

ANA PAULA OLIVEIRA MACHADO

**NOVAS TECNOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE PÃES
ISENTOS DE GLÚTEN À BASE DE FARINHA DE ARROZ E
CONCENTRADO PROTEICO DE ORIZENINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M149n
2016 Machado, Ana Paula Oliveira, 1986-
Novas tecnologias para obtenção de pães isentos de glúten
à base de farinha de arroz e concentrado proteico de orizenina /
Ana Paula Oliveira Machado. – Viçosa, MG, 2016.
xx,129f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mônica Ribeiro Pirozi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.118-129.

1. Farinha de arroz. 2. Glutelinas. 3. Alimentos sem glúten.
4. Transglutaminase. 5. Temperatura. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.726

ANA PAULA OLIVEIRA MACHADO

**NOVAS TECNOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE PÃES
ISENTOS DE GLÚTEN À BASE DE FARINHA DE ARROZ E
CONCENTRADO PROTEICO DE ORIZENINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de junho de 2016.

Antonio Manoel Maradini Filho

Frederico A. R. de Barros

Edimar A. F. Fontes
(Coorientadora)

Eduardo Basílio de Oliveira
(Coorientador)

Mônica Ribeiro Pirozi
(Orientadora)

Aos meus pais.

Dedico.

*Com o fim da incerteza chega
também a incerteza do fim.*

Viktor Emil Frankl

AGRADECIMENTOS

Agradeço àqueles que durante esse período contribuíram de alguma forma com esse trabalho:

À Deus por sua imensa misericórdia e por todas as graças que recebi durante toda minha vida e me formaram para viver momentos como esse;

À minha família, especialmente ao meu pai Milton, minha mãe Dilma, meus irmãos Adriana e Anderson e meu sobrinho Victor por todo apoio durante todos esses anos, e quando estudar aqui era só um sonho;

À minha orientadora, Prof^a Mônica Ribeiro Pirozi, por ter me acolhido em sua equipe, pela orientação, cuidado e pela amizade;

Aos professores coorientadores Edimar Fontes e Eduardo Basílio de Oliveira pela disponibilidade e por contribuírem com o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores membros da banca examinadora, Antônio Manoel Maradini Filho e Frederico Augusto Ribeiro de Barros pelas contribuições;

À Urbano Agroindustrial Ltda. pela doação da amostra de farinha de arroz e a Ajinomoto pela doação da amostra de enzima transglutaminase;

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos do DTA/UFV, em especial à Janaína, Isabelle e ao Prof. Luis Minim, pela colaboração nas análises reométricas;

Aos colegas do Laboratório de Embalagens, em especial ao Cícero pela colaboração nas análises calorimétricas;

Aos meus amigos que estiveram sempre presentes, que ouviram e sentiram todas as minhas angústias e alegrias. Obrigada pela companhia e apoio;

Aos amigos do LAFA pelas contribuições e pela ótima convivência, em especial a Roberta e todos os estagiários que trabalharam comigo nestes últimos anos;

Aos funcionários do DTA/UFV, por sua contribuição direta e indireta na realização deste trabalho, em especial a Juliana e ao saudoso Divino;

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

BIOGRAFIA

Ana Paula Oliveira MACHADO, filha de Milton Oliveira MACHADO e Dilma Pio MACHADO, nasceu em Coronel Fabriciano, Minas Gerais em oito de agosto de 1986. Engenheira de Alimentos formou-se em janeiro de 2010, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais. Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos em 2012 pela mesma instituição e ingressou no doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no mesmo ano.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Glúten	4
3.2. Doença celíaca e outros transtornos relacionados ao glúten	7
3.3. Tecnologia de produção de pães sem glúten	12
3.4. Farinha e proteínas do arroz.....	20
3.5. Propriedades técnico-funcionais de proteínas alimentares.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Materiais	36
4.2. Caracterização da farinha de arroz.....	37
4.3. Extração das proteínas da farinha de arroz	38
4.3.1. Delineamento experimental.....	38
4.3.2. Protocolo Extração Sequencial (ES)	38
4.3.3. Protocolo Precipitação por TCA (PA).....	40

4.3.4.	Protocolo Rápido Alcalino (RA).....	41
4.4.	Caracterização dos concentrados proteicos de arroz.....	43
4.4.1.	Perfil de massas molares - SDS-PAGE	43
4.4.2.	Solubilidade.....	43
4.4.3.	Propriedades interfaciais.....	44
4.4.4.	Propriedades emulsificantes	45
4.4.5.	Propriedades espumantes	47
4.5.	Elaboração e avaliação de pães isentos de glúten formulados com farinha de arroz	48
4.5.1.	Delineamento experimental.....	48
4.5.2.	Elaboração das massas	50
4.5.3.	Caracterização das massas	51
4.5.4.	Caracterização dos pães.....	52
4.6.	Análises estatísticas	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	Caracterização da farinha de arroz.....	55
5.1.1.	Composição centesimal	55
5.1.2.	Distribuição de tamanho das partículas	56
5.1.3.	Conclusão parcial.....	58
5.2.	Caracterização das proteínas da farinha de arroz	59
5.2.1.	Rendimento de extração	59
5.2.2.	Perfil de massas molares – SDS-PAGE.....	60
5.2.3.	Solubilidade.....	62

5.2.4.	Propriedades Interfaciais.....	64
5.2.5.	Propriedades emulsificantes	68
5.2.6.	Propriedades espumantes	77
5.2.7.	Conclusão parcial.....	79
5.3.	Caracterização de massas sem glúten formuladas com farinha de arroz	81
5.3.1.	Propriedades de textura (TPA).....	81
5.3.2.	Propriedades reológicas.....	90
5.3.3.	Propriedades térmicas	97
5.3.4.	Conclusão parcial.....	103
5.4.	Caracterização de pães sem glúten formulados com farinha de arroz	104
5.4.1.	Volume específico e perda de massa	104
5.4.2.	Propriedades de textura	109
5.4.3.	Análise por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)	111
5.4.4.	Conclusão parcial.....	115
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	117
7.	REFERÊNCIAS	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cadeias longas de glutenina com ligações dissulfídricas (SS) intermoleculares e ligações não covalentes de hidrogênio e interações de hidrogênio. Fonte: Adaptado de LÉTANG; PIAU; VERDIER (1999).....	5
Figura 2 - Classificação dos transtornos relacionados ao glúten. AIE: anafilaxia induzida por exercício físico. Adaptado de FASANO et al. (2015).....	7
Figura 3 – Mapa dos motivos da α -gliadina. Em amarelo, o epítopo responsável pela resposta imunológica. Em vermelho, região com atividade apoptótica. Em azul, região com atividade de permeabilização do intestino. Em verde, a região que regula a liberação do mediador de resposta imune. Adaptado de SAPONE et al. (2012).....	9
Figura 4 - Imagem do tecido duodenal mostrando o perfil típico de uma mucosa lesionada do doente celíaco. Perda das vilosidades e hiperplasia das criptas. Adaptado de MURRAY (1999).	10
Figura 5- Perfil de massa molar das proteínas de arroz determinadas por eletroforese SDS-PAGE. Da esquerda para a direita: 1, padrão (7 a 200 kDa); 2, proteínas de arroz obtidas por extração alcalina; 3, proteína de arroz obtida por extração salina; 4, proteína de arroz obtida por extração enzimática do amido (α -amilase termoestável); 5, proteína de arroz obtida por extração enzimática do amido (α -amilase). Fonte:PARAMAN et al., 2006.....	25
Figura 6 - Fluxograma de extração da orizenina pelo protocolo Extração Sequencial	39
Figura 7 - Fluxograma de extração da orizenina pelo protocolo Precipitação por TCA	41

Figura 8- Fluxograma de extração da orizenina pelo protocolo Rápido Alcalino.	42
Figura 9 - Fluxograma de processamento das massas de pão sem glúten.	50
Figura 10 - Distribuição do tamanho de partículas da farinha de arroz.....	56
Figura 11 - Perfis de eletroforese da farinha de arroz (1), CES (2), CPA (3) e CRA (4). À direita encontra-se o padrão de massa molar (5).	61
Figura 12 – Variação da solubilidade em função do pH dos concentrados proteicos de orizenina CPA (●) e CRA (■).	63
Figura 13 - Tensão interfacial (mN/m) em pH 2; 4,8 e 9 dos concentrados proteicos. Representados por ● controle; ○CPA; ▼CPA_S; Δ CRA; ■CRA_S.	65
Figura 14- Efeito do pH e da sonicação no índice de cremeação (IC) das emulsões estabilizadas por CRA (Δ); CPA (▼); CRA_S (○); CPA_S (●). Os gráficos menores destacam o IC (%v/v) nos primeiros 30 minutos.	69
Figura 15 - Imagens das emulsões O/A estabilizadas com concentrado proteico de orizenina obtido pelo protocolo Precipitação por TCA e Rápido alcalino (CPA e CRA) e sonicados (CPA_S e CRA_S) em pH 2, 4,8 e 9 imediatamente após preparo (0') e após 30 minutos (30').	70
Figura 16 - Micrografias das emulsões O/A com concentrado proteico de orizenina e 10 % (m/m) de óleo de girassol. Barra de escala = 10 μm.....	75
Figura 17 - Aspecto das espumas formadas pelo CPA (A) e CPA_S (B) em pH 2.....	78
Figura 18 - Gráfico de contorno e de superfície de resposta do efeito de ETG (U/g de proteína) e CPO (g/100 g de farinha) na dureza (g) das massas de pão a base de farinha de arroz.	82

Figura 19 – Variação da adesividade em função da temperatura de mistura (TMP) da massa de pão a base de farinha de arroz.	84
Figura 20 – Variação da elasticidade em função da temperatura de mistura (TMP) da massa de pão a base de farinha de arroz.	85
Figura 21 - Gráfico de contorno e superfície de resposta do efeito de ETG (U/g de proteína na farinha de arroz) e CPO (g/100 g de farinha) na coesividade das massas de farinha de arroz.	89
Figura 22 - Perfil reológico de massa para pão a base de farinha de arroz sem adição de concentrado proteico e enzima transglutaminase misturada a 28 °C.	91
Figura 23- Gráfico de contorno da superfície de resposta do módulo G' a 1 Hz das formulações de massas de pão a base de farinha de arroz em função de CPO e ETG.	92
Figura 24 – Variação de G" a 1 Hz de massa de farinha de arroz em função de CPO (g/100g de farinha de arroz).	94
Figura 25 – Gráfico do contorno da superfície de resposta para tan δ (1 Hz) em função de ETG (U/g de proteína da farinha de arroz) e CPO (g/100g de farinha de arroz).	96
Figura 26- Gráfico de contorno da superfície de resposta para temperatura inicial de gelatinização (T _o) das massas de farinha de arroz em função de TMP e do teor de ETG.	98
Figura 27- Gráfico de contorno da superfície de resposta para ΔT (°C) em função de ETG (U/g de proteína na farinha de arroz) e TMP (°C).	101
Figura 28- Gráfico de contorno da superfície de resposta para ΔH (J/g) em função de ETG (U/g de proteína da farinha de arroz) e TMP (°C).	102

