

Para fécula de mandioca, os valores estabelecidos para proteínas e lipídios (Tabela 3) são semelhantes aos dados descritos em revisão realizada por Zhu (2015), que descreveu valores que variaram de 0,05 a 0,75 g 100g⁻¹ para proteínas e de 0,05 a 0,51 g 100g⁻¹ para lipídios. Em relação á fécula de batata, o valor obtido para proteínas foi semelhante ao encontrado por Przetacsek-Roznowska et al. (2019) de 0,28 g 100g⁻¹, e menor ao teor de lipídios de 0,02 g 100g⁻¹ encontrado pelo mesmo autor.

As féculas de batata e mandioca apresentaram teores baixos de fibras totais. Esses resultados eram esperados, pois as féculas são compostas principalmente por amido, o que também justifica o elevado teor de carboidratos encontrado. Vale ressaltar que o amido é produzido pelas plantas como forma de armazenamento de energia e é considerado a principal fonte de carboidratos disponíveis da dieta humana.

Apesar de existir grande variabilidade nos resultados encontrados na literatura para o teor de amilose, os valores obtidos nessa pesquisa para FGB, FA, FM e FB encontram-se dentro da faixa descrita por alguns autores pesquisados (SANJEEWA et al., 2010; WANG et al., 2017; MARIOTI et al., 2018; PRZTACSEK-ROZNOWSKA et al., 2019; HAN et al., 2019; ZHU, 2015). Sanjeewa et al. (2010) avaliou diferentes variedades de grão-de-bico e encontrou teores de amilose que variaram de 17,7 a 23,1 g 100g⁻¹, similares aos encontrados nessa pesquisa (Tabela 3). Para farinha de arroz, pode-se observar uma grande variação no teor de amilose, já que Wang et al. (2017) encontrou valores entre 8,1 e 14,3 g 100g⁻¹ e Marioti et al. (2018) encontrou valores entre 13,9 e 22,7 g 100g⁻¹. Para fécula de batata, Przetacsek-Roznowska et al. (2019) apresentou o valor de 28,9 g 100g⁻¹ e Han et al. (2019) o valor de 30,1 g 100g⁻¹. Para fécula de mandioca, Han et al. (2019) apresentou o valor de 18,86 g 100g⁻¹, enquanto Zhu (2015) descreve valores que variaram de 14,1 a 30,3 g 100g⁻¹, similares aos determinados nesse trabalho. As diferenças encontradas para os teores de amilose de um mesmo tipo de amostra provavelmente estão relacionadas a fatores como cultivar, forma de cultivo, condições ambientais, entre outros.

O teor de amilose é capaz de influenciar as propriedades funcionais do amido, como a solubilidade e absorção em água, a viscosidade e a tendência á retrogradação (CRUZ-BENÍTEZ et al., 2019). A farinha de arroz e as féculas de mandioca e de batata apresentaram maiores teores de amilose e, segundo Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009), amidos com essa característica tendem a formar géis mais consistentes e mais estáveis com o aquecimento,

mas também sofrem maior tendência á retrogradação com o resfriamento. Já farinha de grão-de-bico apresentou menor teor de amilose e portanto maior teor de amilopectina, o que, ainda de acordo com Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009), faz com que tenha a tendência de formam géis mais claros e menos resistentes, porém mais estáveis e menos susceptíveis á retrogradação em temperaturas mais baixas.

Segundo Zhong et al. (2018), o volume específico final do produto panificado depende da capacidade de retenção de ar na massa durante o cozimento e resfriamento em temperatura ambiente. Farinhas com maior teor de amilose promovem aumento da viscosidade da massa, o que auxilia na maior retenção de ar e, conseqüentemente, maior crescimento, maior volume e melhora da textura do miolo. Assim, devido ao teor de amilose, a farinha de arroz e as féculas avaliadas nessa pesquisa podem ser utilizadas na formulação de panificados sem glúten, no sentido de se obter melhores propriedades de desenvolvimento da massa. Apesar do teor de amilose da FGB ser inferior ao das demais farinhas avaliadas, outras características, como o teor de fibras, pode auxiliar na mistura dessas e produzir características de alto padrão de qualidade ao produto final sem glúten.

A FGB apresentou teor de fibras alimentares e de fibras insolúveis que permitem classificá-la como um alimento fonte e com alto teor de fibras de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2012). Sanjeewa et al. (2010) analisou diferentes variedades de sementes de grão-de-bico e encontraram valores ligeiramente superiores para fibras alimentares de 21,5 a 23,5 g 100g⁻¹ e para fibras insolúveis de 14,4 a 16,1 g 100g⁻¹. Já Coda, Rizzello e Gobetti (2010) analisaram a farinha de grão-de-bico e determinaram 11 g 100g⁻¹ para fibras alimentares, valor mais próximo ao determinado nessa pesquisa. Essas variações normalmente estão relacionadas às condições de produção.

Segundo Naqash et al. (2017), as fibras insolúveis estão relacionadas à maior retenção de água na massa e, associadas ao efeito tenso-ativo e emulsificante exercido pelas proteínas e lipídios, são capazes de aumentar a retenção de ar, a hidratação e o rendimento da massa, refletindo no crescimento, aeração e maciez de produtos de panificação, especialmente aqueles sem glúten. Assim, considerando os teores de fibras encontrados, pode-se afirmar que a FGB tem potencial para ser utilizada na formulação de panificados como forma de melhorar o valor nutricional dos produtos, além de melhorar as propriedades de textura e retenção de ar da massa.

2.3.4 Índice de solubilidade em água (ISA) e índice de absorção em água (IAA)

Os índices de solubilidade (ISA) e absorção (IAA) em água para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB) estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Índice de solubilidade em água (ISA) e Índice de absorção em água (IAA) a 25°C para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)

	ISA ¹	IAA ²
FGB	16,59 ± 0,641	2,62±0,015
FA	1,86±0,083	2,21±0,131
FM	0,11±0,0003	1,61±0,001
FB	0,32±0,049	1,80±0,009

¹Valores expressos em média e desvio padrão (g 100g⁻¹); ²Valores expressos em média e desvio padrão (g gel g⁻¹ de matéria seca).

As diferenças encontradas entre as farinhas avaliadas podem ser diretamente relacionada à origem vegetal da amostra. Segundo Denardin e Silva (2009) e Ascheri et al. (2010), as propriedades funcionais, como índice de absorção e solubilidade em água, gelatinização e retrogradação, podem sofrer variações de acordo com a origem do material amiláceo, estando relacionadas às características estruturais dos grânulos de amido como a estrutura molecular da pectina (comprimento das cadeias, extensão das ramificações e peso molecular) e composição e estrutura do grânulo (proporção entre amilose e amilopectina, ou seja, entre regiões amorfas e cristalinas).

De acordo com Denardin e Silva (2009) e Silva et al. (2008), quando o amido nativo entra em contato com a água em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), os grânulos tornam-se ligeiramente inchados devido à difusão da água pelas regiões amorfas, embora considere-se que os grânulos de amido nativo sejam capazes de absorver água de forma efetiva apenas durante o processo de aquecimento.

Assim, considera-se que as farinhas cruas e amidos nativos normalmente apresentam baixa capacidade de absorção e solubilidade em água em temperatura ambiente, conforme pôde ser observado nas análises para FA, FM e FB. Em estudo realizado por Ghribi et al. (2015), foram encontrados os valores de 5,14 g g⁻¹ para IAA e 22,62 g 100g⁻¹ para ISA de farinha de grão-de-bico, sendo ligeiramente maiores aos encontrados nessa pesquisa. Ahmed, Al-Jassar e Thomas (2015) avaliaram farinhas de arroz de diferentes variedades, encontrando para IAA valores que variaram de 1,35 a 2,57 g g⁻¹ e de 1,08 a 3,40 g 100g⁻¹ para ISA. Para

fécula de mandioca, Fiorda et al. (2013) encontrou os valores de $1,66 \text{ g g}^{-1}$ para IAA e $0,3 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para ISA. As diferenças existentes entre os valores podem ter varias explicações como ambiente de produção, tipo de processamento entre outras.

A farinha de grão-de-bico apresentou o maior ISA entre as farinhas analisadas, o que pode ser atribuído á composição química do material. Segundo Dadon, Abbo e Reifen (2017) e Ghribi et al. (2015), o elevado índice de solubilidade da farinha de grão-de-bico está relacionado á maior presença de componentes hidrossolúveis, como alguns mono e dissacarídeos (ribose e sacarose), oligossacarídeos, proteínas e vitaminas do complexo B e vitamina C.

O índice de absorção (IAA) em água refere-se á capacidade de retenção de água de determinado material quando submetido á força de gravidade centrífuga externa ou compressão, estando relacionado á disponibilidade dos grupos hidrofílicos (-OH) para se ligarem ás moléculas de água e, consequentemente, á capacidade de formação de gel do amido (FIORDA et al., 2013; GHRIBI et al., 2015).

O IAA para FGB e FA foi maior do que o encontrado para FM e FB, o que pode estar relacionado ao maior teor de proteína apresentado pelas farinhas em relação ás féculas (Tabela 3). Segundo Sreerana et al. (2012), o IAA pode estar relacionado á interação das moléculas de água com os resíduos polares dos aminoácidos, o que também influencia na capacidade de emulsificação e viscosidade das proteínas. O maior IAA para FGB também pode ser explicado devido ao seu maior teor de fibras.

A capacidade de absorção e solubilidade em água das farinhas é um aspecto importante para a aplicação na panificação e em diversos produtos alimentícios, pois está relacionada ao processo de gelatinização do amido, o que exerce influência nas características sensoriais e tecnológicas dos produtos (SREERAMA et al., 2012).

2.3.5 Propriedades térmicas e propriedades de pasta

As propriedades térmicas para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB) estão descritas na Tabela 5 e na Figura 1.

Tabela 5. Propriedades térmicas da farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)

	T° inicial (°C)	T° de gelatinização (°C)	T° final (°C)	ΔH (J/g)
FGB	63,13 $\pm$ 0,302	64,71 $\pm$ 0,023	67,14 $\pm$ 0,026	5,003 $\pm$ 0,153
FA	57,39 $\pm$ 1,490	67,58 $\pm$ 0,023	77,46 $\pm$ 0,366	7,85 $\pm$ 0,240
FM	57,70 $\pm$ 0,718	67,60 $\pm$ 0,369	80,02 $\pm$ 0,430	10,26 $\pm$ 0,135
FB	57,13 $\pm$ 0,384	65,27 $\pm$ 0,017	73,35 $\pm$ 0,425	16,15 $\pm$ 0,296

Valores expressos em média e desvio padrão

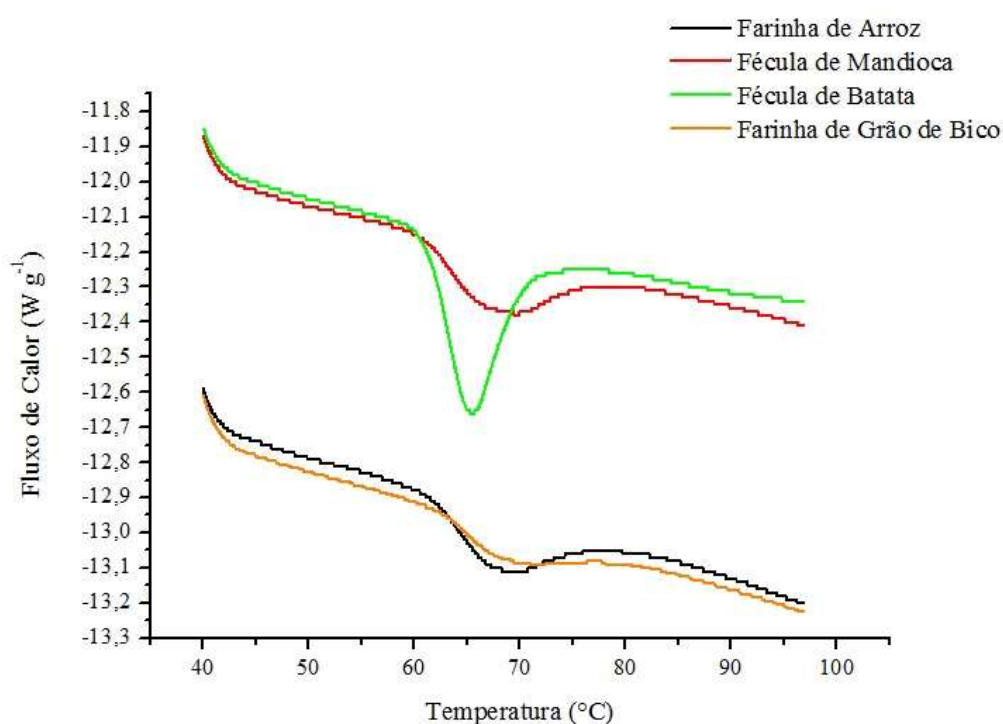


Figura 1. Propriedades térmicas determinadas através de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB).

Foi possível observar que a entalpia de gelatinização (ΔH) das farinhas avaliadas confirma os resultados obtidos para o teor de amilose (Tabela 3). Assim, o valor de ΔH foi maior conforme a amostra apresentava maior teor de amilose. Para Qiu et al. (2019), os

materiais com maior teor de amilose apresentam maior proporção de cadeias mais longas, o que aumenta a associação entre as cadeias de amido e produz uma estrutura mais forte, exigindo energia mais intensa para o rompimento das duplas hélices e para a gelatinização dos grânulos. Em contrapartida, os materiais com menor teor de amilose apresentam cadeias mais curtas, o que dificulta a formação de duplas hélices estáveis e necessita menos energia para gelatinização. Assim, a entalpia de gelatinização (ΔH) pode refletir a organização estrutural dos aglomerados de amilopectina e a heterogeneidade da cristalinidade, estando relacionada ao requerimento de energia necessária para que ocorra a gelatinização do amido (QIU et al., 2019). O pico endotérmico gerado, portanto, indica as mudanças ocorridas na pasta decorrentes do inchaço dos grânulos e da dissolução parcial dos polímeros (YE et al., 2016).

A farinha de grão-de-bico apresentou maior temperatura inicial de gelatinização, provavelmente devido à composição elevada de proteínas e lipídios presentes no material. Porém, apresentou baixa entalpia quando comparada às demais farinhas, demonstrando maior facilidade para iniciar o processo de gelatinização. Segundo Kalita, Bhattacharya e Srivastava (2018), a temperatura inicial reflete o início do fenômeno de gelatinização, podendo ser aumentada pela formação de complexos amilose-lipídio/amilose-proteína, o que é facilitado pela lixiviação da amilose na presença de água.

A maior temperatura inicial de gelatinização da FGB também pode ser explicada pela maior quantidade de fibras presentes na amostra, pois, segundo Kiumarsi et al. (2019), as fibras são capazes de competir com o amido para a absorção de água, o que retarda o inchaço e reduz a gelatinização dos grânulos de amido, o que também pode justificar a menor temperatura final de gelatinização apresentada pela farinha.

As féculas de batata e mandioca e a farinha de arroz apresentam menor temperatura inicial de gelatinização provavelmente devido à menor presença de componentes como fibras, lipídios e proteínas, que são capazes de retardar o processo de gelatinização dos grânulos de amido. Porém, apresentaram maior temperatura final e maiores valores de ΔH , indicando maior nível de gelatinização do amido e maior viscosidade da pasta. Segundo Buresová et al. (2017), a viscosidade aumentada pode limitar a expansão da massa durante os processo de fermentação e cozimento, o que pode influenciar de forma negativa no crescimento dos pães e, consequentemente no volume específico e na textura do produto final.

A fécula de batata apresentou maior pico endotérmico e maior valor de entalpia, sendo necessária maior quantidade de energia para iniciar o processo de gelatinização, porém, de acordo com Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009), é capaz de formar um gel mais consistente devido ao maior teor de amilose.

É importante ressaltar que o estudo das características térmicas das FGB, FA, FM e FB são importantes para determinar o potencial para aplicação dessas, pois, para Alvarez et al. (2014), a formação de gel é um dos principais fatores que afetam a qualidade dos alimentos á base de amido, sendo que as propriedades reológicas podem ser determinantes para as características de textura, percepção sensorial e aceitabilidade do produto. O processo de gelatinização causa a ruptura da estrutura e o inchamento dos grânulos de amido e, portanto, a cinética de reação relativa á gelatinização é capaz de fornecer parâmetros para caracterização das condições de formação do gel de amido, como tempo, temperatura, concentração, viscosidade, taxa de cisalhamento e retrogradação.

As propriedades de pasta para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB) estão descritas na tabela 6.

Tabela 6. Propriedades de pasta para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB)

	Pico 1 (RVU)	Viscosidade mínima (RVU)	Quebra de viscosidade (RVU)	Viscosidade final (RVU)	Retrogradação (RVU)	Temperatura de pasta (°C)
FGB	182,33±2,38	165,80±0,04	15,7±2,71	230,59±2,53	67,79±2,53	72,016±0,50
FA	342,75±0,11	263,58±0,70	82,25±3,53	574,20±7,60	337,71±7,72	69,61±0,51
FM	514,58±1,12	146,79±5,71	367,33±6,83	258,29±5,71	114,54±1,59	63,76±0,49
FB	1447,71±0,65	210,95±4,06	1285,75±3,42	370,58±1,64	160,08±0,35	61,73±0,53

Valores expressos em média e desvio padrão

A farinha de grão-de-bico apresentou menor valor de retrogradação, provavelmente devido ao menor teor de amilose e maior teor de amilopectina da amostra. Segundo Matignon e Tecante (2017) e Xia et al. (2018), menores valores de retrogradação estão associados à menor probabilidade de deformação da pasta durante o resfriamento, proporcionando, assim, maior tempo de vida útil ao produto. Assim, é possível afirmar que a FGB tem potencial para a produção de produtos de panificação, a fim de se conservar por mais tempo a textura macia do miolo.

A retrogradação pode ser descrita como a reorganização dos componentes macromoleculares desordenados do amido, resultando na dispersão do excesso de água dos complexos de amilose e amilopectina formados após o processo de hidratação e gelatinização dos grânulos. A amilopectina é o maior componente do amido, sendo responsável pela estrutura semi-cristalina dos grânulos e exercendo importante função no poder de inchamento e nas propriedades de pasta (MATIGNON; TECANTE, 2017; XIA et al., 2018). As regiões cristalinas com maior quantidade de ramificações são consideradas mais estáveis e, portanto, são menos propensas à retrogradação (DEMIATI et al., 2016).