Figura 29- Gráfico de contorno e de superfície do efeito de ETG (U/g de proteína) e TMP (°C) no volume específico dos pães a base de farinha de arroz.....	107
Figura 30- Variação da perda de massa em função da adição de concentrado proteico de orizenina.....	108
Figura 31-Gráfico de contorno e superfície de resposta para firmeza de miolo após 24h do processamento dos pães a base de farinha de arroz.....	110
Figura 32 - Micrografia confocal a laser de varredura de pão a base de farinha de arroz. A seta indica células de ar e no círculo a estrutura proteica semelhante a uma colmeia.	111
Figura 33 - Imagens digitais e micrografias obtidas através de microscopia de varredura a laser (MCVL) do miolo dos tratamentos de pães sem glúten a base de farinha de arroz. Barra de escala = 200 µm.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Pesquisas que abordam qualidade de formulações de pães sem glúten em 2016	13
Tabela 2- Frações proteicas (g/ 100 g de proteína) em endosperma e farelo de arroz.....	22
Tabela 3 - Composição aminoacídica das proteínas extraídas do endosperma e do farelo de arroz.....	23
Tabela 4 - Estudos com proteínas de farinha de arroz, seus objetivos, análises, resultados gerais e conclusões impactantes.....	27
Tabela 5 - Reagentes utilizados neste experimento com suas respectivas marcas e grau analítico.....	36
Tabela 6 - Delineamento composto central do experimento de panificação	48

Tabela 7 – Combinações dos níveis de temperatura de mistura (°C), concentrado proteico de orizenina (g/100g farinha de arroz) e transglutaminase (U/g de proteína na farinha de arroz).....	49
Tabela 8 - Formulação controle de pães a base de farinha de arroz.....	50
Tabela 9 - Composição centesimal da farinha de arroz.....	55
Tabela 10 - Capacidade de retenção de água (CRA) das amostras de farinha de arroz retidas nas peneiras de abertura de malha (µm).	57
Tabela 11 - Rendimento de extração e teor de proteína total dos materiais proteicos obtidos por cada protocolo de extração.....	59
Tabela 12 – Massa molar (kDa) das subunidades proteicas dos concentrados proteicos caracterizados por SDS-PAGE.	60
Tabela 13 - Constantes da equação ($\gamma = \gamma_{eq} + \kappa_1 \cdot \exp - \kappa_2 t$ que descreve a cinética da queda da tensão interfacial em função do pH (2;4,8 e 9) e uso da sonicação nos concentrados proteicos de orizenina (CPA_S e CRA_S).....	66
Tabela 14 – Índice de cremeação no equilíbrio (IC_{eq} (%)), taxa de cremeação (κ (min^{-1})), coeficiente de determinação (R^2) da equação ajustada da cinética de cremeação ($IC = IC_{eq}(1 - e(-\kappa t))$) e o erro percentual absoluto médio MAPE (%).	71
Tabela 15 - Médias da constante κ (min^{-1}) das emulsões no pH 2, 4,8 e 9 .	72
Tabela 16 - Médias do IC_{eq} das emulsões estabilizadas por CPA e CRA em pH 2, 4,8 e 9.	72
Tabela 17 - Tamanho médio de gotas (d_{32}) em µm das emulsões estabilizadas com concentrado proteico de orizenina (CPA e CRA) sonicados ou não em diferentes valores de pH.	76

Tabela 18 - Densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), fração volumétrica de ar (ϕ) e expansão da espuma (%) das espumas formadas com CPA em pH 2.....	79
Tabela 19- Equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2) das propriedades obtidas por meio do teste TPA das massas não fermentadas.	81
Tabela 20- Valores das variáveis de textura obtidos por meio de teste TPA para as massas de pão a base de farinha de arroz.	87
Tabela 21 - Equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2) da tangente δ , G' e do G'' a 1 Hz.	90
Tabela 22- Valores de G' , G'' e $\tan \delta$ a 1 Hz para massas sem glúten a base de farinha de arroz.....	95
Tabela 23 - Equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2) para as variáveis T_0 ($^{\circ}\text{C}$), T_p ($^{\circ}\text{C}$) ΔT ($^{\circ}\text{C}$) e ΔH (J/g) nas massas de pão fermentadas.....	97
Tabela 24 – Valores de temperatura inicial (T_0), temperatura de pico (T_p) , variação da temperatura de gelatinização (ΔT), entalpia de gelatinização (ΔH) para massas sem glúten a base de farinha de arroz.	99
Tabela 25- Valores para volume específico, perda de massa e firmeza de miolo depois do assamento (0h, 24h e 48h), para pães a base de farinha de arroz.....	105
Tabela 26- Equações dos modelos de regressão e coeficientes de determinação para as variáveis volume específico e perda de massa.	106
Tabela 27- Equações dos modelos de regressão e coeficientes de determinação para firmeza de miolo no dia do processamento (0h) e após 24 h e 48 h de armazenamento.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CES	Concentrado proteico obtido pelo protocolo Extração Sequencial
CPA	Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA
CPO	Concentrado Proteico de Orizenina
CRA	Capacidade de Retenção de Água Concentrado proteico de orizenina obtido pelo protocolo Rápido Alcalino
d_{32}	Tamanho médio de gotas
DC	Doença celíaca
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
ETG	Enzima transglutaminase
ϵ	Deformação normal
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
HMW	Alta massa molar
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
Hz	Hertz
IgA	Imunoglobulina A

IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
LMW	Baixa massa molar
MCVL	Microscopia confocal de varredura
ϕ	Fração volumétrica de ar
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TMP	Temperatura de mistura
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação
γ	Tensão superficial
γ_0	Amplitude de deformação
γ_{eq}	Tensão interfacial de equilíbrio
δ	Ângulo de fase
ζ	Potencial zeta
η^*	Viscosidade complexa
ρ_l	Densidade do líquido
σ	Tensão normal
τ	Tensão de cisalhamento
ω	Frequência de oscilação

RESUMO

MACHADO, Ana Paula Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2016. **Novas tecnologias para obtenção de pães isentos de glúten à base de farinha de arroz e concentrado proteico de orizenina.** Orientadora: Mônica Ribeiro Pirozi. Coorientadores: Edimar Aparecida Fontes Filomeno e Eduardo Basílio de Oliveira.

Pães isentos de glúten são uma alternativa para indivíduos que sofrem com algum transtorno relacionado ao consumo de glúten, mas que geralmente têm qualidade inferior aos similares produzidos com farinha de trigo. Estratégias para desenvolver massas isentas de glúten com melhor qualidade envolvem uso de farinhas mistas, aditivos e tecnologias de processamento. A temperatura de mistura (TMP) da massa e o concentrado proteico de orizenina (CPO) têm potencial para produzir massa com textura adequada e pães de qualidade sem a presença de glúten. Os objetivos deste trabalho foram extrair, caracterizar e avaliar o efeito de CPO, enzima transglutaminase (ETG) e TMP nas propriedades da massa e dos pães elaborados. O concentrado proteico de orizenina obtido pelo protocolo de extração sequencial (CES), embora com bom rendimento de extração, obteve menor teor de proteína total entre os três protocolos de extração e por este motivo foi excluído da caracterização técnico-funcional. Todas as classes proteicas da farinha de arroz estão presentes nos concentrados e a orizenina é a predominante. A solubilidade dos concentrados é baixa e influenciada pelo pH do meio. As propriedades espumantes e emulsificantes dos concentrados foram afetadas pela sonicação, protocolo de extração e pH do meio ao nível de 10 % de significância. Embora as emulsões e as espumas sejam muito instáveis, mostrou possuir em pH 2 e pH 9 menor instabilidade. Os fatores CPO, TMP e ETG modificaram características das massas e dos pães. As propriedades reológicas das massas são semelhantes às de outras sem glúten e ainda assim longe das características das massas de farinha de trigo. A TMP e ETG tiveram influência sobre as propriedades térmicas da massa. Os fatores ETG e CPO influenciaram volume específico e firmeza de miolo dos pães. Os modelos de regressão ajustados explicam pouco da variação entre os fatores testados e não podem ser usados para fazer predições, mas os fatores significativos destes modelos indicaram influência das respostas

testadas. TMP acima da temperatura ambiente e a adição de CPO e ETG tem potencial para produção de massa isenta de glúten que pode ser manipulada em equipamentos convencionais de panificação e pães de qualidade semelhante àqueles disponíveis no mercado, mas com um número menor de aditivos.

ABSTRACT

MACHADO, Ana Paula Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2016. **New technologies for development of gluten free rice flour bread and oryzenin concentrate.** Advisor: Mônica Ribeiro Pirozi. Co-advisers: Edimar Aparecida Filomeno Fontes and Eduardo Basílio de Oliveira.

Gluten free breads are an alternative for individuals who experience distress related to gluten consumption, however it has inferior baking quality than a similar wheat bread. Development strategies of gluten free dough with improved baking quality requires the use of composite flour, additives and processing technologies. Dough mixing temperature (TMP) and oryzenin concentrate (CPO) have potential to produce adequate dough's texture and high quality gluten free bread. The objectives of this study were extract, characterize and evaluate the effect of CPO, transglutaminase enzyme (ETG) and TMP on dough and bread properties. Oryzenin concentrate obtained by sequential extraction protocol (CES) has a good extraction yield. It achieved the lowest protein content among three extraction protocols, though, and for this reason, it was excluded of technical and functional characterization. All protein classes from rice flour were present in protein concentrate and the oryzenin is prevailing. Concentrates have low solubility and is influenced by medium pH. Foaming and emulsifying properties of concentrates were affected by sonication, extraction protocol and medium pH with 10 % significance level. Even though emulsions and foams were unstable, presented the lowest instability at pH 2 and pH 9. CPO, TMP and ETG factors changed the characteristics of the dough and the bread. Dough rheological properties are similar to different gluten free doughs and even so far from wheat dough characteristics. The TMP had influence on dough thermic properties. ETG and CPO factors had influence on specific volume and crumb firmness. Adjusted regression models explained a small fraction of variation so they could not be used for predictions, but significant factors influenced tested responses. Dough mixing temperature above room temperature and the addition of transglutaminase enzyme and oryzenin concentrate have potential to develop gluten free dough that can be manipulated in conventional baking

equipment and good quality bread similar to the ones available in the market, but with less additives.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento do mercado de panificação sem glúten tem sido alavancado por dietas especiais destinadas a indivíduos com sensibilidade ao glúten, doença celíaca e alergia ao trigo. O glúten é definido como uma rede proteica formada por ligações dissulfídicas envolvendo proteínas de duas classes, prolamina e glutelina, presente em cereais como trigo, cevada e centeio. Tem papel muito importante no volume e estrutura do miolo de pães, principalmente devido a viscoelasticidade que as massas com glúten possuem.