A farinha de arroz obteve o maior valor de retrogradação (Tabela 6) entre os produtos avaliados e, para Matignon e Tecante (2017) e Xia et al. (2018), essa característica indica que os produtos panificados formulados com maior quantidade dessa farinha podem apresentar endurecimento mais rápido do miolo, diminuindo a vida útil e prejudicando as características sensoriais. No entanto, a FA é a principal farinha utilizada na formulação de pães e bolos sem glúten, porém, para Witzczak et al. (2016), uma alternativa para melhorar essa característica é a combinação dessa com farinhas de leguminosas, como o grão-de-bico, e de amidos, como féculas de batata e de mandioca para melhorar as características sensoriais e a textura da massa, além de aumentar a durabilidade dos produtos.

O pico 1 (Tabela 6) corresponde à viscosidade máxima que ocorre após o início do aquecimento e antes de se iniciar o resfriamento da suspensão, sendo o ciclo em que se observa o intumescimento e a gelatinização dos grânulos de amido. Segundo Teba, Ascheri e Carvalho (2009), o maior conteúdo de proteínas do material está relacionado à valores menores de viscosidade máxima, já que a proteína pode atuar como barreira física para o intumescimento do amido pois os grânulos se encontram associados à matriz proteica. Além disso, a formação de complexos resultantes das interações entre o amido e os ácidos graxos ou as fibras podem modificar as características de textura e estruturação da pasta das matérias primas (COZZOLINO, 2016). Assim, conforme a tabela 3, a farinha de grão-de-bico apresentou maior conteúdo de proteínas, fibras e lipídios, o que pode justificar o menor valor

de viscosidade máxima da amostra quando comparada às demais matérias-primas analisadas. As féculas de batata e de mandioca apresentaram os maiores valores de viscosidade máxima, indicando maior capacidade de intumescimento dos grânulos de amido e, portanto, maior capacidade de gelatinização.

As farinhas de arroz e de grão-de-bico apresentaram os menores valores de quebra de viscosidade, indicando que, segundo Witczak et al. (2016), podem contribuir para a manutenção da estabilidade da massa durante o processo de cozimento, além de manter a estrutura e a retenção de ar na massa dos pães após o resfriamento. A quebra de viscosidade (Tabela 6) está relacionada ao grau de desintegração dos grânulos inchados, sendo importante para avaliar a estabilidade da pasta em temperaturas elevadas e sob agitação, sendo que menores valores indicam que a amostra mais resistente apresenta menor taxa de cisalhamento durante o processo de cocção (BASHIR; AGGARWAL, 2016; TEBA; ASCHERI; CARVALHO, 2009).

2.4 Conclusão

A farinha de grão-de-bico e a farinha de arroz apresentaram importante teor de nutrientes, como proteínas, lipídios e fibras, que contribuem tanto para a melhora do valor nutricional dos produtos, quanto para garantir melhores propriedades de textura e coloração de massas. As féculas de mandioca e batata apresentaram maiores valores de viscosidade máxima e menores valores de retrogradação, e, portanto, capacidade de formação de gel para garantir melhores parâmetros de textura de produtos panificados. Assim, as farinhas de grão-de-bico e de arroz e as féculas de mandioca e de batata possuem potencial para a aplicação em produtos de panificação.

REFERÊNCIAS

- ACHARJEE, S.; SARMAH, B.K. Biotechnologically generating ‘super chickpea’ for food and nutritional security. **Plant Science**, Limerick, v. 207, p. 108-116, 2013.
- AGUILAR, N.; ALBANELL, E.; MIÑARRO, B.; CAPELLAS, M. Chickpea and tiger nut flours as alternatives to emulsifier and shortening in gluten-free bread. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 62, n. 1, p. 225-232, 2015.
- AHMED, J.; AL-JASSAR, S.; THOMAS, L. A comparison in rheological, thermal, and structural properties between Indian Basmati and Egyptian Giza rice flour dispersions as influenced by particle size. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 48, p. 12-83, 2015.
- AHMED, S.; ZHOU, X.; PANG, Y.; XU, Y.; TONG, C.; BAO, J. Genetic diversity of potato genotypes estimated by starch physicochemical properties and microsatellite markers. **Food Chemistry**, Londres, v. 257, p. 368–375, 2018.
- ALVAREZ, M.D.; FUENTES, R.; OLIVARES, M.D.; CUESTA, F.J.; CANET, W. Thermorheological characteristics of chickpea flour slurry as affected by moisture content. **Journal of Food Engineering**, Califórnia, v. 136, p. 9–18, 2014.
- AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; KELLY, A.L.; O'MAHONY, J.A. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 59, p. 18–26, 2017.
- AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; KELLY, A.; O'MAHONY, J.A. The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 64, p. 1-12, 2017.
- ANDERSON, R. A.; CONWAY, H. F.; PFEIFER, V. F.; GRIFFIN JUNIOR, E. L. Gelatinization of corn grits by rolland extrusion-cooking. **Cereal Science Today**, Minneapolis, v. 14, n. 1, p. 4-12, 1969.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 19th edition. Washington: AOAC, 2012.
- ASCHERI, D.P.R.; MOURA, W.S.; ASCHERI, J.L.R.; CARVALHO, C.W.P. Physical and physicochemical characterization of hedychium coronarium rhizomes and starch. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 2, p. 159-166, 2010.

BASHIR, K.; AGGARWAL, M. Effects of gamma irradiation on the physicochemical, thermal and functional properties of chickpea flour. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 69, p. 614-622, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8 de 02 de junho de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 23 de 14 de dezembro de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos amiláceos derivados da raiz de mandioca.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC ANVISA/MS nº 263 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos farinhas e farelos. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC ANVISA/MS nº 269 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de vitaminas, proteínas e minerais.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar.

BRESSIANI, J.; ORO, T.; SANTETTI, G.S., ALMEIDA, J.L.; BERTOLIN, T.E., GOMEZ, M.; GUTKOSKI, L.C. Properties of whole grain wheat flour and performance in bakery products as a function of particle size. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 75, p. 269-277, 2017.

BURESOVÁ, I.; TOKÁR, M.; MARECEK, J.; HRIVNA, L.; FAMERA, O.; SOTTNÍKOV, V. The comparison of the effect of added amaranth, buckwheat, chickpea, corn, millet and quinoa flour on rice dough rheological characteristics, textural and sensory quality of bread. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 75, p. 158-164, 2017.

CARDOSO, R.V.C.; FERNANDES, A.; HELENO, S.A.; RODRIGUES, P.; GONZALÉZ-PARAMÁS, A.M.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. **Food Chemistry**, Londres, v. 280, p. 123–129, 2019.

CHO, S-H.; LEE, B-H.; EUN, J-B. Physicochemical properties of dry- and semi-wet-milled rice flours after fermentation by *Lactobacillus amylovorus*. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 85, p. 15-19, 2019.

CODA, R.; RIZZELLO, C.G.; GOBBETTI, M. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, v. 137, n. 2, p. 236-245, 2010.

COZZOLINO, D. The use of the rapid visco analyser (RVA) in breeding and selection of cereals. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 70, p. 282-290, 2016.

COURI, M.H.S.; GIADA, M.L.R. Gluten-free bread added with babassu (*Orbignya phalerata*) mesocarp flour: physical, chemical and sensorial evaluation. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n.3, p. 297-304, 2016.

CRUZ-BENÍTEZ, M.M.; GÓMEZ-ALDAPA, C.A.; CASTRO-ROSAS, J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, E.; FONSECA-FLORIDO, H.A. Effect of amylose content and chemical modification of cassava starch on the microencapsulation of *Lactobacillus pentosus*. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 105, p. 110–117, 2019.

DADON, S.B-E.; ABBO, S.; REIFEN, R. Leveraging traditional crops for better nutrition and health - The case of chickpea. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige, v. 64, p. 39-47, 2017.

DEMIATE, I.M.; FIGUEROA, A.M.; GUIDOLIN, M.E.B.Z.; SANTOS, T.P.R.; YANGCHENG, H.; CHANG, F.; JANE, J-L. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 61, p. 812-820, 2016.

DENARDIN, C.C.; SILVA, L.P. Starch granules structure and its regards with physicochemical properties. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DÍAZ, A.; DINI, C.; VIÑA, S.Z.; GARCÍA, M.A. Technological properties of sour cassava starches: effect of fermentation and drying processes. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 93, p. 116-123, 2018.

ELGETI, D.; JEKLE, M.; BECKER, T. Strategies for the aeration of gluten-free breade - A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige, v. 46, n. 1, p. 75-84, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Food energy: methods of analysis and conversion factors. Report of a technical workshop. FAO, Food and Nutrition Paper, 77, Rome, 2003

FIGUEROA-FLÓREZ, J.; CADENA-CHAMORRO, E.M.; RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; SALCEDO-MENDOZA, J.; CIRO-VELÁSQUEZ, H. Cassava starches modified by enzymatic biocatalysis: effect of reaction time and drying method. **Revista DYNA**, Medellín v. 86, n. 208, p. 162-170, 2019.

FIORDA, F. A.; SOARES JUNIOR, M. S.; SILVA, F. A.; SOUTO, L. R. F.; GROSSMANN, M. V. E. Cassava bagasse flour: byproduct utilization and comparison with cassava starch. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 408-416, 2013.

GHRIBI, A.M.; SILA, A.; GAFSI, I.M.; BLECKER, C.; DANTHINE, S.; ATTIA, H.; BOUGATEF, A.; BESBES, S. Structural, functional, and ACE inhibitory properties of water-soluble polysaccharides from chickpea flours. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 75, p. 276–282, 2015.

GÓMEZ M.; OLIVETE, B.; ROSELL, C.M.; PANDO, V.; FERNÁNDEZ, E. Studies on cake quality made of wheate chickpea flour blends. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 41, n. 9, p. 1701-1709, 2008.

HAN, H. HOU, J.; YANG, N.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; ZHANG, Z.; SHEN, Y.; HUANG, S.; GUO, S. Insight on the changes of cassava and potato starch granules during gelatinization. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 126, p. 37-43, 2019.

HARDER, M.N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Quantitative evaluation by a digital colorimeter of the color of the egg of laying hens fed with annatto (*Bixa orellana*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.102, n. 563, p.339-342, 2007.

HERA, E.; ROSELL, C.M.; GOMEZ, M. Effect of water content and flour particle size on gluten-free bread quality and digestibility. **Food Chemistry**, Londres, v. 151, p. 526–531, 2014.

JULIANO, B. **Amylose analysis – a review**. In: Proc. Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality. IRRL. Los Baños, Philippines. p. 251-260, 1979.

KALITA, D.; BHATTACHARYA, S.; SRIVASTAVA, B. Interrelation between thermal behaviour and pasting properties of malted rice using multivariate analysis. **Thermochimica Acta**, Amsterdã, v. 670, p. 155–168, 2018.

KAUR, M.; SINGH, N.; SODHI, N.S. Physicochemical, cooking, textural and roasting characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Journal of Food Engineering**, Califórnia, v. 69, p. 511–517, 2005.

KIUMARSI, M.; SHAHBAZI, M.; YEGANEHZAD, S.; MAJCHRZAK, D.; LIELEG, O.; WINKELJANN, B. Relation between structural, mechanical and sensory properties of gluten-free bread as affected by modified dietary fibers. **Food Chemistry**, Londres, v. 277, p. 664-673, 2019.

MARIOTTI, M.; CACCIALANZA, G.; CAPPÀ, C.; LUCISANO, M. Rheological behaviour of rice flour gels during formation: Influence of the amylose content and of the hydrothermal and mechanical history. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 84, p. 257–266, 2018.

MARTÍNEZ, P.; PEÑA, F.; BELLO-PÉREZ, L.; NÚÑEZ-SANTIAGO, C.; YEE-MADEIRA, H.; VELEZMORO, C. Physicochemical, functional and morphological characterization of starches isolated from three native potatoes of the Andean region. **Food Chemistry**, Londres, v. 2, 2019.

MATIGNON, A.; TECANTE, A. Starch retrogradation: from starch components to cereal products. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 68, p. 43-52, 2017.

MOHAMMED, I.; AHMED, A.R.; SENGE B. Dough rheology and bread quality of wheat–chickpea flour blends. **Industrial Crops and Products**, North Dakota, v. 36, n. 1, p.196–202, 2012.

MONKS, J.L.F.; VANIER, N.L.; CASARIL, J.; BERTO, R.M.; OLIVEIRA, M.; GOMES, C.B.; CARVALHO, M.P.; DIAS, A.R.G.; ELIAS, M.C. Effects of milling on proximate composition, folic acid, fatty acids and technological properties of rice. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 30, n. 2, p. 73–79, 2013.

NAQASH, F.; GANI, A.; GANI, A.; MASOOD, F.A. Gluten-free baking: combating the challenges - A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 66, p.98-107, 2017.

OLIVEIRA, L.C.; SCHMIELE, M.; STEEL, C.J. Development of whole grain wheat flour extruded cereal and process impacts on color, expansion, and dry and bowl-life texture. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 75, p. 261-270, 2017.

ORTOLAN, F.; HECKTHEUER, L.H.; MIRANDA, M.Z. Effect of storage at low temperature (–4 °C) in the color and acidity content of wheat flour. **Ciência e Tecnologia de Alimentos [online]**, Campinas, v. 30, p. 55-59, 2010.

PRZETACZEK-ROŻNOWSKA, I.; FORTUNA, T.; WODNIAK, M.; ŁABANOWSKA, M.; PAJAŁ, P.; KRÓLIKOWSKA, K. Properties of potato starch treated with microwave

radiation and enriched with mineral additives. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 124, p. 229–234, 2019.

QIU, C.; LI, P.; LI, Z.; CORKE, H.; SUI, Z. Combined speed and duration of milling affect the physicochemical properties of rice flour. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 89, p. 188–195, 2019.

ROY, P.; IJIRI, T.; OKADOME, H.; NEI, D.; ORIKASA, T.; NAKAMURA, N.; SHIINA, T. Effect of processing conditions on overall energy consumption and quality of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Food Engineering**, Califórnia, v. 89, p. 343–348, 2008.

SANJEEWA, W.G.T.; WANASUNDARA, J.P.D.; PIETRASIK, Z.; SHAND, P.J. Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours and application in low-fat pork bologna as a model system. **Food Research International**, Essex, v. 43, n. 2, p. 617–626, 2010.

SHENG, L.; LI, P.; WU, H.; LIU, Y.; HAN, K.; GOUDA, M.; TONG, Q.; MA, M.; JIN, Y. Tapioca starch-pullulan interaction during gelation and retrogradation. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 96, p. 432–438, 2018.

SILVA, E.M.M.; ASCHERI, J.L.R.; ASCHERI, D.P.R.; CARVALHO, L.M.J. Effect of extrusion parameters in the characteristics of pasta viscosity and water absorption index of pre cooked pasta prepared by mixed flour of brown rice and maize obtained by extrusion cooking. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 239–254, 2008.

SILVA, P.A.; MELO, W.S.; CUNHA, R.L.; CUNHA, E.F.M.; LOPES, A.S.; PENA, R.S. Characterization of roots and cassava starch from three cassava varieties produced in the state of Pará. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 18, n. 2, p. 147–154, 2016.

SILVA, R.F.; ASCHERI, J.L.R. Extrusion of broken rice for use as food ingredient. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 190–199, 2009.

SOUZA, J.M.L.; ÁLVARES, V.S.; LEITE, F.M.N.; REIS, F.S.; FELISBERTO, F.A.V. Physicochemical characteristics of flours deriving of cassava varieties used in the Vale do Juruá, Acre. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 761–766, 2008.

SREERAMA, Y.N.; SASHIKALA, V.B.; PRATAPE, V.M.; SINGH, V. Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. **Food Chemistry**, Londres, v. 131, n. 2, p. 462–468, 2012.

TEBA, C.S; ASCHERI, J.L.R; CARVALHO, C.W.P. Efeito dos parâmetros de extrusão sobre as propriedades de pasta de massas alimentícias pré-cozidas de arroz e feijão. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 20, n. 3, p. 411-426, 2009.

XIA, T.; GOU, M.; ZHANG, G.; LI, W.; JIANG, H. Physical and structural properties of potato starch modified by dielectric treatment with different moisture content. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 118, p. 1455–1462, 2018.

WANG, S.; LI, P.; ZHANG, T.; YU, J.; WANG, S.; COPELAND, L. In vitro starch digestibility of rice flour is not affected by method of cooking. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 84, p. 536-543, 2017.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; CHANG, Y.K. Physicochemical, rheological, morphological, and thermal characterization of normal, waxy, and high amylose corn starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

WITCZAK, M.; ZIOBRO, R.; JUSZCZAK, L.; KORUS, J. Starch and starch derivatives in gluten-free systems - A review. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 67, p. 46-57, 2016.

WU, T.; WANG, L.; LI, Y.; QIAN, H.; LIU, L.; TONG, L.; ZHOU, X.; WANG, L.; ZHOU, S. Effect of milling methods on the properties of rice flour and gluten-free ricebread. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 108, p. 137–144, 2019.

YE, L.; WANG, C.; WANG, S.; ZHOU, S.; LIU, X. Thermal and rheological properties of brown flour from Indica rice. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 70, p. 270-274, 2016.

YONG H.; WANG, X.; SUN, J.; FANG, Y.; LIU, J.; JIN, C. Comparison of the structural characterization and physicochemical properties of starches from seven purple sweet potato varieties cultivated in China. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 120, p. 1632–1638, 2018.

ZANOTTO, D.L.; BELLAYER, C. **Método de Determinação da Granulometria de Ingredientes para Uso em Rações de Suínos e Aves**. Concórdia: Embrapa suínos e aves, 1996. p. 1-5. (Comunicado técnico, 215).

ZHANG, L.; ZHAO, Y.; HUA, W.; QIAN, J-Y.; DING, X-L.; GUAN, C-R.; LU, Y-Q.; CAO, Y. Multi-scale structures of cassava and potato starch fractions varying in granule size. **Carbohydrate Polymers**, Vieiro, v. 200, p. 400–407, 2018.

ZHONG, Y.; ZHU, H.; LIANG, W.; LI, X.; LIU, L.; ZHANG, X.; YUE, H.; XUE, J.; LIU, X.; GUO, D. High-amylose starch as a new ingredient to balance nutrition and texture of food. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 81, p. 8-14, 2018.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, Vieiros, v. 122, p. 456–480, 2015.

3. CAPÍTULO 3

ARTIGO 2 – DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE PÃES SEM GLÚTEN COM FARINHA DE ARROZ, FARINHA DE GRÃO-DE-BICO, FÉCULA DE BATATA E FÉCULA DE MANDIOCA

RESUMO

Produtos de panificação sem glúten normalmente apresentam ineficiente expansão e retenção de ar na massa, resultando em pães com menor volume e menor flexibilidade e maciez do miolo. Assim, ingredientes como farinhas de leguminosas e amidos vêm sendo utilizados para melhorar as propriedades tecnológicas, sensoriais e nutricionais dos pães. O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações de pães sem glúten utilizando uma mistura com diferentes concentrações de farinhas de arroz e de grão-de-bico e féculas de mandioca e de batata. A primeira etapa do planejamento experimental foi realizada a partir de um delineamento inteiramente casualizado, variando-se a concentração de farinha de grão-de-bico nas proporções de 0%, 15%, 25%, 35% e 45%. Na segunda etapa do planejamento experimental foi realizado o delineamento de misturas, fixando-se a concentração de farinha de grão-de-bico mais desejável estabelecida na primeira etapa, e variando-se as proporções de farinha de arroz e féculas de batata e de mandioca. Em ambas as etapas os pães foram analisados de acordo com o volume específico, parâmetros instrumentais de textura e parâmetros instrumentais de cor, além de umidade e atividade de água na segunda etapa. Na primeira etapa, a formulação com 35% de farinha de grão-de-bico obteve valores de 2,96 cm.g⁻¹ para volume específico, 12,55N para dureza, 0,79 para elasticidade, 0,37 para coesividade e 4,48 para mastigabilidade, sendo selecionada como a proporção mais desejável. De acordo com o delineamento de misturas, a formulação com as proporções de 25% de farinha de arroz, 25% de fécula de batata e 50% de fécula de mandioca atingiu maior volume específico e os parâmetros de textura mais desejáveis. Assim, foi possível desenvolver formulações de pães sem glúten a partir da mistura de farinha de arroz e grão-de-bico e féculas de batata e mandioca, estabelecendo a proporção ideal de cada uma delas.

Palavras-chave: panificação, delineamento de misturas, *Cicer arietinum* L., *Manihot esculenta* Crantz, *Solanum tuberosum* L., *Oryza sativa* L., fécula de batata, fécula de mandioca.

3.1 Introdução

Pães sem glúten disponíveis comercialmente possuem características de qualidade e aceitabilidade inferiores aos seus equivalentes que contêm glúten, apresentando defeitos relacionados principalmente à ineficiente expansão e retenção de ar na massa durante a fermentação, resultando em menor volume, flexibilidade e maciez do miolo. Devido à ausência de glúten e o alto teor de amido proveniente das farinhas utilizadas na formulação, os pães sem glúten apresentam valor nutricional reduzido e enrijecimento mais rápido do miolo, além de apresentar coloração da casca mais esbranquiçada (NAQASH et al., 2017).

O desenvolvimento de pães sem glúten tem envolvido a utilização de diversos ingredientes, como diferentes farinhas sem glúten (milho, arroz, sorgo), pseudocereais (quinoa e amaranto), farinha de leguminosas (soja, ervilha e grão-de-bico) e amidos (batata, mandioca e milho), além de hidrocolóides e emulsificantes, com o objetivo de obter propriedades viscoelásticas semelhantes ao glúten e, conseqüentemente, melhorar as propriedades tecnológicas, sensoriais e nutricionais dos pães (MIR et al., 2016).

A origem e o tipo de amido utilizado podem influenciar a micro estrutura, a reologia e a retenção de água na massa, além da estrutura e qualidade do produto final. As propriedades intrínsecas do amido, como tamanho do grânulo, capacidade de intumescimento e solubilidade em água, propriedades reológicas de formação da pasta e a formação de complexos entre a amilose e componentes como proteínas e gorduras, também podem desempenhar importante papel nas características do produto final (WITCZA et al., 2016).

A farinha de grão-de-bico vem sendo utilizadas na formulação de produtos sem glúten por apresentar maiores teores de lipídios, fibras e minerais quando comparada à farinha de cereais como milho e arroz, o que auxilia no enriquecimento do valor nutricional dos produtos. Além disso, as leguminosas possuem elevado teor de proteínas de alta qualidade, que apresentam propriedades funcionais importantes, como a capacidade de emulsificação e formação de espuma, auxiliando na melhora da qualidade da massa e garantindo maior volume e melhor textura dos pães (AGUILAR, et al., 2015; GOBBETTI et al., 2018).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações de pães sem glúten utilizando uma mistura com diferentes concentrações de farinha de arroz, farinha de grão-de-bico, fécula de mandioca e fécula de batata, visando à obtenção um novo produto para consumidores com restrição ao consumo do gluten.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material

Os grãos quebrados utilizados na elaboração da farinha de arroz foram doados pela empresa Cristal Alimentos, situada na BR 153, em Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil. A fécula de mandioca foi doada pela empresa FEBELA Agroindustrial Ltda., localizada na cidade de Bela Vista de Goiás, Goiás, Brasil. O grão-de-bico utilizado para elaboração da farinha, a fécula de batata (Moinho de Pedra, Goianira, Goiás) e os demais ingredientes necessários para a formulação dos pães foram adquiridos no comércio local da cidade de Goiânia, Goiás, Brasil.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 *Formulação dos pães*

Os pães foram elaborados no laboratório de panificação da Escola Senai Vila Canaã, localizada na cidade de Goiânia, Goiás.

A formulação dos pães foi estabelecida a partir de testes preliminares, baseando-se em 100g totais da mistura de farinhas. Os demais ingredientes utilizados foram: 50 g 100g⁻¹ de ovo *in natura* (Qualitá, Classe A), 20 g 100g⁻¹ de óleo vegetal (Liza), 15 g 100g⁻¹ de açúcar (União), 2 g 100g⁻¹ de goma xantana (Leve Crock), 2 g 100g⁻¹ de fermento biológico seco (Fleishmman), 4 g 100g⁻¹ de sal (Cisne refinado), 60 g 100g⁻¹ de água mineral.

Na formulação dos pães foram seguidos os seguintes passos: em batedeira planetária (Arno Deluxe 220V, São Paulo, Brasil) foi colocado o ovo, o açúcar e o óleo e homogeneizados por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, foram acrescentadas as farinhas e as féculas, a água e o fermento, e a massa foi homogeneizada por mais 1 minuto. Por fim, foram acrescentados o sal e a goma xantana e a massa foi novamente homogeneizada por 1 minuto.

A massa obtida foi colocada em formas de alumínio e submetida à fermentação por 40 minutos, em câmara de fermentação (Venâncio AC20T, Venâncio Aires, Brasil), a uma temperatura de 35°C e 85% de umidade. Após a fermentação, os pães foram assados em forno (Millenium 1CL ELET 380V/60Hz Perfecta, Curitiba, Brasil) a 180°C por 20 minutos.

3.2.2.2 Planejamento experimental

O estudo experimental foi realizado em duas etapas, conforme a figura 2:

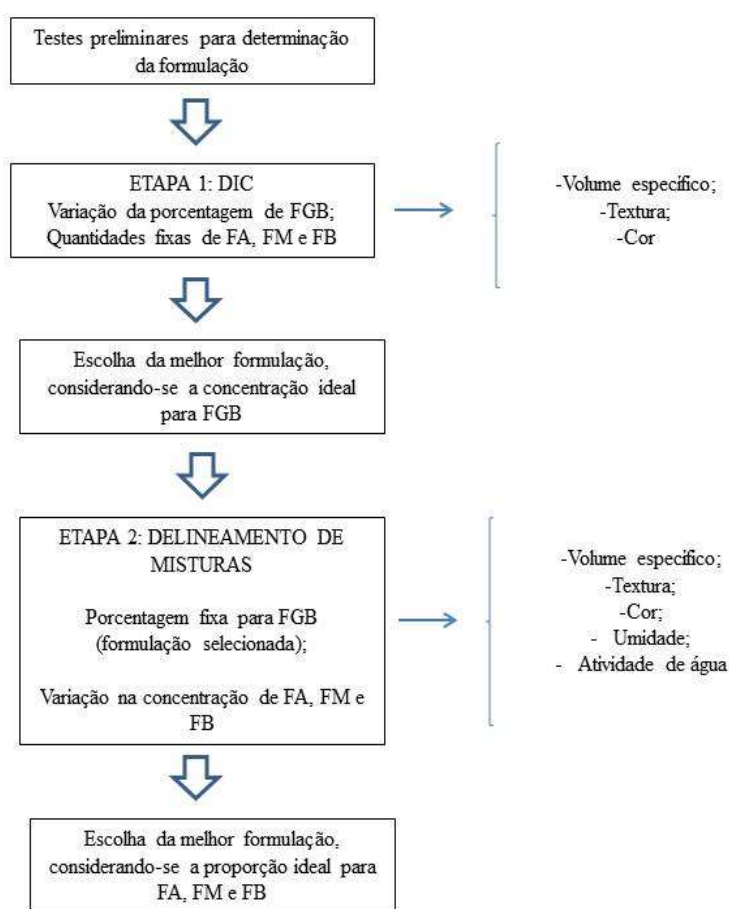


Figura 2. Fluxograma para elaboração dos pães com farinha de grão-de-bico (FGB); farinha de arroz (FA); fécula de mandioca (FM); fécula de batata (FB).

A primeira etapa teve como objetivo avaliar a proporção ideal da farinha de grão-de-bico na formulação. Para isso, foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), estabelecendo-se 4 diferentes porcentagens para adição da farinha de grão-de-bico (FGB), mantendo-se a concentração da farinha de arroz (FA), fécula de batata (FB) e fécula de

mandioca (FM) em proporções iguais. Também foi estabelecida a formulação controle sem a adição da FGB. Foram elaboradas quatro repetições para cada formulação. As proporções utilizadas para o delineamento estão descritas na Tabela 7:

Tabela 7. Proporções estabelecidas para farinha de grão-de-bico (FGB), farinha de arroz (FA), fécula de batata (FB) e fécula de mandioca (FM), para realização da primeira etapa de elaboração dos pães sem glúten.

	FGB (g)	FA (g)	FB (g)	FM (g)
Formulação 1 (0% FGB)	-	33,3	33,3	33,3
Formulação 2 (15% FGB)	15	28,3	28,3	28,3
Formulação 3 (25% FGB)	25	24,98	24,98	24,98
Formulação 4 (35% FGB)	35	21,64	21,64	21,64
Formulação 5 (45% FGB)	45	18,32	18,32	18,32

A segunda etapa teve como objetivo estabelecer as proporções ideais para a mistura de farinhas e féculas, sendo fixada a quantidade de farinha de grão-de-bico estabelecida na primeira etapa, e variando-se as proporções de farinha de arroz (FA), fécula de batata (FB) e fécula de mandioca (FM). A partir de testes preliminares, considerando-se o volume específico e a textura dos pães, foram estabelecidas as concentrações máximas e mínimas para cada matéria prima, de acordo com a Tabela 8:

Tabela 8. Concentrações máximas e mínimas determinadas para farinha de arroz (FA), fécula de batata (FB) e fécula de mandioca (FM) utilizadas para a formulação dos pães sem glúten.

Componente	Mínimo (%)	Máximo (%)
FA	25	60
FB	15	40
FM	20	50

A partir dos valores máximos e mínimos, foram estabelecidas as concentrações das matérias primas expressas em pseudocomponentes, de acordo com a equação 5 (BARROS et al., 2003):

$$Xi = \frac{ci - ai}{1 - \sum_{i=1}^q ai} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que:

Xi = valor em pseudocomponente

$0 \leq ai \leq ci$

$\sum_{i=1}^q ai < 1$

$i = 1, 2, 3, \dots, 9$

As concentrações estabelecidas para cada matéria prima a partir do delineamento experimental, em concentrações reais e pseudocomponentes, estão descritas na tabela 9. Foram determinadas 7 formulações com duas repetições na formulação 7 (F8 e F9), considerada o ponto central, para cálculo do erro experimental (STATSOFT, 2007).

Tabela 9. Planejamento experimental para avaliação da influência da farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB) nas propriedades físicas de pães sem glúten. Valores expressos em concentrações reais (%) e pseudocomponentes.

Proporções dos ingredientes na mistura						
Experimento	Concentrações reais (%)			Pseudocomponentes		
	FB (C1)	FA (C2)	FM (C3)	FB (X1)	FA (X2)	FM (X3)
F1	0,40	0,25	0,35	0,625	0	0,375
F2	0,15	0,60	0,25	0	0,875	0,125
F3	0,40	0,40	0,20	0,625	0,375	0
F4	0,20	0,60	0,20	0,125	0,875	0
F5	0,25	0,25	0,50	0,250	0	0,75
F6	0,15	0,35	0,50	0	0,25	0,75
F7	0,258	0,408	0,333	0,645	0,02	0,333
F8	0,258	0,408	0,333	0,645	0,02	0,333
F9	0,258	0,408	0,333	0,645	0,02	0,333

Fonte: STATSOFT 7.0; C1 + C2 + C3 = 1; X1+X2+X3 = g.100g⁻¹

3.2.2.3 Caracterização dos pães

Para a análise de volume específico, os pães prontos foram resfriados a temperatura ambiente (25°C±2°C) e então pesados em balança semi-analítica. Em seguida, o volume de cada pão foi determinado através do deslocamento de sementes de painço, de acordo com método descrito por Mohammadi et al. (2015). O cálculo do volume específico foi realizado através da razão entre o volume e a massa dos pães, através da equação 6:

$$VE = \frac{V}{m} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

VE = volume específico (cm³ g⁻¹)

V = volume (cm³)

m = massa (g)

A análise de textura dos pães sem glúten foi realizada de acordo com os parâmetros sugeridos por Esteller e Lannes (2005). A análise foi realizada em texturômetro Stable Micro Sistem (TA HD Plus, Godalming, UK), considerando-se os atributos de dureza, elasticidade, coesividade e mastigabilidade. Foram utilizados os seguintes parâmetros: probe cilíndrica de 20 mm de diâmetro, força de gatilho (*tigger force*) de 10 g, velocidade pré-teste de 20 mm s⁻¹, velocidade teste de 10 mm s⁻¹, velocidade pós-teste de 10 mm.s⁻¹. Foram utilizadas fatias de 20 mm de espessura. As análises foram realizadas em 10 replicatas.

As análises dos parâmetros instrumentais de cor da casca e do miolo dos pães foram realizadas em 10 replicatas utilizando-se um colorímetro (Bankinh Meter Minolta BC-10, Ramsey, USA), de acordo com o sistema CIE L*a*b*. Os resultados foram expressos em: valores de L* (luminosidade), que variam do preto (0) ao branco (100); valores de a*, que variam do verde (-60) ao vermelho (+60); e valores de b*, que variam do azul (-60) ao amarelo (+60) (HARDER; CANNIATTI-BRAZACA; ARTHUR, 2007). Também foi calculado o índice de croma de acordo com a equação 7 e o ângulo Hue de acordo com a equação 8:

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Equação 7})$$

$$H^* = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (\text{Equação 8})$$

Em que:

C* = cromaticidade

H* = ângulo Hue (graus)

Tan⁻¹ = arco tangente

a* = coordenada de cromaticidade entre verde e vermelho

b* = coordenada de cromaticidade entre azul e amarelo

A atividade de água foi realizada utilizando-se higrômetro Acqua Lab (Decagon Devices, Series 3TE, Pullman, USA), á temperatura constante (24+/-1°C). A umidade foi determinada por dessecação da amostra em estufa a 105°C até atingir peso constante (AOAC, 2012).

3.2.2.4 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o software computacional STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2007). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados obtidos, considerando-se índice de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Foram estabelecidos, ainda, os coeficientes de variação (R), coeficiente de variação ajustado (R_{aj}^2), falta de ajuste (FA) e os modelos matemáticos obtidos para cada variável.

Para avaliação dos dados do primeiro ensaio (DIC), as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey para determinação das diferenças significativas.

Para avaliação dos dados do delineamento de misturas, foram obtidas curvas bidimensionais, considerando-se os pontos máximo e mínimo para cada variável analisada.

Para escolha da melhor formulação, foram considerados, principalmente, o maior volume específico e os melhores parâmetros de textura.

3.3 Resultados e discussão

Ensaio 1: seleção da concentração de FGB

A tabela 10 apresenta os valores obtidos para os parâmetros de volume específico, dureza, coesividade, elasticidade e mastigabilidade dos pães sem glúten elaborados com diferentes níveis de substituição da mistura por farinha de grã-de-bico (FGB). A tabela 11 apresenta os valores obtidos a partir da análise dos parâmetros instrumentais de cor dos pães sem glúten. A tabela 12 representa os modelos referentes aos parâmetros avaliados que apresentaram índice de significância ($p \leq 0,05$).

Tabela 10. Análise de volume específico e parâmetros de textura dos pães com diferentes níveis de substituição da mistura por farinha de grão-de-bico (FGB)

Fator	Nível de substituição da mistura por FGB				
	0	15	25	35	45
Volume específico (cm³ g⁻¹)	2,29 ^b ±0,119	2,41 ^b ± 0,117	2,83 ^a ±0,159	2,96 ^a ±0,122	2,93 ^a ±0,067
Dureza (N)	12,03 ^b ±0,230	12,31 ^b ±0,897	12,11 ^b ±1,16	12,55 ^b ±0,286	14,84 ^a ±0,486
Elasticidade	0,89 ^a ±0,030	0,87 ^{ab} ± 0,041	0,84 ^{ab} ±0,042	0,79 ^b ±0,035	0,79 ^b ±0,017
Coesividade	0,47 ^a ±0,072	0,47 ^a ±0,053	0,38 ^{ab} ±0,009	0,37 ^b ±0,033	0,36 ^b ±0,025
Mastigabilidade	5,50 ^a ±0,526	5,52 ^a ±0,462	4,54 ^a ±0,352	4,48 ^a ±0,492	4,83 ^a ±0,480

g.100g⁻¹ . Os valores foram expressos em média e desvio padrão. As letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os valores, considerando índice de significância p≤0,05.