Para substituir o glúten a indústria tem utilizado várias estratégias que incluem o uso de misturas de farinhas e amidos sem glúten e ingredientes como proteínas de leite e soja, hidrocolóides, enzimas e emulsificantes. Ainda assim, as massas não são coesas, são de difícil manipulação e os pães apresentam problemas de sabor e textura (miolo seco e quebradiço), preços altos e em alguns casos menor qualidade nutricional.

A farinha de arroz é o principal substituto para farinha de trigo em produtos de panificação sem glúten, mas as diferenças estruturais das proteínas do arroz, comparada às do trigo interferem na formação de uma massa viscoelástica.

As proteínas extraídas do arroz têm propriedades tecnológicas inferiores às de outras fontes vegetais, como a soja, embora modificações em sua estrutura tenham sido alvo de estudos que visam torná-las mais solúveis em diferentes condições e conseqüentemente mais funcionais. A glutelina do arroz, conhecida como orizenina, é a fração proteica mais abundante no endosperma do arroz com potencial para desenvolver massas viscoelásticas.

A enzima transglutaminase de origem microbiana é um aditivo que tem sido testado em formulações com farinha de arroz e enriquecimento com proteínas de diferentes fontes, como soro de leite, ovo, ervilha e soja, para melhorar a qualidade global dos pães sem glúten. A sua capacidade de catalisar reações de intercruzamento nas proteínas tem resultado em aumento de volume específico e diminuição da firmeza de miolo.

A variação de temperatura na mistura, explorada em massas de farinha de milho, modifica propriedades de mistura de massas de farinha de arroz aproximando-as de massas de farinha de trigo. Contudo, diferentemente das estratégias citadas acima ainda não foi explorada em relação a qualidade de pães sem glúten a base de farinha de arroz.

A orizenina e a temperatura de mistura tem potencial para produção de massas de farinha de arroz, com características mais próximas das massas com glúten, com melhor maquinabilidade, coesividade e capazes de produzir pães com maior volume específico e miolo mais macio. O objetivo deste trabalho é utilizar estas tecnologias para obter massas e pães a base de farinha de arroz e concentrado proteico de orizenina de melhor qualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes estratégias para formulação de pães isentos de glúten a base de farinha de arroz.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o rendimento em proteína de concentrados proteicos de orizenina obtidos por diferentes protocolos de extração;
- Avaliar propriedades técnico-funcionais do concentrado proteico de orizenina em sistemas modelo;
- Caracterizar as massas de pão a base de farinha de arroz quanto as propriedades reológicas, de textura e térmicas;
- Avaliar o efeito da temperatura de mistura, concentrado proteico de orizenina e enzima transglutaminase no volume, firmeza de miolo e microestrutura de miolo de pães sem glúten a base de farinha de arroz.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Glúten

No trigo, centeio e cevada duas classes de proteínas, prolamina e glutelina, podem formar uma rede complexa e heterogênea quando misturadas e hidratadas. Esta rede conhecida como glúten é responsável pela habilidade única da farinha de trigo de fazer pão de boa qualidade (KENT; EVERS, 1994; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008; PYLER; GORTON, 2009).

O entrelaçamento é um dos modelos propostos para se entender a estrutura do glúten, ele sugere que o glúten pode ser descrito como uma rede polimérica entrelaçada. Nesta rede, agregados covalentes se juntam através de nós físicos resultando em extensa polimerização (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008; MACRITCHIE, 2010). Nas etapas iniciais de mistura, a proteína do glúten existe como um aglomerado discreto com grânulos de amidos dispersos. A medida que a mistura prossegue, a distribuição de grânulos de amido se mantém constante, mas os aglomerados de proteínas se tornam mais coerentes e estendidos, formando uma rede contínua. Essa rede é que permite a massa suas propriedades viscoelásticas, o amido exerce uma influência agindo como um enchimento. O trigo é único entre os cereais, porque a viscoelasticidade de sua massa permite a formação de bolhas de ar estáveis que são essenciais para expansão da massa (MACRITCHIE, 2016).

A prolamina e glutenina recebem nomes diferentes dependendo do cereal. No trigo, as prolaminas são as gliadinas e as glutelinas são conhecidas como gluteninas (WIESER, 2008). As gliadinas são subdivididas em α -gliadinas, β -gliadinas, γ -gliadinas e ω -gliadinas, e sua massa molar varia entre

30 kDa e 125 kDa. As ligações dissulfídicas dessa fração são basicamente intramoleculares e apesar de não formarem ligações covalentes umas com as outras e nem com outros polipeptídios se associam fortemente com as gluteninas. Em massas de pão são responsáveis pela extensibilidade (PYLER, 1988; MACRITCHIE e LAFIANDRA, 1997; ATWELL, 2001).

As gluteninas são divididas em alta e baixa massa molar (LMW), sendo que as gluteninas de baixa massa molar diferem das gliadinas pela sua composição de aminoácidos e solubilidade. A alta massa molar (80 kDa - 120 kDa) fornece resíduos de cisteína suficientes para permitir a formação de redes de glutenina ligadas por ligações dissulfídicas através de interações com outros polipeptídios e entre gluteninas, aumentando assim a força, estabilidade e extensibilidade (Figura 1) (GUERRIERI, 2004; PYLER; GORTON, 2009).

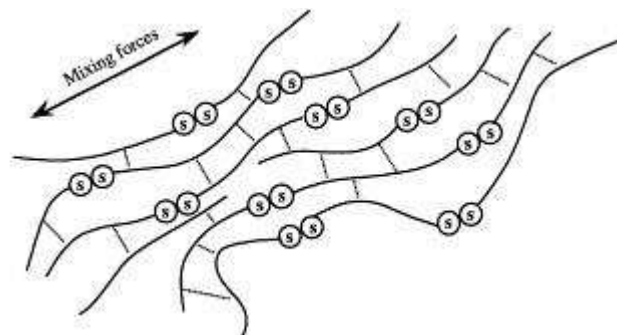


Figura 1 – Cadeias longas de glutenina com ligações dissulfídicas (SS) intermoleculares e ligações não covalentes de hidrogênio e interações de hidrogênio. Fonte: Adaptado de LÉTANG; PIAU; VERDIER (1999).

A extensibilidade que permite a massa inflar e elasticidade suficiente para resistir ao colapso, são características importantes que permitem a estabilidade das bolhas de ar e expansão da massa.

Para formação de bolhas de ar é necessária a presença de uma fase líquida na massa. Essa fase líquida engloba cerca de 20 % da massa. Em uma massa desenvolvida, há um filme delgado ou lamela que envolve as bolhas de gás permitindo os componentes da superfície ativa da farinha (maioria proteínas e lipídeos) adsorver na interface gás/líquido e estabilizá-la (MACRITCHIE, 1976).

A composição aminoacídica do glúten de trigo é única e mais de 40 % dos resíduos são de glutamina e prolina (ATWELL, 2001). A baixa solubilidade em água é atribuída ao seu baixo conteúdo de resíduos de lisina, arginina, ácido glutâmico e aspártico, que juntos somam menos de 10% do total. Cerca de 30 % são hidrofóbicos e contribuem com a habilidade do glúten de formar agregados proteicos por meio de interações hidrofóbicas e para ligar lipídeos e outras substâncias não polares. A ligação com água é promovida pela glutamina e hidroxilas. Além disso, com as ligações de hidrogênio entre resíduos de glutamina e hidroxila a coesividade é favorecida. Cisteína e resíduos de cistina são aproximadamente 2-3 mol % do total dos aminoácidos do glúten (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Os pães que não contêm glúten, sendo este o responsável pela maioria das características de qualidade, sofrem alguns prejuízos que devem ser compensados com processos e ingredientes que imitem a estrutura formada pelas proteínas. O glúten pode ser utilizado como ingrediente e há interesse comercial principalmente no glúten do trigo devido as suas características funcionais. O glúten vital, como é chamado, é usado para fortificar farinhas que são impróprias para panificação e na produção de pães integrais (GUERRIERI, 2004).

3.2. Doença celíaca e outros transtornos relacionados ao glúten

O consumo de alimentos que contém glúten e farinha de trigo pode gerar um amplo espectro de transtornos como a doença celíaca (DC) e alergia ao trigo (Figura 2).

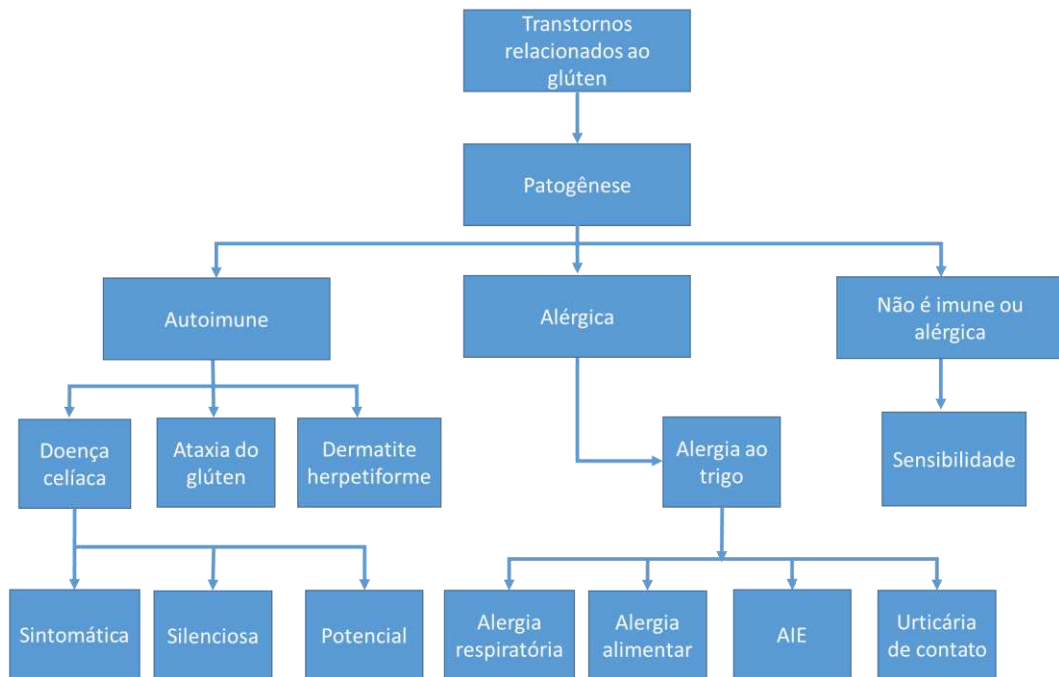


Figura 2 - Classificação dos transtornos relacionados ao glúten. AIE: anafilaxia induzida por exercício físico. Adaptado de FASANO et al. (2015).