Tabela 11. Parâmetros de cor dos pães com diferentes níveis de substituição da mistura por farinha de grão-de-bico (FGB)

Fator	Nível de substituição da mistura por FGB				
	0	15	25	35	45
L* miolo	60,98 ^a ±4,69	65,80 ^a ±4,79	67,41 ^a ±1,68	64,13 ^a ±4,19	65,10 ^a ±0,32
a* miolo	-0,97 ^a ±0,133	-0,83 ^a ±0,24	-0,80 ^a ±0,24	-0,51 ^b ±0,189	0,45 ^b ±0,33
b* miolo	14,39 ^d ±1,89	17,54 ^c ±1,28	19,55 ^{bc} ±1,36	20,62 ^b ±0,93	25,54 ^a ±1,07
C* miolo	14,41 ^d ±1,82	17,56 ^c ±1,27	19,57 ^{bc} ±1,35	20,63 ^b ±0,92	25,55 ^a ±0,54
H* miolo	85,97 ^b ±0,70	87,20 ^{ab} ±0,94	87,57 ^{ab} ±0,88	88,46 ^a ±0,55	88,8 ^a ±0,54
L* casca	33,48 ^{ab} ±1,48	34,25 ^a ±2,81	23,24 ^{ab} ±0,90	26,47 ^{ab} ±3,62	21,28 ^b ±2,25
a* casca	24,73 ^c ±1,21	26,43 ^{bc} ±0,84	27,86 ^{ab} ±0,29	29,43 ^a ±0,56	28,74 ^a ±0,69
b* casca	49,95 ^{ab} ±4,29	54,27 ^a ±3,08	39,27 ^{ab} ±1,37	45,23 ^{ab} ±1,82	36,26 ^b ±2,78
C* casca	55,87 ^{ab} ±3,71	60,46 ^a ±2,42	48,67 ^{ab} ±1,27	54,12 ^{ab} ±1,90	45,81 ^b ±2,50
H* casca	63,35 ^a ±2,72	65,80 ^a ±2,09	57,10 ^a ±0,72	56,5 ^a ±3,78	51,54 ^a ±3,87

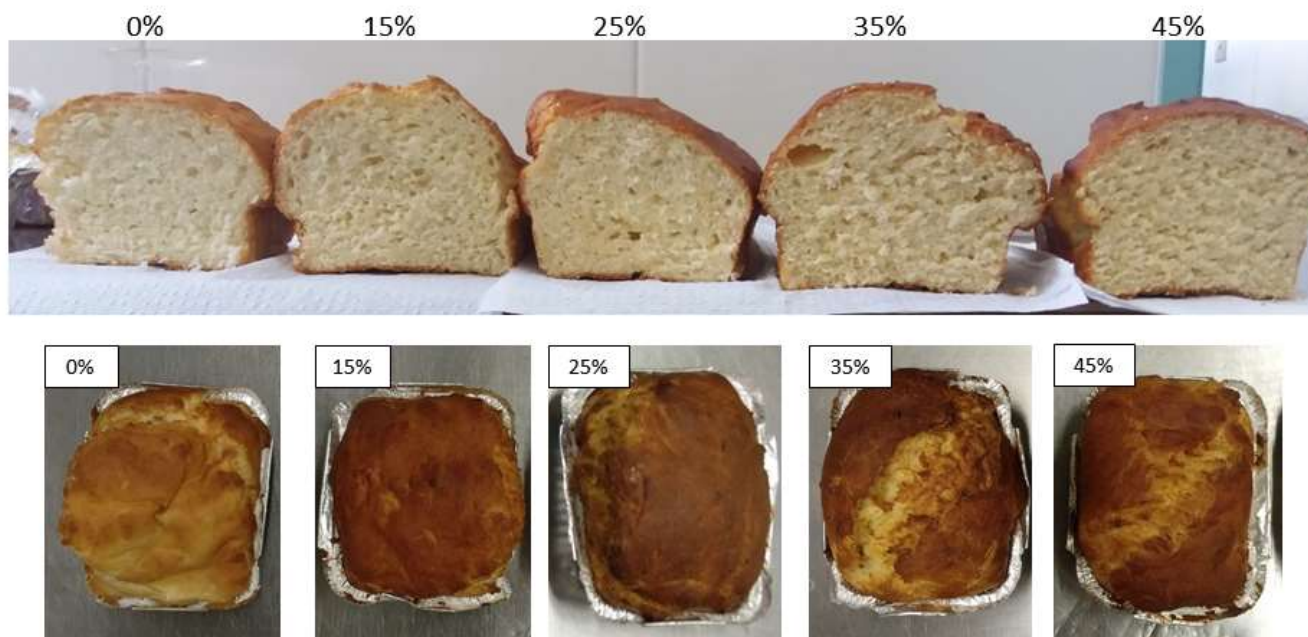
g 100g⁻¹. Os valores foram expressos em média e desvio padrão. As letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os valores, considerando índice de significância $p \leq 0,05$.

Tabela 12. Modelos para volume específico, parâmetros de textura e parâmetros de cor com coeficiente de nível de significância (P) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) em função do nível de substituição da mistura de farinhas pela farinha de grão-de-bico.

Resposta	Modelo	P	R^2_{aj}
Volume específico	$y = 2,2868 + 0,0167x$	0,000001	0,7487
Dureza	$y = 12,22 - 0,068x + 0,003x^2$	0000017	0,7251
Elasticidade	$y = 0,9124 - 0,0029x$	0,000009	0,6548
Coesividade	$y = 0,4856 - 0,0029x$	0,000377	0,4866
a* miolo	$y = -1,2083 + 0,0280x$	0,000045	0,5916
b* miolo	$y = 14,0383 + 0,2290x$	0,000000	0,8713
C* miolo	$y = 14,0588 + 0,2287x$	0,000000	0,8720
L* casca	$y = 34,63 - 0,2872x$	0,003773	0,3460
a* casca	$y = 25,0084 + 0,1014x$	0,000001	0,7476

Não foram obtidos modelos para o parâmetro de textura de mastigabilidade e para o parâmetro de cor L* miolo

A figura 3 representa os pães formulados de acordo com a variação da concentração de FGB. Foi possível perceber que a coloração do miolo se tornou mais amarelada com a adição da farinha de grão-de-bico à formulação, assim como a coloração da casca se apresentou mais escura quando comparadas à formulação controle com 0 g 100g⁻¹ de FGB. A partir das imagens também foi possível perceber que os pães com adição de FGB apresentaram melhor estruturação da massa após o resfriamento em relação à formulação controle.



A partir da tabela 10, foi possível observar que o volume dos pães sem glúten aumentou conforme foi aumentado o nível de substituição da FGB entre as concentrações de 0% e 45%. Os maiores resultados foram encontrados nos tratamentos com concentração acima de 25% de FGB, não apresentando diferença significativa entre elas. Para o parâmetro de dureza, apenas a formulação com 45% de FGB apresentou aumento significativo em relação às demais formulações, porém a adição de farinha de grão-de-bico proporcionou redução nos parâmetros de coesividade e elasticidade dos pães.

De acordo com os resultados encontrados, foi possível observar que a formulação com maior nível de substituição da mistura por FGB agrupa os melhores resultados de volume específico e aumento significativo na dureza, sendo possível afirmar que, a partir desse ponto, a adição de farinha de grão-de-bico passa a exercer efeito negativo na textura e crescimento da massa dos pães, provavelmente devido ao maior teor de fibras da amostra. Resultado semelhante foi descrito em estudo realizado por Couri e Giada (2016), em que foram avaliados pães sem glúten com adição de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB), que apresenta cerca de 20% de fibras totais, observando-se que a adição de 5% de FMB resultou no aumento do volume específico dos pães em relação à formulação controle, mas, em contrapartida, a adição de 10% de FMB provocou a redução do volume específico em relação à formulação controle. Segundo Ramos, Piemolini-Barreto e Sandri (2012), o excesso de fibras em produtos de panificação pode aumentar a densidade da massa pelo aumento da

absorção de água, o que interfere de forma negativa no crescimento dos pães e na maciez do miolo.

Miñarro et al. (2012) avaliaram pães sem glúten elaborados com amido de milho e adicionados de farinhas de diferentes leguminosas, encontrando para os pães adicionados de farinha de grão-de-bico valores de $3,26 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ para o volume específico, 0,55 para coesividade e 0,91 para elasticidade, sendo superiores aos resultados encontrados nessa pesquisa. As diferenças de valores encontradas podem estar relacionadas aos ingredientes e suas respectivas proporções utilizadas em cada formulação, além da influência dos equipamentos utilizados para a cocção dos pães e das diferenças durante a preparação da massa.

Buresová et al. (2017) analisaram pães sem glúten formulados com farinha de arroz, e observaram que a adição de farinha de grão-de-bico à massa aumentou de forma significativa a porosidade do miolo, o que está diretamente relacionado à maior retenção de ar na massa e, conseqüentemente, ao maior volume específico e melhora dos parâmetros de textura dos pães, fato também observado nesse estudo.

Segundo Aguilar et al. (2015), a utilização de farinhas com maior teor de proteínas, como a farinha de grão-de-bico, pode influenciar na melhora dos parâmetros de textura e aumento da vida útil de pães sem glúten pois retardam o processo de retrogradação do amido por propiciar a formação de complexos proteína-amido e reduzir a formação de complexos amido-amido. Além disso, segundo Aguilar et al. (2015) e Bashir e Aggarwal (2016), as proteínas e lipídios presentes na farinha de grão-de-bico apresentam importantes propriedades de emulsificação e formação de espuma, fazendo com que seja uma alternativa comumente utilizada na elaboração de pães e bolos sem glúten por proporcionar aumento do volume específico e melhora dos parâmetros de textura. De acordo com Arslan et al. (2019), as propriedades de emulsificação e formação de espuma podem ser facilitadas pela maior quantidade de fibras presente na farinha de grão-de-bico, que promove maior absorção de água pela massa e propicia a ligação química entre as moléculas de água e de proteína.

Foi possível observar que os valores de elasticidade diminuíram conforme se aumentou o nível de substituição de FGB. As formulações com 35% e 45% de FGB apresentaram os menores valores de elasticidade, embora a diferença significativa tenha ocorrido apenas em relação à formulação com 0% de FGB, que apresentou o maior valor de elasticidade. Os valores para o parâmetro de coesividade apresentaram redução na medida em que o nível de substituição de FGB foi aumentado, sendo que as formulações com 35% e 45% apresentaram redução significativa em relação às formulações com 0% e 15% de FGB.

Os valores para o parâmetro de mastigabilidade não apresentaram diferença significativa entre as formulações. Minarro et al. (2012) avaliou pães sem glúten formulados com farinha de grão-de-bico e encontrou valor de 0,55 para coesidade, sendo maior do que o encontrado nessa pesquisa. Buresóva et al. (2014) também avaliou pães sem glúten formulados com farinha de grão-de-bico e encontrou valores de 0,58 para coesividade e 1,7 para elasticidade, também maiores do que o encontrados nesse trabalho.

A luminosidade (L^*) do miolo não apresentou diferença significativa entre as formulações. Porém, foi possível observar que os valores para os parâmetros de a^* , b^* e C^* aumentaram de forma significativa conforme a concentração de FGB foi aumentada. Gómez et al. (2008) avaliaram bolos elaborados com diferentes níveis de substituição da farinha de trigo por farinha de grão-de-bico e também observaram que os valores de Croma (C^*) e coordenada de cromaticidade b^* do miolo aumentaram conforme se elevou o nível de substituição pela FGB. De acordo com Oliveira, Schmiele e Stell (2017) e Dadon, Abbo e Reifen (2017), as sementes de grão-de-bico são naturalmente amareladas devido ao seu conteúdo de carotenoides o que, segundo Shrivastava e Chakraborty (2018), pode provocar alterações na cor, especialmente no parâmetro b^* , quando aplicada a produtos de panificação.

A formulação com 15% de FGB apresentou valor de L^* da casca significativamente menor em relação à formulação com 45%, o que demonstra a influência da adição de FGB na coloração dos pães, especialmente na luminosidade da casca. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo realizado por Aguilar et al. (2015) em que foram elaborados pães sem glúten com farinha de grão-de-bico, observando-se que a adição de FGB resultou em pães com maior valor de L^* para a casca e, portanto, com a casca mais escura em comparação à formulação controle com 0% de farinha de grão-de-bico. Segundo Shrivastava e Chakraborty (2018), a adição de farinha de grão-de-bico em pães sem glúten promove escurecimento da casca devido à reação dos aminoácidos livres com os açúcares redutores decorrentes da hidrólise, respectivamente, das proteínas e do amido durante o processo de fermentação, o que facilita as reações de Maillard e de caramelização e a consequente formação de pigmentos, fato que provavelmente também tenha ocorrido nesse estudo.

De acordo com Arslan et al. (2019), a coloração da casca é um dos fatores relacionados à aceitação por parte dos consumidores de produtos panificados, porém os produtos de panificação sem glúten normalmente apresentam coloração mais clara e pálida da casca, fazendo com que a aplicação da farinha de grão-de-bico se torne uma alternativa interessante para melhorar essa característica sensorial e garantir maior aceitação comercial

dos produtos. Essa alteração na colocação da casca foi perceptível na figura 2 que demonstra claramente a diferença entre a formulação sem FGB e as demais.

Em relação aos parâmetros de b^* e C^* da casca, não foi possível observar uma tendência de aumento ou redução dos valores relacionados ao nível de farinha de grão-de-bico utilizado em cada formulação. De acordo com Arslan et al. (2019), a coloração da casca pode ser influenciada não só pela composição da matéria prima e ingredientes utilizados na formulação dos produtos, mas também pelas condições relacionadas ao processo de forneamento, como temperatura e modo de transferência de calor. Assim, a avaliação dos parâmetros de cromaticidade b^* e Croma da casca pode ter sido prejudicada devido á defeitos relacionados á regulagem do equipamento durante o processo de cocção dos pães.

A partir dos parâmetros avaliados, a formulação com 35% de FGB foi selecionada como sendo o nível de substituição ideal para a farinha de grão-de-bico, já que o pão apresentou bom volume específico, menor dureza e melhores valores de elasticidade e coesividade em relação ás demais formulações. A concentração de 35% de FGB foi então selecionada como base para o desenvolvimento das formulações do delineamento de misturas.

Ensaio 2: seleção da melhor formulação utilizando delineamento de misturas

A tabela 13 representa os valores obtidos para a análise de volume específico, parâmetros de textura, umidade e atividade de água dos pães submetidos ao delineamento de misturas. A tabela 14 respresenta os valores obtidos para a análise dos parâmetros instrumentais de cor dos pães.

Tabela 13. Resultados da análise de volume específico, parâmetros de textura, umidade e atividade de água dos pães elaborados em função das concentrações de farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB).

Fator	Formulações								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F7R1	F7R2
Volume específico (cm³ g⁻¹)	2,21±0,19	2,58±0,05	2,73±0,11	2,75±0,05	3,09±0,07	2,83±0,04	2,84±0,06	2,89±0,05	2,88±0,11
Dureza (N)	11,28±1,68	9,98±1,55	12,02±0,63	12,75±1,95	7,42±0,73	8,32±0,56	10,97±0,50	10,03±0,36	10,39±0,87
Elasticidade	0,92±0,03	0,88±0,01	0,87±0,01	0,88±0,001	0,91±0,01	0,91±0,007	0,89±0,007	0,87±0,008	0,89±0,006
Coesividade	0,78±0,01	0,77±0,002	0,74±0,007	0,74±0,01	0,79±0,007	0,78±0,01	0,76±0,008	0,75±0,005	0,76±0,01
Mastigabilidade	7,30±1,71	6,54±0,97	8,09±0,59	7,60±0,86	5,41±0,51	6,03±0,38	7,88±0,08	6,189±0,90	7,02±0,21
Umidade	41,61±1,69	41,17±0,86	41,42±0,79	40,06±0,79	40,22±1,87	41,27±0,71	40,16±0,78	41,57±1,37	40,25±1,03
Atividade de água	0,95±0,004	0,95±0,002	0,95±0,003	0,95±0,003	0,94±0,005	0,95±0,004	0,95±0,001	0,95±0,004	0,94±0,000

*os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

Tabela 14. Resultados da análise dos parâmetros instrumentais de cor dos pães elaborados em função das concentrações de farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB).

Fator	Formulação								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F7R1	F7R2
L* miolo	72,46±0,57	72,32±0,51	73,933±0,39	75,07±0,70	71,53±0,59	72,55±0,86	75,01±1,52	73,36±0,44	73,82±1,53
a* miolo	1,34±0,24	1,52±0,18	1,52±0,07	1,20±0,01	1,23±0,05	1,23±0,08	1,23±0,02	1,25±0,04	1,22±0,43
b* miolo	19,19±1,45	19,83±0,73	19,61±1,02	19,32±1,13	19,46±0,83	19,14±0,37	19,25±0,50	19,59±1,28	19,29±0,33
C* miolo	19,27±1,48	19,89±0,79	19,67±1,04	19,36±1,15	19,53±0,84	19,19±0,37	19,28±0,49	19,64±1,30	19,36±0,37
Hue miolo	85,27±0,83	85,72±1,49	85,48±0,72	86,473±0,69	85,44±0,83	86,29±0,85	86,70±0,42	86,10±0,62	85,43±0,88
L* casca	42,15±0,87	42,38±2,10	40,60±2,01	40,54±1,45	40,04±0,81	40,13±0,49	40,53±2,43	40,18±1,98	39,4±1,09
a* casca	25,59±0,54	25,63±0,29	25,89±0,54	25,70±0,62	24,90±0,92	25,99±0,29	26,04±0,75	26,10±0,18	24,03±0,22
b* casca	31,83±0,63	32,09±1,49	30,90±1,06	29,79±1,37	26,41±2,27	29,47±0,85	26,33±3,24	26,18±3,86	25,57±1,13
C* casca	40,33±0,37	40,50±0,37	39,87±1,96	39,39±1,30	36,37±2,21	39,32±0,83	38,37±2,87	37,05±2,78	35,17±0,73
Hue casca	51,29±1,02	50,50±2,53	49,26±1,61	49,08±1,07	46,50±1,63	48,46±0,53	47,07±2,45	47,29±4,25	46,65±1,52

*os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

A figura 4 representa os gráficos gerados a partir do delineamento de misturas para os parâmetros de volume específico, dureza, coesividade e coordenada de cromaticidade b^* da casca dos pães sem glúten. A tabela 15 representa os modelos obtidos para os parâmetros que apresentaram índice de significância ($p \leq 0,05$).