A DC é uma enteropatia crônica e autoimune em indivíduos geneticamente predispostos que afeta o intestino, mas o efeito pode se estender para o sistema nervoso central, cérebro, fígado, pâncreas, tireoide, ossos, pele e sistema reprodutor. A doença é desencadeada pela ingestão de alimentos que contém glúten e embora os sintomas sejam conhecidos há mais de um século, apenas nos anos 40 que o pediatra holandês Dicke estabeleceu essa conexão entre o consumo de glúten e a doença (LUDVIGSSON et al., 2013).

A disponibilidade e divulgação de marcadores sorológicos sensíveis e específicos tem resultado no aumento da prevalência de DC, mas

diminuíram os erros de diagnóstico e atualmente a incidência é de 3 a 13 casos por 1000 indivíduos (GUANDALINI; ASSIRI, 2014; LEBWOHL; LUDVIGSSON; GREEN, 2015).

A patogênese da DC envolve uma complexa interação entre ambiente, fatores imunológicos e genética. A maioria dos pacientes tem um gene heterodímero HLA-DQ2 codificado pelos alelos DQA1*05 e DQB1*02, cerca de 5 - 10 % dos pacientes tem um heterodímero HLA-DQ8 codificado pelos alelos DQA1*03, DQB1*0302, HLA-DQA1*05 ou HLA-DQB1*02. A contribuição desses genes heterodímeros é de 40 % para o risco de desenvolver DC. Os indivíduos que não desenvolvem a doença, mas possuem estes genes tem a chamada DC potencial (SAPONE et al., 2012; BAI et al., 2013; LUDVIGSSON et al., 2013; GUANDALINI; ASSIRI, 2014; LEBWOHL; LUDVIGSSON; GREEN, 2015). Estes genes são expressos na superfície de antígenos presentes nas células do intestino e são responsáveis por uma resposta imune específica à gliadina. As células T com resposta específica para gliadina são estimuladas pelo epítipo em amarelo (Figura 3), ele é resistente a degradação enzimática gástrica, pancreática e peptidases (SAPONE et al., 2012; GUANDALINI; ASSIRI, 2014).

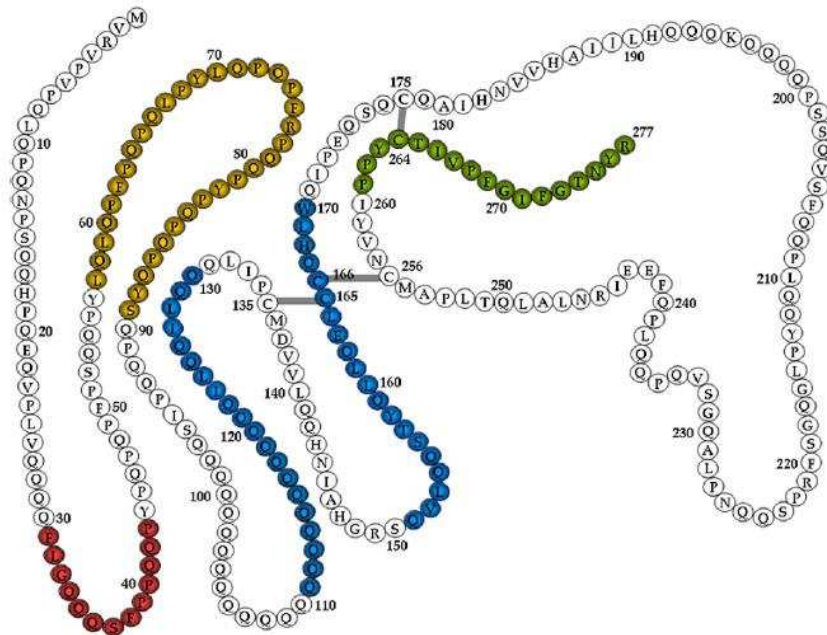


Figura 3 – Mapa dos motivos da α-gliadina. Em amarelo, o epítipo responsável pela resposta imunológica. Em vermelho, região com atividade apoptótica. Em azul, região com atividade de permeabilização do intestino. Em verde, a região que regula a liberação do mediador de resposta imune. Adaptado de SAPONE et al. (2012).

Após um teste sorológico positivo para os antígenos relacionadas à DC, para confirmar um diagnóstico é necessária uma biópsia do duodeno enquanto o paciente está em uma dieta contendo glúten. As vilosidades de um indivíduo com DC são atrofiadas (Figura 4) e mesmo sem sintomas clínicos clássicos (diarreia, anemia, dor abdominal e perda de peso) o diagnóstico pode ser confirmado, sendo conhecida como DC silenciosa (MARTIN, 2010).

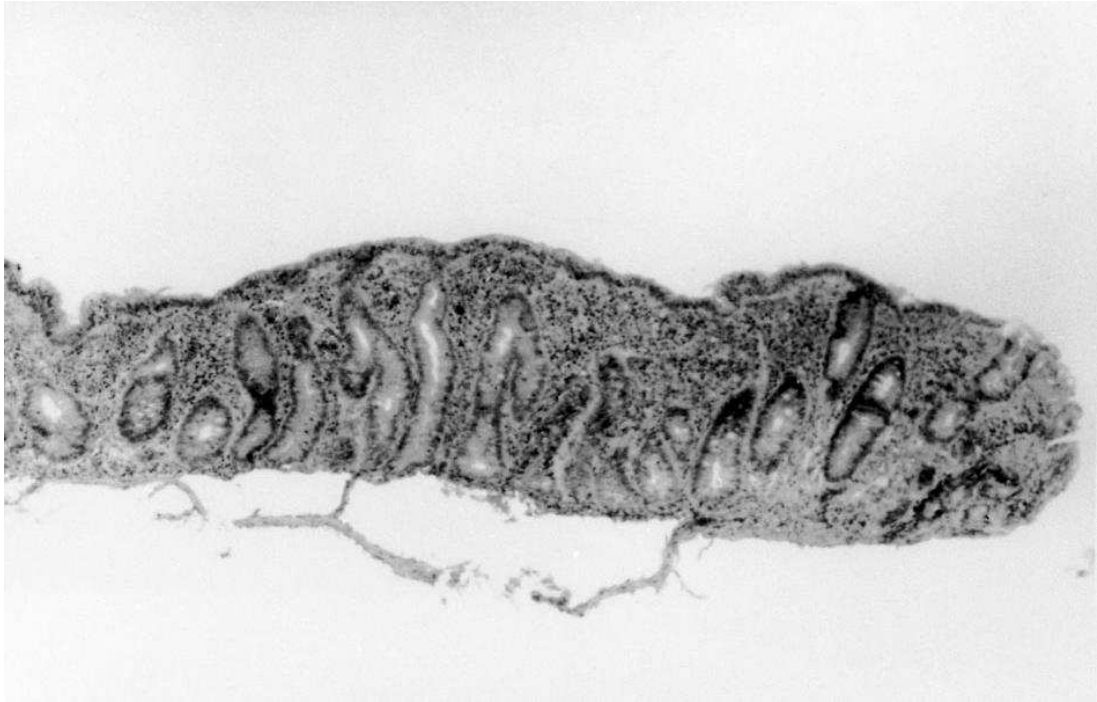


Figura 4 - Imagem do tecido duodenal mostrando o perfil típico de uma mucosa lesionada do doente celíaco. Perda das vilosidades e hiperplasia das criptas. Adaptado de MURRAY (1999).

O único tratamento adequado para DC é uma dieta restrita livre de glúten para o resto da vida. Não existem medicamentos que permitam um celíaco ingerir glúten de forma segura. A remoção completa do glúten da dieta resulta em remissão da maioria dos pacientes, mas isso pode levar anos. O monitoramento deve ser constante, pois traços do glúten podem induzir danos à mucosa do intestino (SAPONE et al., 2012; BAI et al., 2013).

A ataxia do glúten e a dermatite herpetiforme também são respostas autoimunes ao consumo de glúten. A ataxia do glúten é uma manifestação neurológica atribuída à DC e é caracterizada pela ataxia esporádica sem causa conhecida em associação com IgG e/ou IgA positivos com ou sem enteropatia na biópsia do duodeno (LUDVIGSSON et al., 2013).

A dermatite herpetiforme é uma manifestação cutânea mediada por reação imune no intestino delgado. Caracterizada pela presença de IgA em

depósitos na pele e também responde a uma dieta sem glúten. A prevalência nos Estados Unidos e Europa é perto de 11:100 000 indivíduos. A maioria dos pacientes com dermatite herpetiforme possui DC, mas a dermatite raramente é encontrada em paciente com DC (LUDVIGSSON et al., 2013; RAMPERTAB; MULLIN, 2014).

Existem outras desordens relacionadas ao consumo de glúten e trigo cujo o mecanismo não é o mesmo da DC. Essas desordens são conhecidas como alergia ao trigo (MARTIN, 2010; SAPONE et al., 2012; BAI et al., 2013; RAMPERTAB; MULLIN, 2014).

A alergia ao trigo é definida como uma reação imunológica adversa às proteínas do trigo. Dependendo da exposição ao alérgeno e dos mecanismos imunológicos, a alergia ao trigo é uma alergia alimentar clássica que afeta a pele, trato gastrointestinal ou trato respiratório. a imunoglobulina E (IgE) tem um papel central na patogênese dessa doença (SAPONE et al., 2012; RAMPERTAB; MULLIN, 2014).

Na alergia ao trigo, os anticorpos IgE sofrem ligações cruzadas por sequências em peptídeos do glúten, e proteínas que não são do glúten induzem a liberação de mediadores imunes como histaminas (FASANO et al., 2015). Pacientes com alergia ao trigo descrevem sintomas na pele, sistema respiratório e gastrointestinal (urticária de contato, asma do padeiro e AIE), que ocorrem minutos ou horas após ingestão do trigo. Em diferentes estudos, a prevalência da alergia ao trigo varia entre 0,5 % a 9 % da população e depende da faixa etária (SAPONE et al., 2012; RAMPERTAB; MULLIN, 2014).

A sensibilidade não celíaca ao glúten não tem origem alérgica ou autoimune, mas os indivíduos apresentam os sintomas clássicos da DC. A

sensibilidade ao glúten foi reportada por até 6 % da população, mas o diagnóstico é mais susceptível a erros pois é baseado na ocorrência de sintomas gastrointestinais com a ingestão de glúten e sorologia negativa para DC, ou seja, é um controverso diagnóstico de exclusão (SAPONE et al., 2012; RAMPERTAB; MULLIN, 2014). Nestes casos o único tratamento disponível também é uma dieta sem glúten.

3.3. Tecnologia de produção de pães sem glúten

As pesquisas a respeito de pães sem glúten se tornaram mais prolíficas a partir dos anos 2000, embora a doença celíaca tenha sido descrita pela primeira vez há mais de 100 anos e a indústria europeia especializada em alimentos para dietas especiais começou a desenvolver na década 80 formulações visando celíacos.

Combinar aditivos, submeter farinha à diferentes tratamentos, alterar processo de mistura, assamento e uso de massa azeda são as estratégias mais estudadas para produzir pães de melhor qualidade sensorial global. As formulações e os tipos de pães divergem bastante, principalmente quanto a farinha ou mistura de farinhas utilizadas, e poucos estudos são feitos apenas com uma fonte de farinha ou amido, dificultando comparação de resultados (MASURE; FIERENS; DELCOUR, 2015).

Na Tabela 1 estão resumidos alguns artigos internacionais publicados no último ano sobre a produção de pães sem glúten.

Tabela 1- Pesquisas que abordam qualidade de formulações de pães sem glúten em 2016

Aditivo/tecnologia	Análises	Principais Resultados	Referência
Farinha de castanha	Análises físico-químicas (composição centesimal, cor, textura, textura e estrutura do miolo) e nutricionais (capacidade antioxidante, digestão <i>in vitro</i>) durante o armazenamento.	Aumento da velocidade de envelhecimento e diminuição do volume dos pães. Aumento do teor de fibras solúveis e insolúveis a partir da adição de 20 g/ 100 g de farinha de castanha.	(PACIULLI et al., 2016)
Proteína hidrolisada de mexilhão de lábios verdes	Pães: textura, cor, volume, análise sensorial (ADQ).	Aumento da qualidade em termos de volume dos pães, textura e aparência do miolo. Os pães apresentaram sabor de mexilhão.	(VIJAYKRISHNARAJ; ROOPA; PRABHASANKAR, 2016)
Alta pressão	Propriedades reológicas da massa, propriedades de mistura e de fermentação, volume específico, atividade de água na crosta, perda de massa, porosidade e textura do miolo.	Farinha de arroz tratada com alta pressão diminuiu o envelhecimento dos pães.	(CAPPA et al., 2016)
Ovoalbumina e leite de soja	Volume da massa, volume específico dos pães e firmeza da crosta.	Adição de mais de 1,25 % de ovoalbumina a farinha de arroz preveniu o colapso da massa e mais de 2,5 % aumentou o volume específico.	(NOZAWA; ITO; ARAI, 2016)
Quinoa e trigo sarraceno	Propriedades reológicas, perda de massa, volume específico, atividade de água, textura de miolo, microscopia eletrônica de varredura dos pães, cor e análise sensorial.	Comportamento pseudoplástico das massas. A quantidade de farinha de quinoa não representou diferença na perda de massa, no volume específico e teor de proteína, 25 % de farinha de quinoa obteve os melhores resultados na análise sensorial e textura mais macia.	(TURKUT et al., 2016)

Farinhas de cereais e outras fontes sem glúten requerem o uso de ingredientes que desempenhem funções similares às que o glúten teria na massa e nos pães. A tecnologia de produção pode ainda considerar alteração do processo tradicional de panificação com o objetivo de melhorar a qualidade dos pães.

Uma alternativa é o uso de pseudocereais que apesar de semelhantes aos cereais são plantas dicotiledôneas que possuem alto teor proteico e perfil lipídico com gorduras insaturadas. Os mais consumidos para alimentação humana são o trigo sarraceno, a quinoa e o amaranto (ALVAREZ-JUBETE et al., 2009; HOUBEN; HÖCHSTÖTTER; BECKER, 2012; PELLEGRINI; AGOSTONI, 2015).

O trigo sarraceno é originário da Ásia Central e atingiu relevância justamente devido a demanda por produtos sem glúten. O teor de amido é cerca de 70 % dos carboidratos totais e a razão amilose e amilopectina é 1:1, visivelmente diferente dos cereais em que o teor de amilose é menor que o de amilopectina (SCHOENLECHNER; SIEBENHANDL; BERGHO, 2008).

As proteínas do trigo sarraceno são de alto valor biológico e a maioria são globulinas, representadas principalmente por uma fração proteica parecida com a legumina 13S. Aquelas que são semelhantes a vicilina 8S são a menor fração e juntas correspondem a 70 % da proteína total da semente. As globulinas parecem ser capazes, no trigo sarraceno, de formar algumas ligações não-covalentes (hidrogênio e hidrofóbicas), embora possam emular o efeito da estrutura do glúten são relativamente fracas devido a impedimento estérico (POMERANZ, 1991; PRUSKA-KĘDZIOR et al., 2008; SCHOENLECHNER; SIEBENHANDL; BERGHO, 2008).

A substituição da farinha de trigo por farinha de trigo sarraceno mostrou ser eficiente em produzir macarrão com menor perda de firmeza e menor perda de sólidos durante cozimento (SCHOENLECHNER et al., 2010a). Em pães sem glúten, mistura de farinha de arroz e trigo sarraceno pode dispensar a adição de hidrocolóides para estruturação da massa (TORBICA; HADNADEV; DAPČEVIĆ, 2010).

A quinoa e o amaranto são culturas da América Latina. O amaranto tem como principal componente o amido que está localizado no perisperma. O teor de amilose, entre 0,1 e 11 %, é muito menor que em cereais (SCHOENLECHNER; SIEBENHANDL; BERGHO, 2008). Isto se reflete a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, uma maior temperatura de gelatinização e viscosidade e maior capacidade de se ligar a água. Suas proteínas estão localizadas no gérmen e na casca, as prolaminas são a maior fração em quantidade e a composição aminoacídica inclui muitos aminoácidos essenciais como metionina, lisina, arginina, triptofano e aminoácidos com enxofre. Em pães sem glúten é utilizado como aditivo, aumentando a qualidade nutricional e o teor de proteínas (SCHOENLECHNER; SIEBENHANDL; BERGHO, 2008; ALVAREZ-JUBETE et al., 2009; RÓŻYŁO et al., 2015). Em 1987, pesquisadores na Inglaterra reportaram pela primeira vez o uso do amaranto como promessa para produzir pães sem glúten de boa qualidade nutricional e com sabor agradável (“Science Report: Wild weed may help millions of children”, 1987).

A quinoa tem como principal componente o amido, mas o teor é menor que nos cereais. Localizado no perisperma, embora pequenas quantidades estão presentes na casca e embrião. A temperatura de

gelatinização e viscosidade de pasta são maiores que nos cereais. A maioria das proteínas são globulinas e albuminas. As saponinas são um inconveniente, mas podem ser removidas depois de lavagem e descascamento (SCHOENLECHNER; SIEBENHANDL; BERGHO, 2008).

Massa de pão com farinha de quinoa é capaz de reter grande quantidade de gás por meio de mecanismo ainda desconhecido e pode resultar em uma estrutura de miolo homogênea. A principal hipótese é que os lipídeos polares ou peptídeos estabilizam as bolhas de ar devido a atividade de superfície ou que as propriedades viscoelásticas são otimizadas e contribuem na inclusão e estabilização de bolhas na massa (ELGETI et al., 2014).

Proteínas de diferentes origens podem ser adicionadas durante a preparação de massas sem glúten para incremento de qualidade. As proteínas utilizadas podem ser de origem animal (leite e ovo), de origem vegetal (soja), enzimas de origem microbiana e vegetal (GALLAGHER, 2009).

Proteínas do leite tem alto valor nutricional e são usadas geralmente por causa da sua estrutura química semelhante a uma das proteínas do glúten. Dependendo do tipo de proteína, mudanças específicas nos produtos podem ser alcançadas. Além dos benefícios funcionais, como aumento da capacidade de retenção de água que resulta no aumento do volume e melhor textura, sabor, cor da crosta e vida de prateleira (GALLAGHER; GORMLEY; ARENDT, 2003; STORCK et al., 2013), a adição das proteínas do leite e de aminoácidos essenciais como lisina, metionina e triptofano aumentam a qualidade nutricional dos produtos de panificação sem

glúten (MCCLEMENTS, 1999; GALLAGHER; GORMLEY; ARENDT, 2003; HOUBEN; HÖCHSTÖTTER; BECKER, 2012).

Apesar desses benefícios, existem algumas desvantagens e restrições no uso de proteínas do leite. Pessoas com inflamação no intestino devido a doença celíaca, de modo geral, não podem metabolizar a lactose uma vez que a enzima lactase, que normalmente é localizada na mucosa do intestino, é praticamente ausente devido a atrofia das vilosidades. Além disso, as proteínas do leite podem ser ativadoras de reações alérgicas (ZANNINI et al., 2012).

As proteínas do surimi, soja e ovo também podem ser usadas em produtos de panificação sem glúten. O surimi é capaz de melhorar a cor da crosta, diminuir a dureza do miolo e aumentar o volume dos pães. Embora tenha efeitos positivos, o consumidor pode não aceitar o sabor de peixe das proteínas nos pães (GALLAGHER, 2009; HOUBEN; HÖCHSTÖTTER; BECKER, 2012). As proteínas de ovo devido a sua atividade interfacial são consideradas para panificação como agente de espuma e como estabilizante da estrutura do miolo (MOORE et al., 2006; CROCKETT; IE; VODOVOTZ, 2011).

Proteínas de leguminosas demonstram forte capacidade de formação de gel e podem ser usadas na produção de emulsões e espumas. As proteínas de soja são divididas em dois grupos heterogêneos, globulina (90%) e albumina (10%). Os componentes poliméricos principais das frações de globulina, conhecidas como 7S e 11S, são formadas por 3 ou 6 subunidades, as quais são glicosiladas ou tem uma ligação dissulfídrica semelhantes à orizenina (KATSUBE et al., 1999). A funcionalidade e

estabilidade das proteínas da soja tem sido investigadas como melhoradores da textura do miolo (SHIN; GANG; SONG, 2010; CROCKETT; IE; VODOVOTZ, 2011; ZANNINI et al., 2012).