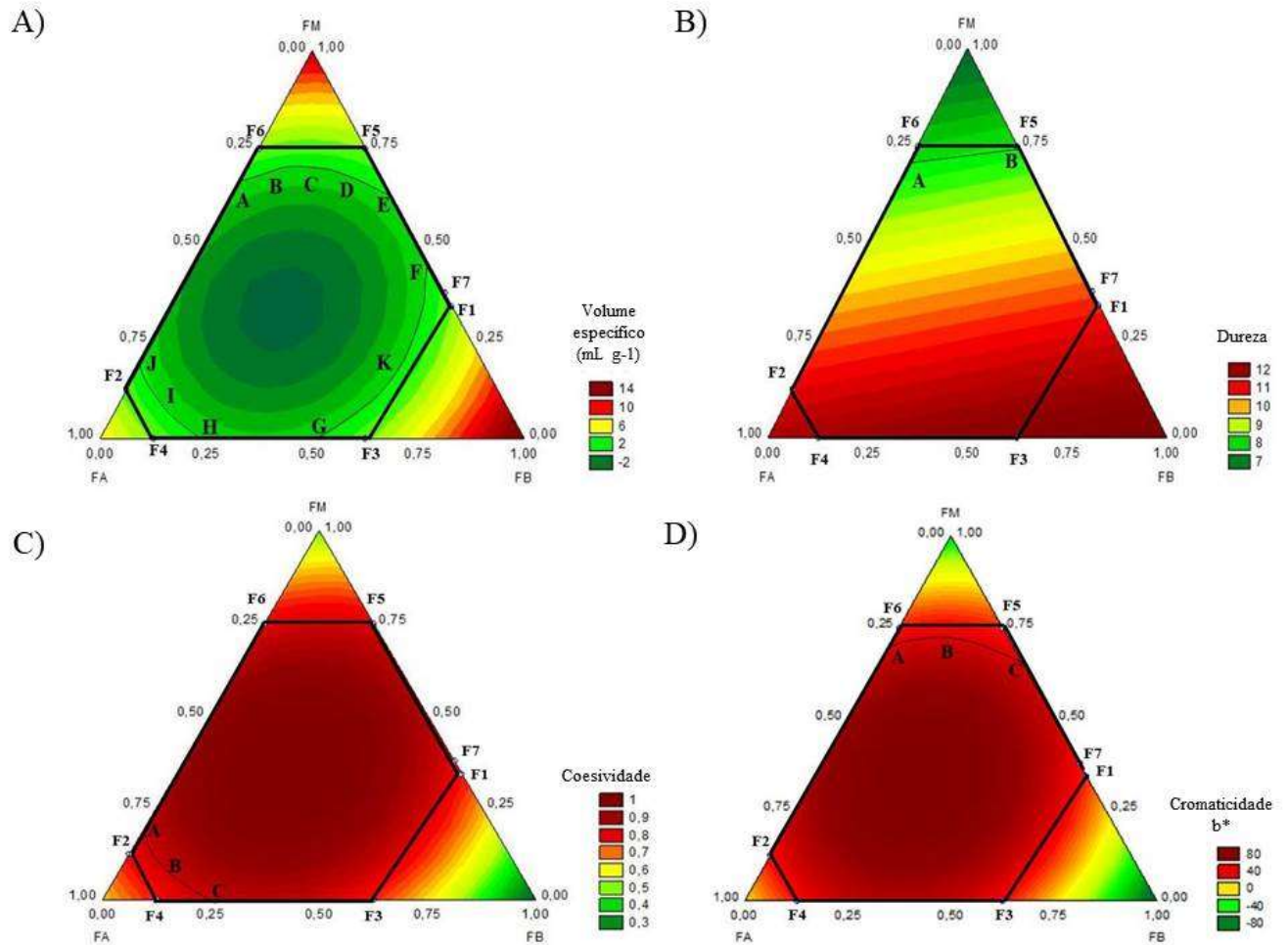


Figura 4. Resultados obtidos a partir do delineamento de misturas para os parâmetros de (A) Volume específico, (B) Dureza, (C) Coesividade, (D) Coordenada de cromaticidade b^* da casca dos pães elaborados em função das concentrações de farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB).

Tabela 15. Modelos para volume específico, parâmetros de textura e parâmetros de cor com coeficiente de nível de significância (P), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) e falta de ajuste (FA) em função da porcentagem de fécula de batata (a), farinha de arroz (b) e fécula de mandioca (c).

Resposta	Modelo	P	R^2_{aj}	FA
Volume específico	$y = 6,02a + 15,73b + 11,44c - 40,12ab - 38,42ac - 50,58bc$	0,04968	0,8343	0,9999
Dureza	$y = 11,64a + 12,78b + 6,47c$	0,005709	0,7617	0,1792
Coesividade	$y = 0,63a + 0,20b + 47c + 1,62ab + 1,48ac + 2,07bc$	0,03314	0,8747	0,9999
b* casca	$y = -1,33a - 96,80b - 51,35c + 392,38ab + 363,95ac + 475,82bc$	0,002	0,9811	0,9999

Não foram obtidos modelos para os demais parâmetros de textura e de cor

Os modelos ajustados para volume específico, dureza, coesividade e coordenada de cromaticidade b* da casca foram significativos ($p < 0,05$), com falta de ajuste não significativa, e explicaram de 76,17% a 98,11% das respostas (Tabela 15). Todos os efeitos lineares foram significativos, exceto para FB em coesividade e FA para b* da casca. As interações entre a farinha de arroz (FA) e fécula de mandioca (FM), fécula de batata e fécula de mandioca, e fécula de batata (FB) e farinha de arroz também foram significativas ($p < 0,05$) para volume específico, coesividade e b* da casca.

Os pães experimentais apresentaram menores valores de dureza conforme foram reduzidos os teores de FA e FB e aumentados os teores de FM, condição esta representada pela área do gráfico localizada entre os pontos F6, F5, A e B (Figura 3B). Assim, para se obter menores valores de dureza é necessário que as concentrações em componentes reais de FA variem de 25-37,8%, as de FM variem de 47,2-50% e as de FB variem de 15-25%.

As formulações F2 e F4, que foram elaboradas com as maiores proporções de FA (60%), também estão localizadas nas regiões do gráfico que apresentaram maiores valores de dureza (Figura 3B) e coesividade (Figura 3C), o que, segundo Xia et al. (2018), provavelmente se relaciona ao elevado valor de retrogradação apresentado pela farinha de arroz, fato observado (Tabela 4, artigo 1) já que os pães passaram por um período de aproximadamente 24 horas de resfriamento em temperatura ambiente antes de serem analisados. A maior dureza percebida quando se aumenta as proporções de fécula de batata pode estar relacionada, segundo Teba, Ascheri e Carvalho (2009), ao elevado valor de viscosidade máxima apresentado pela amostra (Tabela 4, artigo 1), já que a viscosidade

elevada da pasta pode interferir de forma negativa na qualidade final do produto, dificultando o crescimento da massa e resultando em pães com menor volume específico e maior dureza.

A fécula de batata apresenta, ainda, valor elevado de quebra de viscosidade e menor valor de temperatura de pasta, o que, segundo Witczak et al. (2016), está relacionado à baixa resistência e estabilidade da pasta aos processos de agitação e aquecimento, o que promove maior taxa de cisalhamento e interfere de forma negativa na força de desenvolvimento e expansão da massa, também gerando pães com menor volume específico e piores parâmetros de textura. A fécula de mandioca e a farinha de arroz apresentaram menores valores de quebra de viscosidade quando comparadas à fécula de batata e, portanto, podem ser importantes para manter a estrutura da massa durante o processo de expansão gerada pela fermentação e cocção.

A área do gráfico localizada entre os pontos F6, F5, A, B, C, D e E representa formulações experimentais que atingiram maiores valores de volume específico (Figura 4), com concentração real dos componentes variando de 25-36,6% para FA, de 48-50% para FM e de 15-27% para FB. O efeito da interação entre os componentes da mistura foi evidente quando foi aumentada a concentração de FM e reduzidas as concentrações de FA e FB, situação em que foi percebido o aumento do volume específico. A formulação F5 atingiu o maior volume específico, com valor de 3g ml^{-1} .

Também foi possível observar o efeito positivo da interação entre os componentes da mistura para o aumento do volume específico na área localizada entre os pontos F2, F4, J, I e H (com FA variando de 58,2-0,60%, FM de 20-26% e FB de 15-21,8%), quando a concentração de FA é aumentada e a de FM e FB são diminuídas, e também na área localizada entre os pontos F1, F3, F, K e G (com FA variando de 25-43,4%, FM de 20-40,8% e FB de 34,2-40%), quando a concentração de FB é aumentada e a de FA e FM são diminuídas. Entretanto, quando comparado ao gráfico de dureza, a área entre os pontos F6, F5, A, B, C, D e E está situada na região em que as formulações experimentais dos pães apresentaram menores valores de dureza (Figura 3B), enquanto as demais áreas, mesmo apresentando efeito no aumento do volume, estão localizadas nas áreas representativas aos maiores valores de dureza.

Ferreira et al. (2016) elaborou massas alimentícias sem glúten formuladas com sorgo, farinha de arroz (FA) e fécula de batata (FB), sendo que a utilização de maiores porcentagens de FB em relação à FA produziu massas com menores valores de dureza. Já em estudo realizado por Schamne, Dutcsky e Demiate (2010), foram analisados pães sem glúten elaborados com farinha de arroz, fécula de mandioca e amido de milho, observando-se que a

substituição por 50% de fécula de mandioca na formulação com 100% de farinha de arroz não teve interferência no volume específico dos pães, mas foi capaz de reduzir o valor de dureza, sendo que os menores valores de dureza dos pães dessa pesquisa também foram relacionados à utilização de 50% de fécula de mandioca.

Ainda no estudo realizado por Schamne, Dutcsky e Demiate (2010), os pães formulados com farinha de arroz e fécula de mandioca apresentaram volume específico que variou de $1,20 \text{ g mL}^{-1}$ a $1,70 \text{ g mL}^{-1}$, sendo menores do que os valores encontrados nesse trabalho, e valores de dureza que variaram de 28,59 N a 32,54 N, sendo maiores aos encontrados nessa pesquisa. As diferenças encontradas nos valores de volume específico e de dureza entre os pães dessa pesquisa e os desenvolvidos por outros autores podem ocorrer devido a fatores ligados à elaboração do produto, como o tipo e concentração das farinhas, os demais ingredientes utilizados na formulação e às formas e etapas de processamento.

A área situada entre os pontos F6, F5, A, B e C (Figura 3D), com valores dos componentes reais variando de 25-38,2% para FA, 45,2-50% para FM e 15-29,8% para FB é representativa de algumas das formulações experimentais que apresentaram b^* da casca elevado e, portanto, coloração mais escura.

A farinha de grão-de-bico apresenta tonalidade mais amarelada e, portanto, capaz de exercer maior influência na coloração dos produtos panificados, porém a sua proporção foi mantida fixa em todas as formulações do delineamento de misturas. Assim, considerando que as féculas de batata e de mandioca apresentam elevado valor de L^* (Tabela 2, artigo 1) e reduzidos valores de a^* e de b^* , provavelmente a coloração dos produtos tenha sofrido influência principalmente da farinha de arroz, que apresenta valor de b^* superior ao das féculas. Além disso, a FA apresenta maior teor de proteínas quando comparada às FB e FM, o que, segundo Pico et al. (2019), propicia a reação de Maillard e a consequente formação de pigmentos. A provável influência da farinha de arroz na coloração dos produtos também pode ser identificada a partir das formulações F2 e F4, que foram elaboradas com as maiores concentrações de FA (60%) e estão localizadas entre as regiões mais escuras do gráfico (Figura 3D). No estudo de Pico et al. (2019), foram avaliados pães sem glúten formulados com farinha de arroz e amido de milho e adicionados de diferentes proteínas de origem vegetal e animal, sendo que a adição de proteína de arroz provocou redução no valor de L^* e aumento nos valores de a^* e b^* da casca dos pães.

A validação dos modelos utilizados foi feita considerando-se os parâmetros que apresentaram significância estatística, ou seja, para volume específico, dureza, coesividade e b^* da casca. Para a validação do modelo obtido, o pão F5 foi novamente formulado, obtendo-

se valor de $3,0 \text{ cm}^3 \text{ mL}^{-1}$ para volume específico, 7,2 N para dureza, 0,73 para coesividade e 31,86 para coordenada de cromaticidade b^* da casca. Assim, os pães formulados no experimento apresentaram volume específico e características texturais próximas aos pães formulados para a validação do modelo, apresentando percentuais de variação de 2,91% para volume específico, 2,96% para dureza e 7,59% para coesividade. O maior percentual de variação (17,10%) foi encontrado para o parâmetro de cromaticidade b^* da casca, o que pode estar relacionado com as condições do equipamento durante o processo de cocção dos pães.

A figura 5 representa as fotos dos pães formulados a partir do delineamento de misturas, com variação das concentrações de farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB). A partir das imagens, foi possível observar que a formulação F5 apresentou maior aeração do miolo em relação às demais formulações. Todas as formulações apresentaram coloração do miolo visualmente semelhante, fato também confirmado na avaliação estatística, onde não ocorreram diferenças estatísticas para as análises dos parâmetros instrumentais de cor do miolo.

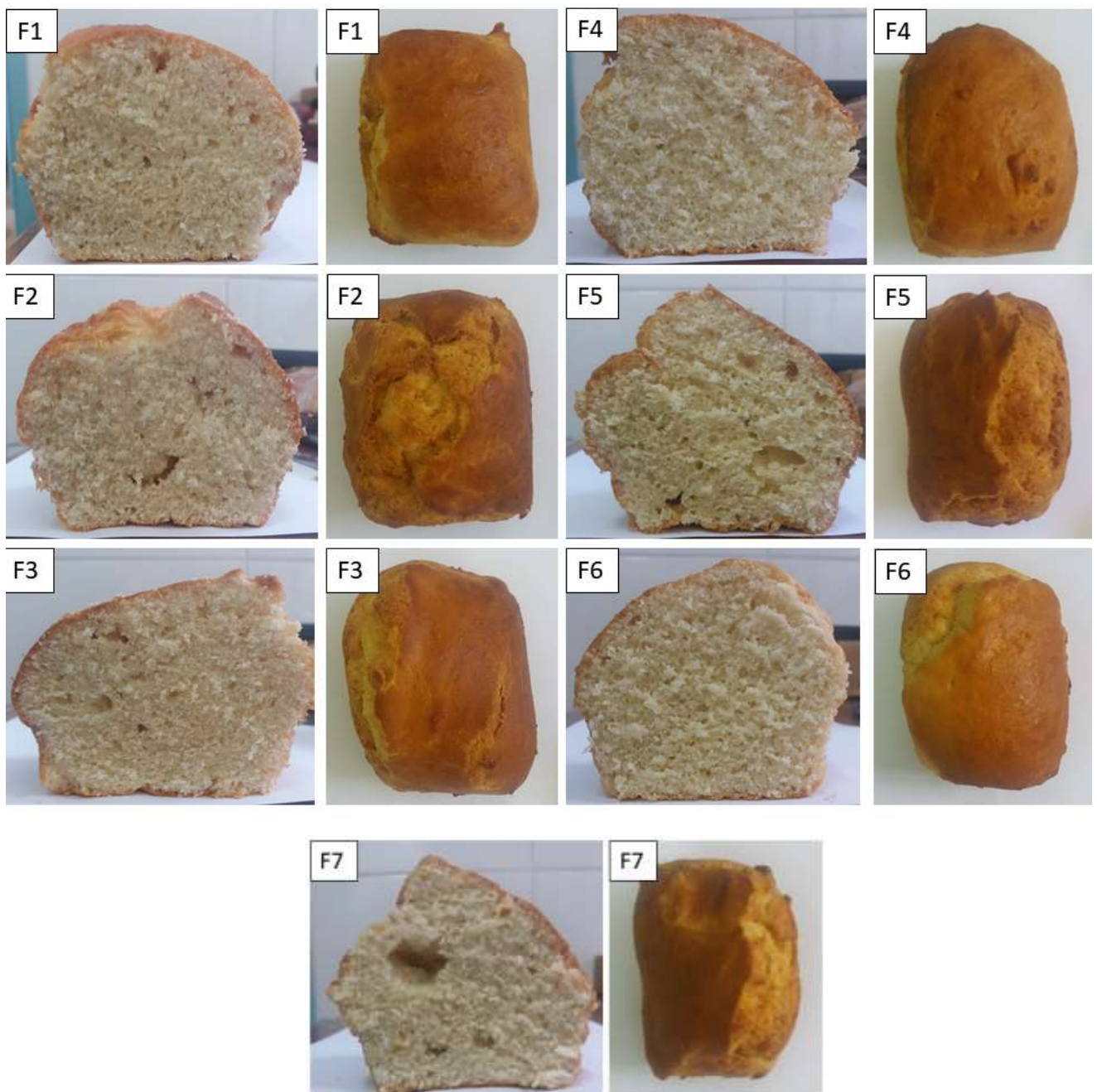


Figura 5. Pães elaborados a partir de delineamento de misturas com diferentes níveis de substituição para farinha de arroz (FA), fécula de mandioca (FM) e fécula de batata (FB).

3.4 Conclusão

A adição de farinha de grão-de-bico provocou efeitos na melhora dos parâmetros de textura, no escurecimento da casca e no aumento do volume específico dos pães sem glúten em relação à formulação controle (0% de FGB), sendo que o nível de substituição da mistura por 35% de FGB resultou no maior volume específico, baixo valor de dureza e em melhores parâmetros de elasticidade e coesividade. O delineamento de misturas foi importante para estabelecer as concentrações ideais de farinha de arroz e féculas de batata e mandioca, sendo que a formulação com 50% de FM, 25% de FA e 25% de FB foi considerada ideal para utilização na formulação de pão sem glúten por apresentar principalmente maior volume específico e menor dureza.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, N.; ALBANELL, E.; MIÑARRO, B.; CAPELLAS, M. Chickpea and tiger nut flours as alternatives to emulsifier and shortening in gluten-free bread. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 62, n. 1, p. 225-232, 2015.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 19th edition. Washington: AOAC, 2012.
- ARSLAN, M.; RAKHA, A.; XIABO, Z.; MAHMOOD, M.A. Complimenting gluten free bakery products with dietary fiber: opportunities and constraints. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 194-202, 2019.
- BARROS, B. N.; SCARMINIO, B.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Editora Bookman, 4 ed., p. 289-290, 2003.
- BASHIR, K.; AGGARWAL, M. Effects of gamma irradiation on the physicochemical, thermal and functional properties of chickpea flour. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 69, p. 614-622, 2016.
- BURESOVÁ, I.; TOKÁR, M.; MARECEK, J.; HRIVNA, L.; FAMERA, O.; SOTTNÍKOV, V. The comparison of the effect of added amaranth, buckwheat, chickpea, corn, millet and quinoa flour on rice dough rheological characteristics, textural and sensory quality of bread. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 75, p. 158-164, 2017.
- COURI, M.H.S.; GIADA, M.L.R. Gluten-free bread added with babassu (*Orbignya phalerata*) mesocarp flour: physical, chemical and sensorial evaluation. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n.3, p. 297-304, 2016.
- DADON, S.B-E.; ABBO, S.; REIFEN, R. Leveraging traditional crops for better nutrition and health - The case of chickpea. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 64, p. 39-47, 2017.
- ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. S. Complementary parameters of requirements to fixing identity and quality of bakery products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 802-806, 2005.

FERREIRA, S.M.R.; MELLO, A.P.; ANJOS, M.C.R.; KRÜGERA, C.C.H.; AZOUBEL, P.M.; ALVES, M.A.O. Utilization of sorghum, rice, corn flours with potato starch for the preparation of gluten-free pasta. **Food Chemistry**, Londres, v. 191, p. 147–151, 2016.