A zeína, proteína da classe das prolaminas do milho, também foi apontada como apropriada para a elaboração de produtos de panificação sem glúten. A zeína combinada com amido e água pode formar uma massa viscoelástica que semelhante às massas com glúten, desde que misturadas com temperaturas acima da temperatura ambiente (LAWTON, 1992).

As enzimas, de natureza proteica, também são adicionadas para melhorar as propriedades das massas e dos pães sem glúten. Dependendo da atividade enzimática, capacidade de retenção de água, vida de prateleira, retrogradação e maciez do miolo podem ser influenciadas positivamente. Algumas destas enzimas que são usadas em produtos de panificação são amilases, ciclodextrina glicosiltransferases e transglutaminase. Glicose oxidase (GO), lacase e proteases também são encontradas em formulações. Algumas dessas enzimas são essenciais para que os pães alcancem alta qualidade (HOUBEN; HÖCHSTÖTTER; BECKER, 2012).

Proteases induzem a liberação de proteínas de baixa massa molar dos complexos proteicos macromoleculares, o que resulta na diminuição da viscosidade de pasta e aumento na estabilidade de pasta. As massas demonstram menor resistência à deformação durante a fermentação e nas etapas anteriores ao assamento preservando a elasticidade (ZANNINI et al., 2012). A protease comercial de *Bacillus stearothermophilus* (termoase) adicionada em pães de farinha de arroz melhoram a aparência do miolo, a enzima hidrolisa albuminas e globulinas, levando a muitas estruturas celulares

no miolo, textura macia e baixa taxa de envelhecimento. (KAWAMURA-KONISHI et al., 2013)

Os hidrocolóides, como o amido, tem a função de se ligar a água e formar uma massa com estrutura permeável a gases de fermentação e com características viscoelásticas. O tipo e a origem dos hidrocolóides utilizados dependem do resultado esperado e diversos estudos comprovam que o aumento da capacidade de absorção de água leva a uma melhoria na qualidade sensorial dos pães (PONGJARUVAT et al., 2014).

A massa azeda é uma mistura de farinha, água, bactérias lácticas e leveduras. O uso de massa azeda é prática comum em massas com farinha de trigo com o objetivo de desenvolver aromas, melhorar textura, aumentar vida de prateleira e qualidade nutricional. A técnica tem sido testada em pães sem glúten com resultados positivos para a textura do miolo e volume (ZANNINI et al., 2012; WOLTER et al., 2014).

Além de mudar a formulação, pesquisas têm sido direcionadas para modificação do preparo da massa como é proposto neste trabalho com o uso de diferentes temperaturas na etapa de mistura. O trabalho de caracterização do concentrado proteico de orizenina foi desenvolvido com o propósito de aplicá-lo em formulações de pães sem glúten.

Partindo-se de uma teoria baseada no comportamento da zeína (LAWTON, 1992), análises das propriedades viscoelásticas indicaram que sob temperatura de 50 °C o concentrado proteico de orizenina exibe comportamento viscoelástico próximo ao da farinha de trigo a 28 °C, a temperatura adequada à viscoelasticidade das proteínas do glúten do trigo (MACHADO, 2012).

As propriedades de mistura de massa de farinha de arroz, em temperaturas entre 28 °C e 50 °C sofreram mudanças nas propriedades de mistura ligadas diretamente a panificação (MACHADO, 2012). Conduzindo o trabalho atual ao estudo da adição de concentrado proteico de orizenina na formulação de pães sem glúten a base de farinha de arroz e aumento da temperatura durante a mistura, podendo melhorar características de qualidade dos pães sem glúten.

A ação da enzima transglutaminase em pães, já conhecida e eficiente em melhorar características como volume específico e firmeza de miolo, permitindo no contexto deste trabalho avaliar se a relação entre concentrado proteico de orizenina, farinha de arroz e temperatura de mistura resultariam em mudanças positivas na qualidade dos pães elaborados.

O futuro é promissor e os resultados são positivos, mas ainda existem lacunas a serem preenchidas. A compreensão das mudanças que ocorrem nas massas e nos pães, nos aditivos e como interagem com os outros ingredientes é limitada sendo, portanto, necessário caracterizá-los. Deve haver preocupação maior quanto a maquinabilidade das massas, disponibilidade das matérias-primas e aditivos e principalmente o custo de produção destes pães.

3.4. Farinha e proteínas do arroz

O cultivo de arroz é uma das atividades econômicas mais importantes do mundo, sendo responsável pela ocupação da maior parte da área agrícola destinada a produção de alimentos (MCLEAN; HARDY; HETTEL, 2013). A principal forma de consumo é pelo cozimento do grão polido, mas o arroz possui diversos outros usos industriais, incluindo a

produção de farinha e a extração de proteínas e amido para aplicação em alimentos e cosméticos (HAMADA et al., 1998; FABIAN; JU, 2011; YADAV; YADAV; CHAUDHARY, 2011; STORCK et al., 2013; USTUNOL, 2014).

O grão de arroz contém em média 7 % de proteínas e, como o trigo, o clima e adubação podem ser responsáveis por uma grande variação no conteúdo, principalmente de orizenina (LUH, 2001; MARTIN; FITZGERALD, 2002). A composição química do grão muda após o beneficiamento. A remoção da casca, pericarpo e gérmen resulta em perda de certas proteínas, fibras, lipídeos, vitaminas e minerais (ROSELL e MARCO, 2008).

Apesar de seu baixo conteúdo proteico, comparado a outros grãos, o arroz é uma importante fonte de proteínas, devido à grande quantidade consumida no mundo. A quantidade de proteína de arroz disponível é considerável e tem sido reconhecida como hipoalergênica e nutritiva, justificando seu uso em alimentos (SHIH, 2003).

A farinha de arroz é, na maioria das vezes, obtida de grãos quebrados. Seu constituinte mais abundante, por volta de 80 %, é o amido, cuja composição em amilose e amilopectina determinam algumas de suas propriedades físicas e conseqüentemente, a funcionalidade da farinha (BAO; BERGMAN, 2004). O tamanho das partículas e sua distribuição também afetam a funcionalidade da farinha de arroz. Partículas excessivamente grossas absorvem menos água, diminuindo o volume específico dos pães e alterando a viscosidade do amido (KADAN; BRYANT; MILLER, 2008).

As proteínas de arroz podem ser extraídas do endosperma amiláceo e do farelo, o qual é constituído por camadas do pericarpo, gérmen e camada de aleurona. As classes proteicas presentes no farelo são as

mesmas do endosperma, mas as quantidades relativas de cada uma variam (Tabela 2).

Tabela 2- Frações proteicas (g/ 100 g de proteína) em endosperma e farelo de arroz.

	<i>Endosperma</i>	<i>Farelo</i>
Albumina	6	43
Globulina	6	12
Prolamina	7	3
Glutelina	79	40

Fonte: CAO et al., 2009.

O farelo tem maior teor proteico (10 - 15 %), com maior conteúdo de lisina (3 - 4 %), do que o endosperma (6 - 8%) do arroz e outros cereais (Tabela 3) (ROMERO, 2014).

A glutelina do arroz, conhecida como orizenina, é a proteína mais importante do endosperma. Esta fração possui grande massa molar e é solúvel em soluções alcalinas ou ácidas diluídas. Em sua forma nativa, a orizenina, é constituída por vários polipeptídios ligados por ligações dissulfeto. Suas três maiores subunidades possuem 35, 28 e 16 kDa e juntamente com a glicinina da soja é membro da família das globulinas 11S com base nas similaridades das sequências primárias e síntese dos polipeptídios básicos (KATSUBE et al., 1999). Os aminoácidos mais abundantes da orizenina são glutamina, asparagina, arginina, glicina e alanina. Os grupos amida das cadeias laterais da glutamina e asparagina promovem a agregação da orizenina (SHIH, 2003).

Tabela 3 - Composição aminoacídica das proteínas extraídas do endosperma e do farelo de arroz.

Aminoácido	Farelo de arroz (g/ 16 g N)	Endosperma (g/ 16 g N)
Alanina	6,92	5,51
Arginina	7,55	7,93
Ácido aspártico	9,33	8,95
Ácido glutâmico	13,22	18,54
Cisteína*	2,32	2,52
Glicina	6,24	4,34
Histidina	2,53	2,24
Isoleucina	4,05	4,11
Leucina	7,29	7,86
Lisina	4,64	3,44
Metionina	2,18	2,24
Fenilalanina	4,53	5,09
Prolina	4,76	4,47
Serina	4,72	5,01
Treonina	3,95	3,40
Triptofano	0,77	1,11
Valina	6,28	5,81

Fonte: Adaptado de *CAGAMPANG et al., 1966; JULIANO; INSTITUTE, 2003.

As proteínas monoméricas e poliméricas do arroz interagem entre si, como ocorre no glúten, mas são proteínas menores em relação às do trigo e em consequência a massa de farinha de arroz tem uma característica viscoelástica muito menor que a massa de farinha de trigo (OSZVALD et al., 2008).

As albuminas e globulinas são solúveis em água e solução salina, respectivamente. As albuminas podem ser separadas em três ou quatro frações com massas molares variando de 10 a 200 kDa. As globulinas também podem ser divididas em quatro frações com massas molares variando de 16 a 130 kDa, e são muito heterogêneas (HETTIARACHCHY, 2012).

As prolaminas, proteínas de baixa massa molar, podem ser extraídas com etanol 70 % ou propanol 50 %. São a maior fração proteica de armazenamento dos cereais, exceto na aveia e no arroz. Estudos de eletroforese das proteínas do arroz revelaram que três diferentes prolaminas ocorrem nos corpos proteicos da estrutura lamelar. Eles têm massa molar de 10, 13-15, e 16 kDa (PARAMAN et al., 2006; HETTIARACHCHY et al., 2012; ROMERO, 2014). As proteínas de arroz configuram um total de seis bandas e a massa molar varia entre 7 kDa e 97 kDa. A banda observada em 33 kDa, a mais densa, é a orizenina (Figura 5).

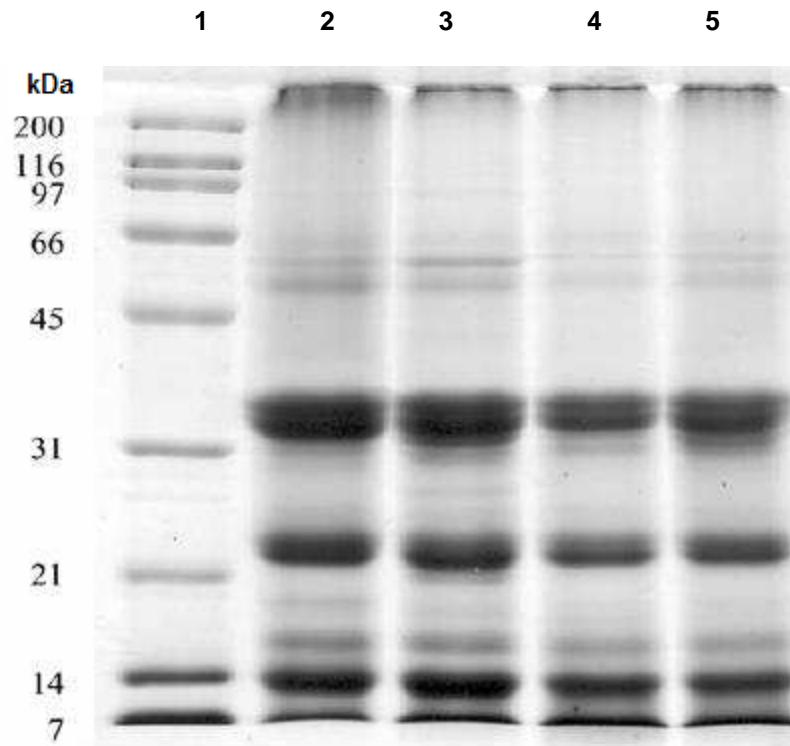


Figura 5- Perfil de massa molar das proteínas de arroz determinadas por eletroforese SDS-PAGE. Da esquerda para a direita: 1, padrão (7 a 200 kDa); 2, proteínas de arroz obtidas por extração alcalina; 3, proteína de arroz obtida por extração salina; 4, proteína de arroz obtida por extração enzimática do amido (α -amilase termoestável); 5, proteína de arroz obtida por extração enzimática do amido (α -amilase). Fonte:PARAMAN et al., 2006.

A orizenina é valiosa devido sua qualidade nutricional (rica no aminoácido essencial lisina), de modo que uma extração eficiente é necessária para torná-la competitiva no mercado de ingredientes. Vários protocolos já foram desenvolvidos para extração destas proteínas tanto do endosperma quanto do farelo de arroz (JU; HETTIARACHCHY; RATH, 2001; OSZVALD et al., 2008; USTUNOL, 2014).

O protocolo mais popular para extração é o uso de solução alcalina diluída seguida de precipitação no pH isoelétrico da proteína em temperatura ambiente após ou não remoção sequencial das frações de albumina, globulina e prolamina.

Enzimas amilolíticas, assim como a sonicação, podem ser utilizadas com intuito de facilitar a liberação das proteínas e aumentar o rendimento de extração (SHIH, 2003). A sonicação rompe a matriz proteína e amido e as células que contém as proteínas, devido ao efeito de cavitação em meio aquoso (WANG; WANG, 2004). Esta técnica também causa diminuição na porcentagem relativa de frações de grandes peptídeos (JIN; WANG; BIAN, 2011).

Técnicas menos agressivas de extração e de modificação da estrutura de proteínas têm sido testadas com sucesso para melhor aplicação industrial (KHAN et al., 2011; XIA et al., 2012a, 2012b; IZZAH et al., 2015; WANG et al., 2015a). As propriedades funcionais ainda não são as ideais para aplicação em alimentos, mas elas têm sido usadas em vários produtos alimentícios, principalmente como suplementação proteica em dietas especiais, como as de bebês e idosos (STORCK et al., 2013). Na Tabela 4 estão compiladas algumas pesquisas com proteínas do arroz extraídas do farelo ou endosperma.

Tabela 4 - Estudos com proteínas de farinha de arroz, seus objetivos, análises, resultados gerais e conclusões impactantes.

Continua

<i>Referência</i>	<i>Objetivo central</i>	<i>Análises</i>	<i>Resultado global</i>	<i>Conclusão impactante</i>
(HOU; ZHU; LI, 2010)	Caracterização das propriedades funcionais de proteínas de arroz extraídas com proteases.	Grau de hidrólise e composição do concentrado proteico, capacidade de retenção de água, propriedades emulsificantes e propriedades espumantes do concentrado.	Maior teor de proteína recuperado com extração feita com papaína. Mesmo grau de hidrólise e teor de lisina. Retenção de água, capacidade emulsificante e estabilidade de espuma foram maiores para tratamento com protease alcalina. Aplicação em linguiça.	A extração com enzimas resultou em concentrados proteicos com propriedades funcionais e potencial para uso na indústria de alimentos.
(KHAN et al., 2011)	Analisar o potencial de uso na indústria de alimentos de isolados proteicos extraídos de farelos de arroz estabilizados por micro-ondas, calor úmido e parboilização.	Composição centesimal, densidade, capacidade de absorção de água e óleo e hidrofobicidade da superfície. Propriedades emulsificantes e espumantes, índice de solubilidade de nitrogênio e concentração mínima de gelificação.	Maior teor de proteína foi das amostras não estabilizado e estabilizado por microondas. Calor quente e parboilização com maior força de ligação ao óleo e o não estabilizado à água. Maior hidrofobicidade de superfície e capacidade emulsificante do estabilizado por parboilização, mas com menor solubilidade e estabilidade de espuma. A concentração mínima de gelificação deste tratamento foi de 14%.	A exposição do farelo de arroz a tratamentos de estabilização modifica as propriedades funcionais dos isolados proteicos produzindo melhores emulsões e géis com menor concentração de proteína.
(LIU et al., 2011)	Investigar os efeitos do uso da enzima glutaminase na deamidação da glutelina do arroz.	Grau de deamidação, potencial zeta, distribuição de tamanho de moléculas (SE-HPLC), Infravermelho com transformada de Fourier e medidas de solubilidade.	O potencial zeta da amostra deamidada aumentou. Houveram mudanças na conformação das moléculas. Em pH 5 e 7 a solubilidade subindo de 9 para 76 % na amostra com 52% de grau de deamidação.	A glutaminase pode modificar glutelina de arroz e torná-la mais adequada para o uso na indústria de alimentos.

Tabela 4 - Estudos com proteínas de farinha de arroz, seus objetivos, análises, resultados gerais e conclusões impactantes.

<i>Referência</i>	<i>Objetivo central</i>	<i>Análises</i>	<i>Resultado global</i>	<i>Conclusão impactante</i>
(SOUZA et al., 2016)	Identificar a influência da extração alcalina de concentrado proteico na composição química, térmica e propriedades morfológicas dos produtos obtidos.	Distribuição de partículas e amido danificado na farinha de arroz utilizada. Análise de composição aminoacídica do concentrado por meio de derivatização com fenil isotiocianato seguida de análise em HPLC.SDS-PAGE e microscopia eletrônica de varredura.	O tamanho médio de partícula da farinha de arroz foi 22,44 µm. Teor de 24,52% de amido danificado. Houve uma redução significativa do teor de prolina do concentrado em relação a farinha. Em SDS-PAGE foi possível observar a transformação da proglutelina em subunidades básicas e ácidas devido ao rompimento do hidrogênio, amida e ligações dissulfídicas.	A extração mantém quase inalterada a composição aminoacídica das proteínas, pode reduzir custos por ser rápida e produz resíduo que pode ser utilizado na indústria química (amido).
(IZZAH et al., 2015)	Avaliar o perfil proteico do concentrado de proteínas obtido por diferentes técnicas de extração em farelo de arroz.	Teor de proteína, solubilidade e perfil aminoacídico (digestão ácida e UPLC).	Autoclavagem por 60 minutos não recuperou o aminoácido cisteína no extrato, mas aumentou a solubilidade da proteína e recuperou 64% da proteína do farelo de arroz. A sonicação teve um efeito negativo na solubilidade e no teor de proteína recuperada.	A sonicação combinada com extração em autoclave não aumenta rendimento de extração e nem melhora na solubilidade das proteínas extraídas.

Tabela 4 - Estudos com proteínas de farinha de arroz, seus objetivos, análises, resultados gerais e conclusões impactantes.

<i>Referência</i>	<i>Objetivo central</i>	<i>Análises</i>	<i>Resultado global</i>	<i>Conclusão impactante</i>
(WANG et al., 2015b)	Investigar o mecanismo responsável pela solubilização do isolado proteico de arroz utilizando moagem a frio combinada com tratamento alcalino.	Solubilidade, peso molecular (SEC, SDS-PAGE), dicróismo circular far-UV, com Infravermelho de Fourier e medidas de fluorescência para determinar hidrofobicidade da superfície.	A solubilidade de todos os tratamentos aumentou em relação ao controle. Houveram mudanças no peso molecular. A estrutura secundária dominante são bobinas aleatórias (desordenada e estrutura não repetitiva). O tratamento alcalino aumentou a polaridade.	A moagem a frio e o tratamento alcalino aumentaram a solubilidade das proteínas.
(ROMERO et al., 2012)	Estudar a composição e estrutura das proteínas de arroz e comportamento emulsificante e interfacial do concentrado proteico de arroz.	Eletroforese SDS-PAGE, solubilidade, potencial zeta, tensão interfacial transiente e superfície dilatacional, características da interface ar-água, distribuição do tamanho de gotas; concentração de proteínas na interface (Γ).	A solubilidade das proteínas é muito pequena (< 60%) e o potencial zeta é maior em pH onde a solubilidade é maior. Filmes na interface ar-água com estrutura interfacial coesa forte. Filmes mais elásticos e emulsões mais estáveis são obtidos em pH mais ácido.	Há um potencial elevado de atuação como emulsificante alimentar em pH baixo do concentrado proteico de arroz.

Tabela 4 - Estudos com proteínas de farinha de arroz, seus objetivos, análises, resultados gerais e conclusões impactantes.