GOBBETTI, M.; PONTONI, E.; FILANNINO, P.; RIZZELLO, C.G.; ANGELIS, M.; CAGNOA, R.D. How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food science perspective. **Food Research International**, Essex, v. 110, p. 22–32, 2018.

GÓMEZ, M.; OLLETE, B.; ROSELL, C.M.; PANDO, V.; FERNÁNDEZ, E. Studies on cake quality made of wheatechickpea flour blends. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 41, n. 9, p. 1701-1709, 2008.

HARDER, M.N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Quantitative evaluation by a digital colorimeter of the color of the egg of laying hens fed with annatto (*Bixa orellana*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.102, n. 563, p.339-342, 2007.

MIÑARRO, B.; ALBANELL, E.; AGUILAR, N.; GUAMIS, B.; CAPELLAS, M. Effect of legumeflours on baking characteristics of gluten-free bread. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 56, n. 2, p. 476-481, 2012.

MIR, S.A.; SHAH, M.A.; NAIK, H.R.; ZARGAR, I.A. Influence of hydrocolloids on dough handling and technological properties of gluten-free breads. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige, v. 51, p. 49-57, 2016.

MOHAMMADI, M., AZIZI, M-H., NEYESTANI, T.R., HOSSEINI, H., MORTAZAVIAN, A.M. Development of gluten-free bread using guar gum and Transglutaminase. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Coréia do Sul, v. 21, p. 1398-1402, 2015.

NAQASH, F.; GANI, A.; GANI, A.; MASOODI, F.A. Gluten-free baking: Combating the challenges - A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige, v. 66, p. 98-107, 2017.

OLIVEIRA, L.C.; SCHMIELE, M.; STEEL, C.J. Development of whole grain wheat flour extruded cereal and process impacts on color, expansion, and dry and bowl-life texture. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 75, p. 261-270, 2017.

PICO, J.; REGUILÓN, M.P.; BERNAL, J.; GÓMEZ, M. Effect of rice, pea, egg White and whey proteins on crust quality of rice flour-corn starch based gluten-free breads. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 86, p. 92-101, 2019.

RAMOS, N.C.; PIEMOLINI-BARRETO, L.T.; SANDRI, I.G. Preparation of pre-mixing for cake without gluten. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 1, p. 33-38, 2012.

SCHAMNE, C.; DUTCOSKY, S.D.; DEMIATE, I.M. Obtention and characterization of gluten-free baked products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 741-750, 2010.

SHRIVASTAVA, C.; CHAKRABORTY, S. Bread from wheat flour partially replaced by fermented chickpea flour: Optimizing the formulation and fuzzy analysis of sensory data. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 90, p. 215–223, 2018.

TEBA, C.S; ASCHERI, J.L.R; CARVALHO, C.W.P. Effect of extrusion parameters on the paste properties of precooked pasta of rice and beans. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 411-426, 2009.

XIA, T.; GOU, M.; ZHANG, G.; LI, W.; JIANG, H. Physical and structural properties of potato starch modified by dielectric treatment with different moisture content. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 118, p. 1455–1462, 2018.

WITCZAK, M.; ZIOBRO, R.; JUSZCZAK, L.; KORUS, J. Starch and starch derivatives in gluten-free systems - A review. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 67, p. 46-57, 2016.

4. CAPÍTULO 4

ARTIGO 3 – PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE ALFA AMILASE, AMILOGLUCOSIDASE E CELULASE NA FORMULAÇÃO DE PÃES SEM GLÚTEN

RESUMO

A aplicação de enzimas em produtos de panificação sem glúten vem sendo estudada como uma alternativa para a substituição de aditivos químicos, como melhoradores de farinha e emulsificantes, já que apresentam efeitos na otimização da fermentação, melhora da textura da massa e maciez do miolo e aumento de volume dos pães. Assim, este trabalho teve como objetivo produzir extratos enzimáticos de alfa amilase, amiloglucosidase e celulase, além de aplicá-los na elaboração de pães sem glúten formulados com farinhas de arroz e de grão-de-bico e com féculas de mandioca e de batata. Para caracterização dos extratos enzimáticos foram feitas a dosagem de atividade enzimática, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page) e zimograma. Os pães foram elaborados aplicando-se diferentes concentrações dos extratos enzimáticos, e avaliados quanto ao volume específico, parâmetros instrumentais de cor, parâmetros texturais, atividade de água e umidade. As análises de composição química, sensorial e microbiológica foram realizadas na melhor formulação com a aplicação dos extratos enzimáticos e na formulação controle. Através do zimograma foi possível observar a atividade das enzimas amilolíticas e de celulase. A utilização de 2mL do extrato de alfa amilase e amiloglucosidase garantiu o aumento significativo do volume do pão em relação às demais formulações, além de melhorar significativamente os parâmetros de dureza e mastigabilidade e aumento significativo da umidade em relação à formulação controle. Assim, a utilização de extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase pode ser uma alternativa viável para melhorar as características de textura e volume específico de pães sem glúten.

Palavras-chave: enzimas, alimento sem glúten, amido, farinha de grão-de-bico, farinha de arroz

4.1 Introdução

A aplicação de enzimas em produtos panificados vem ganhando importância devido à exigência cada vez maior por parte dos consumidores por ingredientes considerados mais naturais e também devido à demanda por produtos de qualidade, similares aos convencionais, por portadores de restrição ao gluten. As enzimas podem ser utilizadas como uma alternativa para a substituição de aditivos químicos, como melhoradores de farinha e emulsificantes, já que apresentam efeitos na otimização da fermentação, melhora da textura da massa e maciez do miolo e aumento de volume dos pães. A utilização de enzimas também vem sendo indicada como uma alternativa importante para melhorar as propriedades tecnológicas e sensoriais de produtos de panificação sem glúten, que são normalmente caracterizados por apresentar vários defeitos pós-cozimento, como textura endurecida do miolo, volume reduzido, cor mais clara do miolo e da casca, vida útil e valor nutricional reduzidos (TEBBEN; SHEN; LI, 2018; CONTE et al., 2018).

As amilases e glucoamilases (amiloglucosidase) são enzimas normalmente utilizadas para aplicação em produtos alimentícios, sendo definidas como glicoproteínas extracelulares sintetizadas por diferentes espécies de micro-organismos, entre eles *Apergillus*, *Bacillus* e *Streptomyces*, apresentando ampla aplicação em diversas áreas como a indústria de alimentos e bebidas, têxtil, farmacêutica, de papel e detergentes (DOJNOV; VUJCIC, 2012; XIEA et al., 2014) . Especialmente nas indústrias alimentícias, a alfa amilase e amiloglucosidase são normalmente empregadas de forma concomitante nos processos de hidrólise do amido, que ocorre basicamente em duas etapas, onde a alfa amilase é responsável pela hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e a amiloglucosidase pela hidrólise das ligações $\alpha(1-6)$ das extremidades não redutoras (SALGAONKAR; NADAR; RATHOD, 2018).

A partir da degradação do amido são gerados polissacarídeos de baixo peso molecular e dextrinas, o que leva ao aumento da presença de açúcares fermentáveis, otimizando a ação fermentativa da levedura e o aumento da liberação de gás na massa, provocando efeitos desejáveis no aumento de volume dos pães e melhora da textura do miolo. Além disso, a maior presença de açúcares redutores leva à formação de produtos resultantes da reação de Maillard, intensificando o sabor dos pães e escurecimento da casca (TEBBEN; SHEN; LI, 2018; MATSUSHITA et al., 2017).

Outra enzima normalmente utilizada em diversas áreas da indústria é a celulase, uma enzima capaz de degradar a celulose, o principal polissacarídeo que compõe a parede celular dos vegetais, gerando como produtos primários a glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos, o

que garante às celulases importantes aplicações industriais na área de alimentos, detergentes, têxtil e ração animal (BUDIHAL; AGSAR; PATIL, 2016; JUTURU; SINGH, 2018). Os oligossacarídeos gerados a partir da degradação da celulose são carboidratos parcialmente fermentáveis pelas bactérias que compõe a flora intestinal, podendo ser-lhes atribuída função prebiótica. Assim, as celulases podem ter influência na melhora do valor nutricional dos produtos alimentícios (GIESE et al., 2011).

Assim, o objetivo do estudo foi produzir e aplicar extratos enzimáticos de alfa amilase, amiloglucosidase e celulase oriundos de subprodutos da industrialização de arroz na formulação de pães sem glúten elaborados com farinhas de arroz e de grão-de-bico e féculas de mandioca e de batata, visando a melhoria das propriedades físicas e sensoriais do produto, assim como fornecer uma nova opção de formulação para portadores de restrição ao consumo do glúten.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material

Os grãos quebrados utilizados na elaboração da farinha de arroz foram doados pela empresa Cristal Alimentos, situada na BR 153, em Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil. A fécula de mandioca foi doada pela empresa FEBELA Agroindustrial Ltda., localizada na cidade de Bela Vista de Goiás, Goiás, Brasil. O grão-de-bico utilizado para elaboração da farinha, a fécula de batata e os demais ingredientes necessários para a formulação dos pães foram adquiridos no comércio local da cidade de Goiânia, Goiás, Brasil.

As enzimas foram produzidas no Laboratório de Bioquímica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Para produção dos extratos enzimáticos foram utilizados sub-produtos da industrialização de arroz. Para produção do extrato de celulase foi utilizada a mistura de farelo de arroz (3 g) e casca de arroz (2 g) como substrato. Para a produção do extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase foi utilizada casca de arroz (5 g) como substrato.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Produção e caracterização dos extratos enzimáticos

4.2.2.1.1 Fermentação semi-sólida

A partir de uma placa já cultivada, foram feitos os repiques de *Streptomyces thermocerredoensis* I3 em placa contendo meio Pridham (extrato de levedura 4,0 g L⁻¹; extrato de malte 10 g L⁻¹; C₆H₁₂O₆; ágar 20 g L⁻¹; água destilada), que foi então levada para estufa a 37°C por três dias.

A realização da fermentação semi-sólida foi baseada em metodologia adaptada de Bakri, Jacques e Thonart (2003). Em um Erlenmeyer, foram adicionados 100 mL de meio Pridham líquido (extrato de levedura 4,0 g L⁻¹; extrato de malte 10 g L⁻¹; C₆H₁₂O₆; água destilada) e 5g de substrato, sendo então levados para a autoclave. Em seguida, foram colocados 10 mL de água destilada autoclavada na placa contendo o repique de *Streptomyces*, e os esporos foram soltos com o auxílio de uma alça de vidro. Com uma pipeta, foram coletados 2 mL dos esporos em suspensão e inoculados no meio Pridham líquido autoclovado contendo o substrato. Os Erlenmeyers foram, então, mantidos sob agitação em estufa a 37°C por 4 dias. Após o período de incubação, os meios foram centrifugados para coleta do sobrenadante, que foi armazenado sob congelamento para posterior análise e utilização.

4.2.2.1.2 Determinação da atividade enzimática para celulase

A dosagem para atividade enzimática de celulase foi realizada em micro ensaio, baseada na metodologia adaptada proposta por Ramada et al. (2010). Em placas de micro ensaio, foram adicionados 50µL de CMC 1 g 100⁻¹ diluído em tampão citrato de sódio pH 4,8 e 50µL de amostra (extrato enzimático), sendo então encubados por 1 hora a 50°C em termociclador (Bio-rad T100, Foster City, USA). Para o branco, foram adicionados apenas 50 µL de CMC. Em seguida, foram adicionados 100µL de ADNS, e a mistura foi novamente aquecida a 100°C por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 540nm. A atividade enzimática foi calculada a partir da curva padrão estabelecida.

4.2.2.1.3 Determinação da atividade enzimática para alfa amilase e amiloglucosidase

A determinação da atividade enzimática para alfa amilase e amiloglucosidase foi realizada com base em metodologia proposta por Almeida et al. (2009).

Para determinação da atividade enzimática de amiloglucosidase, foram colocados, no tubo de ensaio, 60µL de amostra (extrato enzimático), 40µL de solução tampão citrato de sódio e 100µL de substrato (solução de amido 0,5 g 100g⁻¹). Para o branco, foram adicionados 60µL de amostra (extrato enzimático) fervido (para inativação da enima), 40µL de solução

tampão citrato de sódio e 100µL de substrato (solução de amido 0,5 g 100g⁻¹). Os tubos foram, então, colocados em banho de aquecimento a 37°C por 30 minutos. Após os tubos serem retirados do banho, adicionou-se 500µL de ADNS e 300µL de tampão citrato de sódio pH 4,8, passando novamente por aquecimento a 100°C por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura em absorbância de 550nm. A atividade enzimática foi calculada a partir da curva padrão estabelecida.

Para determinação da atividade enzimática de alfa amilase, foram colocados, no tubo de ensaio, 60µL de amostra (extrato enzimático), 40µL de solução tampão citrato de sódio e 100µL de substrato (solução de amido 0,5 g 100g⁻¹). Para o branco, foram adicionados 60µL de amostra (extrato enzimático) fervido (para inativação da enima), 40 µL de solução tampão citrato de sódio e 100 µL de substrato (solução de amido 0,5 100g⁻¹). Os tubos foram, então, colocados em banho de aquecimento a 42°C por 30 minutos. Após os tubos serem retirados do banho, foram adicionados 200µL de ácido acético, 200 µL de solução iodo Fuwa e 9,4 mL de água destilada. Em seguida, foi realizada a leitura em absorbância de 660 nm. A atividade enzimática foi calculada a partir da curva padrão estabelecida.

4.2.2.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida do sulfato dodecil de sódio (SDS-Page)

Para a elaboração do gel de poliacrilamida foi utilizada metodologia descrita por Laemmli (1970), com a aplicação de um gel de concentração 2 g 100g⁻¹ e um gel de separação 12%. As amostras foram, inicialmente, incubadas com ácido tricloroacético (TCA) 20 g 100g⁻¹ por 1 hora e, em seguida, lavadas com acetona refrigerada e adicionadas de tampão contendo Tris-HCl 100 mL, SDS 4 g 100g⁻¹, azul de bromofenol 0,2 g 100g⁻¹, glicerol 20 g 100g⁻¹ e marcaptoetanol 10 g 100g⁻¹. As amostras preparadas foram aplicadas no gel e, após a corrida, o gel foi corado em solução contendo Comassie blue 0,1 g 100g⁻¹, metanol 40 g 100g⁻¹ e ácido acético 10 g 100g⁻¹ durante 1 hora. Em seguida, o gel foi descorado em solução contendo metanol 40 g 100g⁻¹ e ácido acético 10 g 100g⁻¹ até que as bandas se tornassem visíveis. A massa molecular de cada banda foi analisada de acordo com o marcador BLUeye Prestained Protein Ladder (10 a 245kDa).

4.2.2.1.5 Zimograma

O zimograma para determinação da atividade de enzimas amilolíticas foi realizado de acordo com metodologia descrita por Wanderley et al. (2004). Após a eletroforese (descrita no item 6.2.2.4), o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 durante uma hora. Em seguida, o gel foi incubado em solução contendo tampão acetato de sódio 50 mM

pH 5,5 e amido solúvel $0,5 \text{ } 100\text{g}^{-1}$ por 12 horas a 4°C . Após esse período, o gel foi novamente incubado a 37°C por 2 horas, e então corado com solução de iodo contendo I_2 1mM e KI 0,5M para detecção dos halos correspondentes á atividade enzimática.

O zimograma para determinação de atividade enzimática de celulase foi realizado de acordo com metodologia descrita por Blum et al. (1999). Foi acrescentado ao gel de poliacrilamida CMC $0,2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. Após a eletroforese, o gel foi incubado por uma hora em solução Triton X-100 $1 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e, em seguida, por mais 12 a 50°C em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Após o período de incubação, o gel foi submerso em solução vermelho congo $0,1 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ por 20 minutos, e então lavado com NaCl 1M até a visualização dos halos correspondentes á atividade enzimática.

4.2.2.2 Formulação dos pães

Os pães foram elaborados nos laboratórios da Escola Senai Vila Canaã, localizada na cidade de Goiânia, Goiás. A formulação dos pães foi estabelecida a partir de testes preliminares, baseando-se em 100g totais da mistura de farinhas e féculas. Os demais ingredientes utilizados foram: $50 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de ovo *in natura* (Qualitá, Classe A), $20 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de óleo vegetal (Liza), $15 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de açúcar (União), $2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de goma xantana (Leve Crock), $2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de fermento biológico seco (Fleishmann), $4 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de sal (Cisne refinado), $60 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de água mineral.

Para formulação dos pães foram seguidos os seguintes passos: em batedeira planetária (Arno Deluxe 220V, São Paulo, Brasil) foi colocado o ovo, o açúcar e o óleo e homogeneizados por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, foram acrescentadas as farinhas e as féculas, a água, o extrato enzimático e o fermento, e a massa foi homogeneizada por 1 minuto. Por fim, foram acrescentados o sal e a goma xantana e a massa foi novamente homogeneizada por 1 minuto.

A massa foi colocada em formas de alumínio e submetida á para fermentação por 40 minutos, em câmara de fermentação (Venâncio AC20T, Venâncio Aires, Brasil), a uma temperatura de 35°C e $85 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de umidade. Após a fermentação, os pães foram assados em forno (Millenium 1CL ELET 380V/60Hz Perfecta, Curitiba, Brasil) a 180°C por 20 minutos.

4.2.2.3 Planejamento experimental para aplicação das enzimas

A aplicação das enzimas nas formulações de pães sem glúten foi realizada a partir de delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram utilizados dois extratos enzimáticos em concentrações diferentes, de acordo com a tabela 16:

Tabela 16. Planejamento experimental utilizado nas formulações de pães sem glúten com aplicação dos extratos enzimáticos

Formulação	Extrato enzimático – Celulase (mL)	Extrato enzimático – Alfa amilase e amiloglucosidase (mL)
CONTROLE	-	-
F1	1,0	-
F2	2,0	-
F3	-	1,0
F4	-	2,0
F5	0,5	0,5
F6	1,0	1,0

Foram elaboradas 3 repetições para cada formulação.

4.2.2.4 Caracterização física dos pães

Para a análise de volume específico, os pães prontos foram resfriados a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e então pesados em balança analítica. Em seguida, o volume de cada pão foi determinado através do deslocamento de sementes de painço, de acordo com método descrito por Mohammadi et al., (2015). O cálculo do volume específico foi realizado através da razão entre o volume e a massa dos pães, através da equação 9:

$$VE = \frac{V}{m} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

VE = volume específico ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$)

V = volume (cm^3)

m = massa (g)

A análise de textura dos pães sem glúten foi realizada de acordo com os parâmetros sugeridos por Esteller e Lannes (2005). A análise foi realizada em texturômetro Stable Micro Sistem (TA HD Plus, Godalming, UK), considerando-se os atributos de dureza, elasticidade, coesividade e mastigabilidade. Foram considerados os seguintes parâmetros: probe cilíndrica de 20 mm de diâmetro, força de gatilho (*tigger force*) de 10 g, velocidade pré-teste de 20 mm/s, velocidade teste de 10 mm/s, velocidade pós-teste de 10 mm/s. Foram utilizadas fatias de 20 mm de espessura. Foram realizadas 10 repetições para cada replicata da formulação.

As análises de cor dos pães foram realizadas utilizando-se um colorímetro (Bankinh Meter Minolta, BC-10, Ramsey, USA), de acordo com o sistema CIE L*a*b*. Os resultados foram expressos em: valores de L* (luminosidade ou brilho), que variam do preto (0) ao branco (100); valores de a*, que variam do verde (-60) ao vermelho (+60); e valores de b*, que variam do azul (-60) ao amarelo (+60) (HARDER, CANNIATTI-BRAZACA e ARTHUR, 2007). Foram realizadas 10 repetições para cada replicata da formulação. Também foi calculado o índice de croma de acordo com a equação 10 e o ângulo Hue de acordo com a equação 11:

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Equação 10})$$

$$H^* = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (\text{Equação 11})$$

Em que:

C* = cromaticidade

H* = ângulo Hue

Tan⁻¹ = arco tangente

a* = coordenada de cromaticidade entre verde e vermelho

b* = coordenada de cromaticidade entre azul e amarelo

4.2.2.5 Caracterização química dos pães sem glúten

Foi selecionada a formulação controle (pão sem glúten sem adição do extrato enzimático) e a formulação com adição do extrato enzimático que obteve os melhores resultados nas análises físicas para que fosse determinada a composição centesimal.

As análises físico-químicas do pão sem glúten e da formulação controle foram realizadas segundo as normas descritas por AOAC (2012), de acordo com os seguintes procedimentos: o teor de proteína foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl (AACC 46-13), seguindo as etapas de digestão, destilação e titulação, e utilizando-se 6,25 como fator de conversão em proteína bruta; o teor de lipídios foi determinado utilizando-se extrator Soxhlet e éter de petróleo (AOAC 920.39 C); a umidade foi determinada por dessecação da amostra em estufa a 105°C até atingir peso constante (AOAC 920.39); o teor de cinzas foi determinado por carbonização da amostra, seguida por incineração completa em mufla a 550°C 900.02); o teor de fibras alimentares foi determinado a partir do método enzimo-gravimétrico.

O teor de carboidratos totais e valor energético total foram calculados de acordo com FAO (2003). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença, subtraindo-se de cem os valores obtidos para umidade, cinzas, proteínas e lipídios. O valor enérgico foi estimado através dos valores de conversão de Atwater, multiplicando-se o conteúdo de carboidratos por 4, o de proteínas por 4 e o de lipídios por 9, sendo que a soma desses produtos constituiu o valor energético total.

A medida da atividade de água foi realizada utilizando-se o equipamento de higrômetro do ponto de orvalho Acqua Lab (Braseq CX-2-T, São José dos Campos, Brasil), á temperatura constante (24±1°C).

4.2.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada a partir do software computacional STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2007, Tulsa, EUA).

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados obtidos, considerando-se índice de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para avaliação dos dados de volume específico, parâmetros de textura, parâmetros instrumentais de cor, umidade e atividade de água, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey para determinação das diferenças significativas. Para avaliação da composição físico-química, pH e acidez total titulável da melhor formulação selecionada e da formulação controle, as médias foram comparadas pelo Teste t para determinação das diferenças significativas.

4.3 Resultados

A figura 6 representa o gel de poliacrilamida e os zimogramas obtidos para o extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase e para o extrato enzimático de celulase.

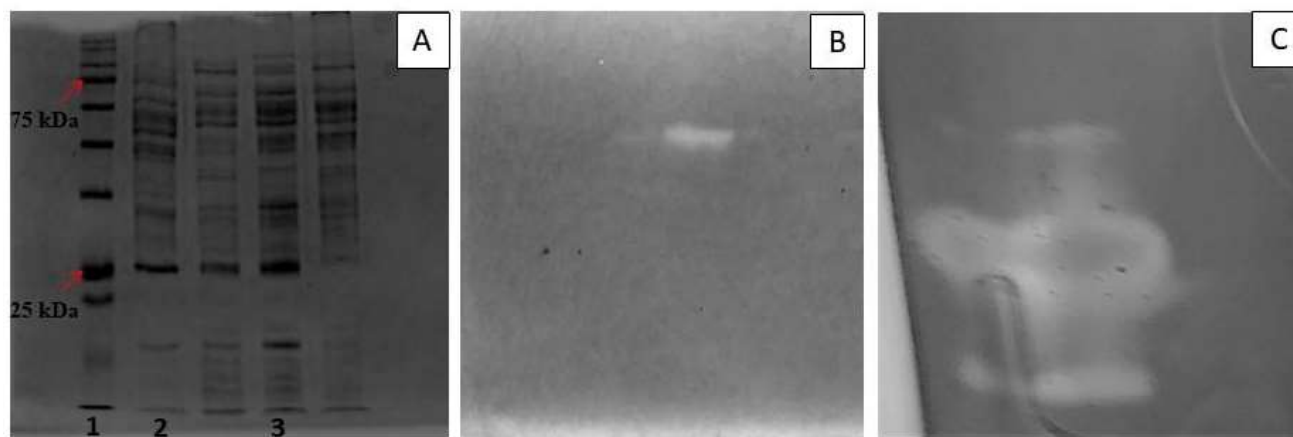


Figura 6. A: Gel de poliacrilamida (1: marcador; 2: extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase; 3: extrato enzimático de celulase); B: Zimograma para o extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase; C: zimograma para o extrato enzimático de celulase.

As manchas esbranquiçadas no zimograma confirmam a atividade enzimática de alfa amilase e amiloglucosidase (Figura 6B) e de celulase (Figura 6C) nos extratos analisados. Para alfa amilase e amiloglucosidase foram determinadas as atividades enzimáticas, respectivamente, de 2,68 U/mg e 4,53 U/mL, e para celulase foi determinada a atividade enzimática de 0,89 U/mL.

Frantz et al. (2019) produziram extratos enzimáticos a partir do macromiceto *Coprinus comatus* utilizando sub produtos do trigo, e encontraram valores de atividade enzimática para alfa amilase que variaram de 3,69 U mL⁻¹ a 6,07 U mL⁻¹, sendo maiores que os encontrados nesse estudo, e valores de atividade enzimática para amiloglucosidase que variaram de 0,26 U mL⁻¹ a 0,64 U mL⁻¹, sendo menores do que os encontrados nessa pesquisa.

Nascimento et al. (2009) utilizou cepas de *Streptomyces malaysiensis* para produzir celulase a partir de resíduos de malte do mosto cervejeiro e de farelo de trigo, encontrando valores de atividade enzimática que variaram de 0,240 U mL⁻¹ a 0,719 U mL⁻¹, sendo inferiores ao valor encontrado nesse trabalho. Mohana (2014) produziu celulase utilizando diferentes cepas de *Streptomyces* e encontrou atividades enzimáticas que variaram de 0,501 U mL⁻¹ a 1,381 U mL⁻¹, semelhante ao valor encontrado nessa pesquisa.

As diferenças nos valores de atividade enzimática podem estar relacionadas aos substratos utilizados na produção dos extratos. Segundo Cruz et al. (2011), as enzimas

normalmente apresentam um mecanismo de controle da expressão em que a atividade enzimática pode ser inibida por produtos do meio gerados durante as vias metabólicas. Os autores identificaram que a atividade da enzima purificada foi cerca de duas vezes maior que a atividade enzimática do extrato bruto. Além disso, a atividade enzimática pode sofrer variações de acordo com o micro-organismo e o substrato utilizado na fermentação (CRUZ et al., 2011). A partir do gel de poliacrilamida (Figura 6A), foi possível observar a presença de uma grande quantidade de bandas em ambos os extratos enzimáticos analisados, indicando que a atividade metabólica do micro-organismo liberou vários resíduos no meio, o que pode reduzir a atividade enzimática das enzimas analisadas nessa pesquisa.

A tabela 17 representa os valores obtidos a partir a partir das análises físicas dos pães formulados com diferentes concentrações dos extratos enzimáticos de alfa amilase e amiloglucosidase e de celulase.

Tabela 17. Resultados das análises de volume específico, parâmetros de textura, teor de umidade e atividade de água dos pães com adição de diferentes volumes dos extratos enzimáticos

Fator	Formulações						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	CONTROLE
Volume específico (cm³ g⁻¹)	3,04 ^b ±0,02	2,96 ^b ±0,03	3,04 ^b ±0,03	3,26 ^a ±0,06	3,07 ^b ±0,04	3,02 ^b ±0,08	3,0 ^b ±0,07
Dureza (N)	5,27 ^{bc} ±0,19	5,79 ^b ±0,27	5,89 ^b ±0,030	4,72 ^c ±0,60	5,15 ^{bc} ±0,14	5,13 ^{bc} ±0,26	7,2 ^a ±0,15
Elasticidade	0,95 ^a ±0,008	0,95 ^a ±0,27	0,95 ^a ±0,002	0,94 ^a ±0,004	0,95 ^a ±0,005	0,95 ^a ±0,009	0,94 ^a ±0,005
Coesividade	0,75 ^a ±0,01	0,74 ^a ±0,02	0,73 ^a ±0,01	0,74 ^a ±0,01	0,74 ^a ±0,02	0,73 ^a ±0,01	0,73 ^a ±0,01
Mastigabilidade	3,69 ^{bcd} ±0,04	4,0 ^{bcd} ±0,05	4,08 ^{bc} ±0,47	3,31 ^d ±0,38	3,50 ^{cd} ±0,04	4,21 ^b ±0,17	5,09 ^a ±0,10
Umidade	39,79 ^{ab} ±0,86	39,99 ^{ab} ±0,98	39,9 ^{ab} ±0,14	40,66 ^a ±0,32	41,8 ^a ±0,18	41,23 ^a ±0,84	38,12 ^b ±1,4
Atividade de água	0,96 ^a ±0,002	0,96 ^a ±0,008	0,95 ^a ±0,002	0,95 ^a ±0,002	0,96 ^a ±0,003	0,96 ^a ±0,001	0,95 ^a ±0,006

Os valores foram expressos em média e desvio padrão. As letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os valores, considerando índice de significância $p \leq 0,05$.

A formulação F4 apresentou volume específico significativamente maior em relação às demais formulações, inclusive para a formulação controle. Foi possível perceber que a adição dos extratos enzimáticos reduziu de forma significativamente a dureza dos pães sem glúten em relação à formulação controle, sendo que a formulação F4 foi similar às formulações F1, F5 e F6. Em relação à mastigabilidade, a formulação controle também apresentou diferença significativamente maior em relação às demais formulações e a formulação F4 mostrou-se similar às formulações F1, F2 e F5. As formulações não apresentaram diferenças significativas entre o controle e as demais formulações quanto aos parâmetros de elasticidade, coesividade e atividade de água.

Haghighat-Kharazi et al. (2019) analisaram pães sem glúten elaborados com farinha de arroz e farinha de grão-de-bico e com a adição de amilase, verificando que a enzima não provocou alterações no volume específico dos pães, mas teve influência no aumento da umidade e na redução do valor de dureza. Sciarini et al. (2012) também analisaram pães sem glúten com adição de diferentes concentrações de alfa amilase, e observaram que a utilização da enzima influenciou no aumento do volume específico e na redução dos valores de dureza dos pães, assim como os resultados encontrados nesse estudo.

Liu et al. (2017) e Sciarini et al. (2012) avaliaram o comportamento reológico da massa de pães, respectivamente, de farinha de trigo e sem glúten, após a adição de alfa amilase e observaram que a enzima foi capaz de reduzir a resistência à extensão da massa, o que permite maior expansão e redução da dureza dos pães, mas também pode afetar a estabilidade da massa durante o processo de cocção. Segundo os autores, as enzimas amilolíticas atuam na hidrólise das moléculas de amido, liberando dextrinas de baixo peso molecular, o que fornece maior quantidade de açúcar fermentescível e favorece a fermentação, mas também é capaz de interferir na textura da pasta. Nesse estudo também se observou a interferência da adição e da concentração de extrato de enzimas no aumento de expansão e diminuição da dureza de formulações de pães elaborados com farinha de grão-de-bico, farinha de arroz, fécula de mandioca e fécula de batata.

A farinha de grão-de-bico apresenta bom teor de fibras e proteínas, o que, segundo Gobbetti et al. (2018) e Ayala-Soto, Serna-Saldívar e Welte-Chanes (2017), pode auxiliar na emulsificação e na manutenção da estabilidade da massa, garantindo melhor estrutura para a expansão e retenção de gás proporcionada pela ação das enzimas amilolíticas durante o processo de fermentação e cocção dos pães. A influência do teor de fibras na estabilidade de massas adicionadas de amilase também foi observada por Liu et al. (2017), que avaliou pães formulados com farinha de trigo e com a adição de farelo de trigo, constatando que a adição

de alfa amilase na massa regular reduziu tanto a resistência à extensão quanto a estabilidade da massa, porém a adição de alfa amilase nos pães com farelo de trigo reduziu a resistência á extensão, mas também foi capaz de manter a estabilidade da massa, o que é importante para a retenção de ar e o crescimento uniforme dos pães durante a cocção.

A adição do extrato enzimático de celulase reduziu a dureza dos pães em relação à formulação controle, mas não teve efeito no aumento do volume específico, o que pode estar relacionado, segundo Palabiyik et al. (2016), à digestão enzimática da celulose que transforma parte da fibra insolúvel presente na massa em fibra solúvel. Efeito semelhante foi encontrado por Liu et al. (2017), que avaliou os efeitos da adição de celulase em pães com farelo de trigo, observando a enzima foi capaz de reduzir a dureza e a resistência à extensão, mas também reduziu a estabilidade da pasta, o que pode, segundo o autor, prejudicar a expansão e a retenção de ar na massa. Nesse estudo, foi possível verificar que a concentração do extrato enzimático pode ter influência positiva ou negativa nas características dos pães produzidos.

Segundo Martínez, Díaz e Gómez (2014), as fibras solúveis são capazes de melhorar os parâmetros de textura de pães sem glúten devido à sua capacidade de emulsificação, mas, quando em excesso, podem competir com o amido para a absorção de água e prejudicar o processo de gelatinização dos grânulos. Por outro lado, as fibras insolúveis permanecem praticamente inalteradas durante a fermentação e cocção dos pães, auxiliando na manutenção da estabilidade e estrutura da massa durante o processo de expansão (MARTÍNEZ; DÍAZ; GÓMEZ, 2014).

Para a umidade, foi possível observar que a formulação controle apresentou valor significativamente menor do que as formulações F4, F5 e F6. A influência da adição de alfa amilase no aumento da umidade de pães sem glúten também foi observada por Haghghat-Kharazi et al. (2019), o que, segundo os autores, está relacionado à maior absorção de água pelas moléculas geradas a partir da digestão enzimática do amido, sendo importante para evitar a textura esfarelenta do miolo e reduzir a dureza dos pães.

Os valores obtidos a partir da análise dos parâmetros instrumentais de cor dos pães formulados estão reresentados na tabela 18.

Tabela 18. Análise de parâmetros de cor dos pães com adição de diferentes volumes dos extratos enzimáticos

Fator	Formulação						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	CONTROLE
L* miolo	67,24 ^a ±1,23	68,4 ^a ±0,67	67,22 ^a ±0,78	68,55 ^a ±0,09	68,19 ^a ±0,09	67,03 ^a ±0,55	69,74 ^a ±1,54
a* miolo	0,40 ^b ±0,05	0,45 ^{ab} ±0,02	0,52 ^{ab} ±0,05	0,54 ^{ab} ±0,05	0,56 ^a ±0,10	0,50 ^{ab} ±0,03	0,40 ^b ±0,03
b* miolo	22,5 ^b ±1,35	24,8 ^a ±0,63	24,62 ^{ab} ±0,20	24,33 ^{ab} ±0,88	24,33 ^{ab} ±0,49	24,19 ^{ab} ±0,31	23,18 ^{ab} ±0,93
C* miolo	22,5 ^b ±1,35	24,8 ^a ±0,62	24,63 ^{ab} ±0,20	24,34 ^{ab} ±0,88	24,34 ^{ab} ±0,49	24,20 ^{ab} ±0,31	23,18 ^{ab} ±0,93
Hue miolo	88,98 ^a ±0,11	88,95 ^a ±0,03	88,78 ^a ±0,11	88,72 ^a ±0,14	88,67 ^a ±0,25	88,79 ^a ±0,07	89,01 ^a ±0,08
L* casca	42,63 ^{ab} ±0,71	43,34 ^a ±0,53	42,20 ^{ab} ±0,98	42,04 ^{ab} ±0,70	41,58 ^{ab} ±1,23	41,07 ^b ±0,39	42,26 ^{ab} ±0,29
a* casca	22,25 ^{ab} ±0,24	21,67 ^{ab} ±0,60	20,90 ^b ±0,13	22,91 ^a ±0,10	21,88 ^{ab} ±0,80	21,51 ^b ±0,76	21,83 ^{ab} ±0,26
b* casca	31,86 ^a ±1,04	32,11 ^a ±0,74	31,65 ^a ±0,79	32,51 ^a ±1,25	32,39 ^a ±0,33	31,83 ^a ±0,42	31,86 ^a ±0,94
C* casca	38,89 ^a ±0,74	38,75 ^a ±0,89	37,95 ^a ±0,63	39,81 ^a ±0,95	38,43 ^a ±0,43	39,14 ^a ±0,27	38,63 ^a ±0,91
Hue casca	55,05 ^a ±1,19	55,97 ^a ±0,45	56,55 ^a ±0,74	54,73 ^a ±1,17	55,90 ^a ±1,10	55,92 ^a ±1,18	55,55 ^a ±0,45

Os valores foram expressos em média e desvio padrão. As letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os valores, considerando índice de significância $p \leq 0,05$.

As formulações não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros de L^* e Hue do miolo, e b^* , C^* e Hue da casca. Para os parâmetros de L^* e a^* da casca não foi possível identificar uma tendência de aumento ou redução dos valores de acordo com o extrato enzimático ou sua respectiva quantidade adicionada.

Foi observado que as formulações F3, F4, F5 e F6, que foram elaboradas com a adição de extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase, apresentaram maiores valores de a^* do miolo em relação à formulação controle, que não possui adição de extrato enzimático, e em relação às formulações F1 e F2, que foram elaboradas apenas com o extrato enzimático de celulase. Para o parâmetro C^* do miolo, as formulações F3, F4, F5 e F6 não apresentaram diferenças significativas entre si. Alterações nos parâmetros de cor de pães sem glúten a partir da adição de amilase à formulação também foram relatadas por Haghighat-Kharazi et al. (2019), que identificaram aumento no valor da coordenada de cromaticidade b^* da casca, o que pode estar relacionado à maior concentração de açúcares livres na massa gerados a partir da digestão enzimática do amido, o que propicia maior interação com os aminoácidos e as reações de Maillard e de caramelização. Porém, tal alteração não foi observada na casca das formulações desse experimento.

Como não foram observadas variações relevantes nos parâmetros instrumentais de cor entre as diferentes formulações e o controle, optou-se por selecionar como formulação ideal a que apresentou menor valor de dureza, mastigabilidade significativamente menor em relação à formulação controle e volume específico significativamente maior em relação às demais formulações. Assim, a formulação F4, que teve a adição de 2 mL do extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase, foi selecionada como sendo a ideal e, portanto, utilizada para realizar as análises físico-químicas em comparação com o controle.

A figura 7 representa os pães elaborados com as diferentes concentrações dos extratos enzimáticos de alfa amilase e amiloglucosidase e de celulase. A partir das imagens, foi possível perceber que os pães F3 e F4, formulados apenas com extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase, apresentaram aparentemente a casca mais arredondada e, portanto, maior crescimento e estrutura mais uniforme da massa. As demais formulações, que receberam adição do extrato enzimático de celulase, mesmo que em diferentes proporções, apresentaram a casca mais plana, podendo estar relacionada à maior dificuldade de expansão da massa devido à digestão da estrutura das fibras insolúveis pela enzima.

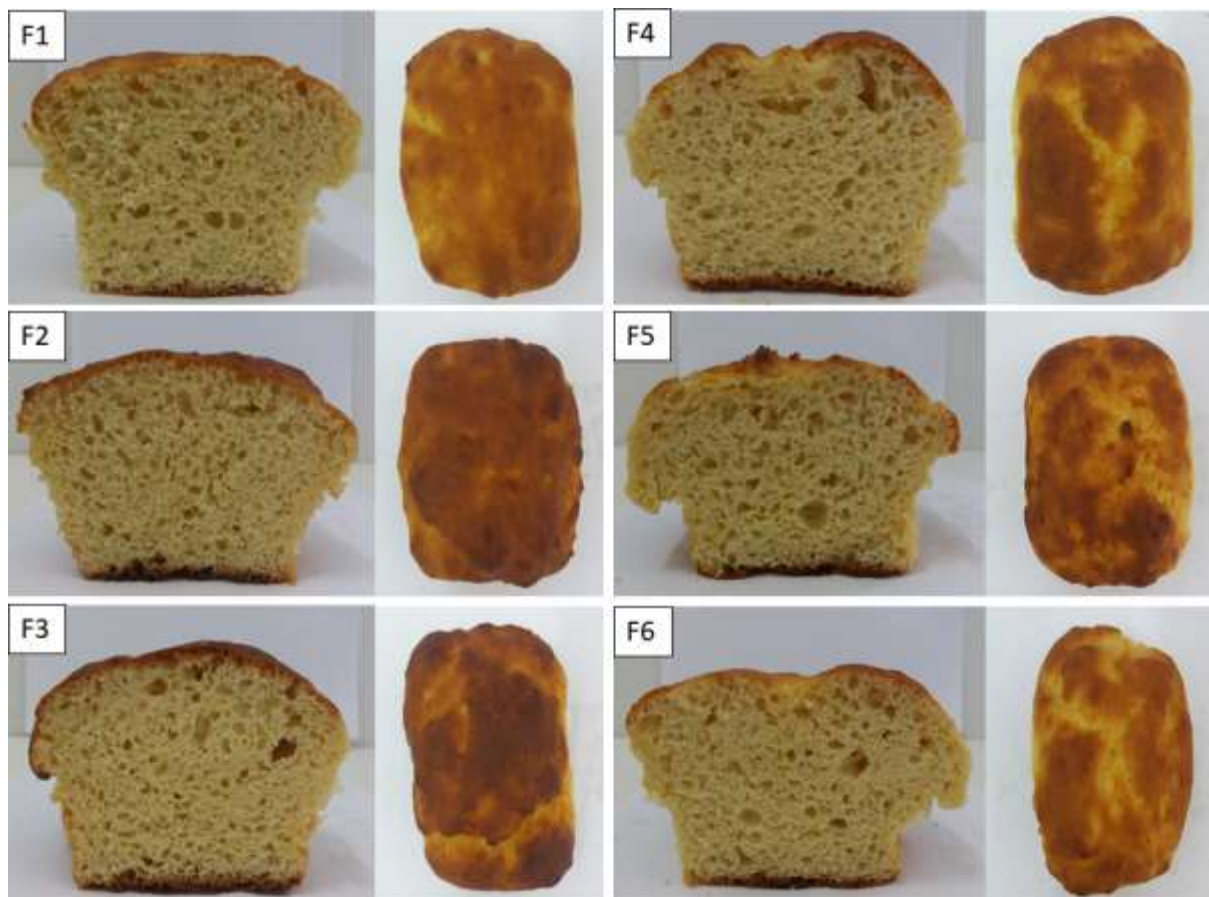


Figura 7. Pães elaborados com a adição de diferentes volumes de extrato enzimático de alfa amilase, amiloglicosidase e celulase.

Tabela 19. Análise físico-química, pH e acidez da formulação F4 e da formulação controle

Fator	Formulação	
	F4	Controle
Cinzas¹	3,780 ^a ±0,003	3,718 ^a ±0,034
Lipídio¹	12,586 ^a ±0,254	10,755 ^b ±0,0207
Proteína¹	9,249 ^a ±0,220	8,036 ^b ±0,041
Fibras alimentares¹	5,611 ^a ±0,172	5,738 ^a ±0,048
Fibra insolúvel¹	4,332 ^a ±0,296	4,480 ^a ±0,019
Fibra solúvel¹	1,184 ^a ±0,068	1,165 ^a ±0,070
Carboidratos disponíveis¹	28,106 ^b ±0,225	33,627 ^a ±1,305
pH	6,135 ^a ±0,010	6,245 ^a ±0,063
Acidez total titulável³	0,156 ^b ±0,004	0,175 ^a ±0,006
Valor energético total²	273,925 ^a ±0,726	274,957 ^a ±4,648

Os valores foram expressos em média e desvio padrão. As letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os valores, considerando índice de significância $p \leq 0,05$. ¹expresso em g 100 g⁻¹; ²kcal 100 g⁻¹; ³g de NaOH 100 g⁻¹

A tabela 19 representa os valores obtidos a partir da análise físico-química, de pH e acidez total titulável da formulação F4 e da formulação controle

A adição de enzimas amilolíticas nas formulações não teve influência no valor de cinzas, cinzas, pH e acidez total titulável dos pães sem glúten, mas reduziu de forma significativa os valores de carboidratos disponíveis e carboidratos totais e aumentou os valores de proteínas e lipídios. A redução nos valores de carboidratos já era esperada, já que, segundo Sciarini et al. (2012), as enzimas amilolíticas atuam na hidrólise das moléculas de amido, liberando maior quantidade de açúcares fermentescíveis que serão consumidos pelo micro-organismo durante o processo de fermentação.

Quanto ao aumento de proteínas, para Kashiwagi, Ogino e Kondo (2017), além das enzimas extracelulares, o *Streptomyces* pode secretar diversos peptídeos como metabólitos secundários, o que pode explicar o aumento do teor de proteínas dos pães formulados com adição do extrato enzimático em relação à formulação controle. A secreção dos metabólitos secundários também pode ser observada a partir da quantidade de bandas obtidas no gel de poliacrilamida (Figura 6A).

Frantz et al. (2019) identificaram que o pH ótimo para a atividade enzimática da alfa amilase e amiloglucosidase no extrato bruto foi de, respectivamente, 6,0 e 6,5. Os pães formulados com adição de extrato enzimático apresentaram pH de 6,13, considerado então apropriado para a adequada atividade das enzimas utilizadas.

4.4 Conclusão

Foi possível a produção de enzimas a partir de resíduos da indústria de arroz, como a casca e o farelo de arroz, embora ainda sejam necessários novos estudos para melhor caracterização das enzimas e a possibilidade de otimização da atividade enzimática. A utilização das enzimas proporcionou melhora nos parâmetros de textura aos pães sem glúten, sendo que a adição de 2 mL do extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase garantiu menor dureza e maior volume específico aos pães. A adição de 2 mL de alfa amilase também foi importante para o aumento da umidade dos pães, além de reduzir o valor de carboidratos disponíveis sem alterar o valor de fibras. Assim, a utilização de enzimas amilolíticas obtidas utilizando-se subprodutos da industrialização de arroz pode ser uma alternativa viável para o desenvolvimento de formulações de pães sem glúten para disponibilização de novos produtos, com boas características de qualidade, para serem consumidos por portadores de restrição ao glúten.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.C.O.; CRUZ, M.L.; CARDOSO, J.L.; LIMA, W.J.N. Análise da produção de amiloglucosidase e alfa-amilase por *Aspergillus awamori* através de fermentação batelada em frascos agitados. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2009.
- AOAC - Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 19th edition. Washington: AOAC, 2012.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.
- AYALA-SOTO, F.E.; SERNA-SALDÍVAR, S.O.; WELTI-CHANES, J. Effect of arabinoxylans and laccase on batter rheology and quality of yeast-leavened gluten-free breads. **Journal of Cereal Science**, Londres, v. 73, p. 10-17, 2017.
- BAKRI Y.; JACQUES P.; THONART P. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10–10c in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 108, n. 1, p. 737-748, 2003.
- BLUM D.L.; LI X.L.; CHEN H.; LJUNG D.H.L. Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 3990-3995, 1999.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 10 jun. 2017.
- BUDIHAL, S.R.; AGSAR, D.; PATIL, S. Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. **Bioresource Technology**, Nova York, v.200, p.706–712, 2016.
- CONTE, P.; CAROA, A.D.; BALESTRA, F.; PIGAA, A.; FADDA, C. Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physicochemical, technological and sensory approach. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 90, p. 1-7, 2018.
- CRUZ, E.A.; MELO, M.C.; SANTANA, N.B.; FRANCO, M.; SANTANA, R.S.M.; SANTOS, L.S.; GONÇALVES, Z.S. Alpha-Amylase Production by *Aspergillus Niger* in

Cassava Peels Waste. **UNOPAR Científica - Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 13, n. 4, p. 245-249, 2011.

DOJNOV, B.; VUJCIC, Z. Fast and reliable method for simultaneous zymographic detection of glucoamylase and α -amylase in fungal fermentation. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 421, n. 2, p. 802-804, 2012.

ESTELLER, M. S., LANNES, S. C. S. Complementary parameters of requirements to fixing identity and quality of bakery products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 802-806, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Food energy: methods of analysis and conversion factors. Report of a technical workshop. FAO, Food and Nutrition Paper, 77, Rome, 2003.

FRANTZ, S.C.; PALUDO, L.C.; STUTZ, H.; SPIER, M.R. Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: Optimization, kinetic parameters, partial purification and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Alberta, v. 17, p. 82–92, 2019.

GIESE, E.C.; HIROSI, T.; SILVA, M.L.C.; SILVA, R.; BARBOSA, A.M. Production, properties and applications of oligosaccharides. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 683-700, 2011.

GOBBETTI, M.; PONTONIO, E.; FILANNINO, P.; RIZZELLO, C.G.; ANGELIS, M.; CAGNO, R. How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food Science perspective. **Food Research International**, Essex, v. 110, p. 22–32, 2018.

HAGHIGHAT-KHARAZIA, S.; MILANI, J. M.; KASAAI, M.R.; KHAJEH, K. Use of encapsulated maltogenic amylase in maltodextrins with diferente formulations in making gluten-free breads. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 110, p. 182–189, 2019.

HARDER, M.N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Quantitative evaluation by a digital colorimeter of the color of the egg of laying hens fed with annatto (*Bixa orellana*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 102, n. 563, p. 339-342, 2007.

JUTURU, V.; WU, J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Holanda, v. 33, p. 188–203, 2014.

KASHIWAGI, N.; OGINO, C.; KONDO, A. Production of chemicals and proteins using biomass-derived substrates from a *Streptomyces* host. **Bioresource Technology**, Nova York, v. 245, p. 1655-1663, 2017.

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

LIU, W.; BRENNAN, M.A.; SERVENTI, L.; BRENNAN, C.S. Effect of cellulase, xylanase and amylase combinations on rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. **Food Chemistry**, Londres, v. 234, p. 93–102, 2017.

MARTÍNEZ, M.M.; DÍAZ, Á.; GÓMEZ, M. Effect of different microstructural features of soluble and insoluble fibres on gluten-free dough rheology and bread-making. **Journal of Food Engineering**, Califórnia, v. 142, p. 49–56, 2014.

MATSUSHITA, K.; SANTIAGO, D.M.; NODA, T.; TSUBOI, K.; KAWAKAMI, S.; YAMAUCHI, H. The Bread Making Qualities of Bread Dough Supplemented with Whole Wheat Flour and Treated with Enzymes. **Food Science and Technology Research**, Tsukuba, v. 23, n. 3, p. 403-410, 2017.

MOHAMMADI, M., AZIZI, M-H., NEYESTANI, T.R., HOSSEINI, H., MORTAZAVIAN, A.M. Development of gluten-free bread using guar gum and Transglutaminase. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Coréia do Sul, v. 21, p. 1398–1402, 2015.

MOHANTA, Y.K. Isolation of Cellulose-Degrading Actinomycetes and Evaluation of their Cellulolytic Potential. **Bioengineering and Bioscience**, Osaka, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2014.

NASCIMENTO, R.P.; JUNIOR, N.A.; PEREIRA JR., N.; BOM, E.P.S.; COELHO, R.R.R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, p. 529–535, 2009.

PALABIYIK, I., YILDIZ, O., TOKER, O.S., CAVUS, M., CEYLAN, M.M., YURT, B. Investigating the addition of enzymes in gluten-free flours and the effect on pasting and textural properties. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v. 69, p. 633-641, 2016.

PEREIRA, E.N.; GUIMARÃES, D.A.L.; FERNANDES, G.; ALVES, L.; OLIVEIRA, J.C.; JARDIM, F.B.B. Sensory acceptance of bread successfully based on sorghum flour. **Revista Inova Ciência & Tecnologia**, Uberaba, v. 3, n. 2, p. 49-55, 2017.

RAMADA M.H.S.; LOPES F.A.C.; ULHOA C.J.; SILVA R.N. Optimized microplate β -1, 3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. Screening. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdã, v. 81, n. 1, p. 6-10, 2010.

SALGAONKAR, M.; NADAR, S.S., RATHOD, V.K. Combi-metal organic framework (Combi-MOF) of α -amylase and glucoamylase for one pot starch hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 113, p. 464-475, 2018.

SCIARINI, L.S.; RIBOTTA, P.D.; LEÓN, A.E.; PÉREZ, G.T. Incorporation of several additives into gluten free breads: Effect on dough properties and bread quality. **Journal of Food Engineering**, Califórnia, v. 111, n. 4, p. 590-597, 2012.

TEBBEN, L.; SHEN, Y.; LI, Y. Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrige, v.81, p.10-24, 2018.

WANDERLEY, K.J.; TORRES, F.A.G., MORAES, L.M.P.; ULHOA, C.J. Biochemical characterization of K-amylase from the yeast *Cryptococcus Lavus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdã, v. 231, p. 165-169, 2004.

XIE, F.; QUAN, S.; LIU, D.; MA, H.; LI, F.; ZHOU, F.; CHEN, G. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. **Process Biochemistry**, Londres, v. 49, n. 1, p. 47–53, 2014.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As farinhas e féculas analisadas apresentaram características físicas, físico-químicas, químicas e tecnológicas adequadas para que as matérias primas tenham potencial de aplicação em produtos de panificação convencionais e produtos sem glúten.
- A adição de farinha de grão-de-bico às formulações de pães sem glúten teve efeito positivo no volume específico, textura e coloração da casca dos pães, sendo que a concentração de 35% da FGB resultou em pães com as características físicas mais desejáveis.
- A partir do delineamento de misturas foi possível estabelecer a concentração ideal para a mistura da farinha de arroz e féculas de batata e mandioca, sendo que a proporção de 50% de FM, 25% de FB e 25% de FA resultou em pães com maior volume específico e menor dureza.
- Foi possível a produção de extratos enzimáticos de alfa amilase, amiloglucosidase e celulase a partir de casca e farelo de arroz.
- A aplicação de 2 mL de extrato enzimático na formulação dos pães sem glúten resultou em aumento do volume dos pães e redução dos parâmetros de dureza e mastigabilidade.
- A utilização de extrato enzimático de alfa amilase e amiloglucosidase se mostrou uma alternativa viável para melhorar as características físicas de produtos de panificação sem glúten.
- É importante que sejam realizados novos estudos para avaliar a potencialização da atividade enzimática, a fim de se otimizar a sua eficiência para aplicação em produtos de panificação sem glúten.

ANEXO – SUBMISSÃO DO ARTIGO 1 (NORMAS DA REVISTA CIÊNCIA RURAL)

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

Empresas credenciadas:

- American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
- GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
- Paulo Boschov (paulo@bridgetextos.com.br, bridge.textecn@gmail.com)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

O trabalho após tradução e o respectivo certificado devem ser enviados para: rudiweiblen@gmail.com

As despesas de tradução serão por conta dos autores. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem.**

Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuírem páginas além do estipulado terão um custo adicional para a publicação (vide taxa).

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências.

Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou

figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse link é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias

ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse link o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

11.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.
TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

11.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

11.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Wiley, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

11.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural** , Santa Maria

(Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Available from: <h_p://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_ar_ext&pid=S0103-847820080008000002&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-847820080008000002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <h_p://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_ar_ext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

11.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991-Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e po de apresentação na qual foi emitida a informação.

11.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic.

Proceedings... Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from:

<<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed:

Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from:

<<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen.

Maturitas, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise compara□va entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

12. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

13. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decorso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.

20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

21. Contribuição dos autores

Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

Exemplo um

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os

experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo dois

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo três

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito

22. O **ORCID** (Open Research and Contributors Identification) permite a criação de identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a identificação nacional e internacional do pesquisador e sua produção.

Dessa forma **recomendamos** que todos os autores de cada submissão adotem o registro **ORCID** em suas publicações.