<i>Referência</i>	<i>Objetivo central</i>	<i>Análises</i>	<i>Resultado global</i>	<i>Conclusão impactante</i>
(XIA et al., 2012b)	Caracterizar isolado proteico de farelo de arroz obtido de cozimento hidrotérmico e pré-tratamento com amilases.	Composição proteica, teor de ligações dissulfeto, solubilidade, hidrofobicidade e estado de agregação. Microestrutura, tamanho médio de gota e potencial zeta das emulsões preparadas com o isolado proteico.	Aumento do rendimento em proteína e da pureza do isolado. Não houveram mudanças significativas no potencial zeta assim como na solubilidade. Houve aumento na hidrofobicidade da superfície e da capacidade emulsificante e diminuição do tamanho médio das gotículas.	Produção isolado com melhores propriedades emulsificantes e físico-químicas.
(XIA et al., 2012a)	Avaliar os efeitos da microfluidização e na subsequente separação baseada na densidade na extração de proteínas de arroz quebrado.	Imagens em microscópio confocal para avaliar microestrutura e tamanho de partículas do amido, SDS-PAGE, perfil aminoacídico, solubilidade, DSC, espectroscopia Raman e digestibilidade sequencial in vitro das proteínas.	A pureza dos concentrados obtidos com microfluidização e enzimas foi maior que a obtida com extração alcalina. Desaparecimento das regiões de interação proteína-amido após tratamento dado ao arroz quebrado. Extração com microfluidização é mais seletiva. Menor teor de lisina e arginina na amostra obtida por extração alcalina. Baixa solubilidade em todos os pH testados e manutenção da estrutura nativa da proteína. Estrutura altamente desorganizada. Concentrado da microfluidização de melhor digestão que a extração alcalina.	A técnica de extração de proteínas de arroz utilizando microfluidização e enzimas (amilase e glucoamilase) mantém a estrutura nativa das proteínas e é seletiva para glutelina.

Outras aplicações das proteínas de arroz incluem desenvolvimento de aromas. Asparagina e glutamina, presentes nessas proteínas, são extraídas por meio de hidrólise ácida e posteriormente são desaminadas para produção de aromas e realçadores de sabor (HAMADA et al., 1998). Em produtos de panificação, pães e biscoitos, tem sido utilizado para enriquecimento proteico sem prejuízo das características sensoriais do produto (FABIAN; JU, 2011; YADAV; YADAV; CHAUDHARY, 2011).

O conhecimento sobre as características das proteínas de arroz e principalmente a orizenina ainda é limitado quando comparado a outros cereais, especialmente o trigo, mas com as informações disponíveis já é possível explorar sua aplicação em alimentos, principalmente em pães.

3.5. Propriedades técnico-funcionais de proteínas alimentares

Propriedades funcionais de proteínas estão relacionadas com sua estrutura e suas características físico-químicas como composição, pureza e hidrofobicidade. O entendimento das propriedades físicas, químicas e funcionais de proteínas e as mudanças que estas propriedades promovem durante o processamento de alimentos é essencial para melhorar sua performance e aumentar o espectro de aplicação dessas proteínas.

Tensão interfacial, propriedades emulsificantes, de espuma, espessante e gelificante são algumas das propriedades das proteínas alimentares importantes para uso em panificação. Muitos alimentos são espumas ou emulsões e contém proteínas com boa atividade de superfície e solubilidade; enquanto outros alimentos precisam de proteínas insolúveis com boa capacidade de absorção e retenção de água para atingir uma textura ótima (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

A tensão interfacial (γ) pode ser definida como o trabalho para aumentar a superfície em uma unidade de área por um processo isotérmico e reversível medido em uma interface ar-fluido ou fluido - fluido. (BOS; VLIET, 2001). As informações a respeito da tensão interfacial e das propriedades viscoelásticas dos filmes interfaciais formados pelas proteínas são importantes para estudar o processo de emulsificação. Uma vez formado um filme proteico na interface a estabilidade das gotículas de óleo é atingida. Quanto maior a viscoelasticidade do filme proteico maior a estabilidade (MCCLEMENTS, 1999; ROMERO et al., 2012).

A solubilidade da proteína e sua hidrofobicidade na superfície também são muito importantes para determinar a capacidade de emulsificação das proteínas. Em meio com baixa força iônica ($< 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) o sal aumenta a capacidade de hidratação da proteína e conseqüentemente aumenta sua solubilidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Os concentrados e isolados proteicos de arroz compostos principalmente por orizenina tem baixa solubilidade ($< 60\%$) em um intervalo de pH de 2 a 10 com um mínimo em pH próximo a pH 4,8 (HAMADA, 2000; PARAMAN et al., 2006; CAO et al., 2009; PINCIROLI et al., 2009; ROMERO et al., 2012). A tensão interfacial destas proteínas demonstra o efeito que a solubilidade tem nesta medida e que envolve o pH. As menores tensões são obtidas em valores de pH onde a proteína está mais solúvel e a adsorção na interface é favorecida (ROMERO et al., 2011, 2012; FELIX et al., 2016).

Em termos de processamento, a formação de emulsão é acompanhada de uma variedade de operações unitárias envolvendo dispositivos que vão de alta energia em curto tempo (homogeneizador de alta

pressão) até baixa energia em longo tempo (pá agitadora). Emulsões com micro gotas são as emulsões convencionais, e nano dispersões ou emulsões termodinamicamente estáveis são as micro emulsões (HERRERA, 2012). Tamanhos maiores de gotículas, em emulsões O/A, são encontrados em pH onde a proteína é menos solúvel e ao decorrer do tempo devido a coalescência. Melhores resultados de tensão interfacial indicam uma emulsão com menor instabilidade e conseqüentemente com menores gotículas (ROMERO et al., 2012).

Romero e seus colaboradores (2012) prepararam uma emulsão modelo utilizando concentrado proteico de arroz em condições de alta energia. Na primeira etapa, o concentrado foi suspenso na fase aquosa e depois adicionado ao óleo e homogeneizado com um misturador de alta velocidade (Ultra-Turrax), a pré-emulsão obtida foi homogeneizada novamente, mas agora em um homogeneizador de alta pressão. Alguns dispensam a segunda etapa de homogeneização, mas obtém emulsões que não se enquadram no modelo convencional e podem afetar o resultado final das análises a que serão submetidas, como aconteceu com Hou, Zu e Li (2010) e sua emulsão estabilizada por proteínas de arroz. Em outro estudo com proteínas de arroz, mas agora do farelo, foi utilizado um microfluidizador e não um homogeneizador de alta pressão na pré-emulsão (XIA et al., 2012a). Nestes estudos, as proteínas do arroz apresentaram comportamento semelhante às proteínas fibrilares e globulares quando em pH onde são mais solúveis, com potencial para um bom emulsificante alimentar em pH baixo.

A capacidade de formação de espumas, que é expressa como o volume máximo de líquido incorporado na espuma, assim como a

estabilidade, medida como o tempo para drenar metade do líquido incorporado na espuma permitem determinar a presença de proteínas solúveis, pois estas são importantes para desenvolver boas propriedades espumantes (PARAMAN et al., 2006; PINCIROLI et al., 2009).

A baixa habilidade de formação de espuma coincide com a solubilidade da proteína e com os peptídeos poderem se mover rapidamente para a interface. A capacidade de formação de espuma de uma proteína é melhorada fazendo com que ela fique mais flexível, ou seja, expondo resíduos hidrofóbicos e aumentando a capacidade de diminuir a tensão interfacial. Isso requer mudanças nas estruturas terciárias e secundárias e tratamento enzimático pode ser uma forma de alcançar estas mudanças (CAO et al., 2009).

A hidrólise de proteínas com o auxílio de enzimas parece ser o processo mais apropriado para modificar propriedades técnico-funcionais de uma proteína. No entanto, a hidrólise excessiva pode reduzir a habilidade de formação de espuma, efeito reportado em proteína do arroz, amendoim e grão de bico. Isso pode ser explicado pelo fato de que moléculas muito pequenas formam um polímero intermolecular (filme) contínuo que não é capaz de envolver bolhas de ar. A coesividade e elasticidade do filme são importantes para produzir espumas estáveis. A máxima adsorção e viscoelasticidade na interface ar - água próximo ao pH isoelétrico devido a carga negativa que a proteína possui e a ausência de interações repulsivas de moléculas de proteínas favorecem as interações proteína - proteína e formação de filme viscoelástico na interface (HAMADA, 2000; PHONGTHAI; LIM; RAWDKUEN, 2016)

A soja é usada em alimentos por ter propriedades funcionais adequadas como emulsificação, absorção de gordura, retenção de umidade, espessante e formação de espuma. A proteína de ervilha também tem sido utilizada com sucesso em alimentos e produtos de panificação, obtendo um produto enriquecido com melhor balanço de aminoácidos. A adição de proteínas de soja ou ervilha na farinha de arroz modifica as propriedades mecânicas das massas de pão, induzindo um crescimento significativo no módulo elástico em testes oscilatórios (MARCO; ROSELL, 2008a).

A aplicação das proteínas em alimentos depende de muitos fatores, incluindo a disponibilidade e preço da matéria-prima. Quando adequadamente tratadas tem potencial para o uso em alimentos, principalmente aqueles que precisam de emulsificação e formação de espuma (HOU; ZHU; LI, 2010). Além de agregar valor à matéria-prima, enriquecem os alimentos onde são aplicadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

A matéria prima principal deste estudo, farinha de arroz comercial, foi doada pela empresa Urbano Agroindustrial LTDA. (Jaraguá do Sul, Brasil). A amostra de 30 Kg foi armazenada em sacos de polipropileno, com aproximadamente 4 Kg de farinha, sob refrigeração (- 20 °C) em freezer Consul CVU26 (Santa Catarina, Brasil) até o momento das análises. Enzima transglutaminase (ACTIVA STG-M) com atividade de 27 U/g, foi doada pela empresa Ajinomoto do Brasil Ind. e Com. de Alimentos Ltda (São Paulo, SP).

Os ingredientes para preparo dos pães, fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker, óleo de soja Soya, açúcar refinado União e sal Cisne foram adquiridos no comércio local. Na Tabela 5 são apresentados os reagentes químicos com as suas respectivas marcas e grau analítico.

Tabela 5 - Reagentes utilizados neste experimento com suas respectivas marcas e grau analítico.

Continua		
<i>Reagente</i>	<i>Marca</i>	<i>Grau analítico</i>
2-Mercaptoetanol	Aldrich	95 %
Acetona	Isofar	PA
Ácido acético glacial	Isofar	PA
Ácido bórico	Alphatec	99,5 % PA
Ácido clorídrico	Alphatec	37 % PA
Ácido tricloroacético (TCA)	Vetec	PA
Álcool etílico	Anidrol	95 % neutro (96°GL) PA
Álcool isopropílico	Alphatec	99,5 % PA
Bis-acrilamida 40% (29.1,0.9)	Merck	Para eletroforese
Albumina do soro bovina (BSA)	Sigma	>98 %
Cloreto de sódio	Alphatec	99 % PA
Corante azul de comassie(R) brilhante R 250	Sigma	Para microscopia
Corante Nile Blue A	Sigma	≥ 75 %

Tabela 5 - Reagentes utilizados neste experimento com suas respectivas marcas e grau analítico. Conclusão

Reagente	Marca	Grau analítico
Corante Sudan Black B	Vetec	Prático
EDTA Sal dissódico 2H ₂ O	Êxodo Científica	PA
Éter de petróleo 30 – 60 °C	Alphatec	PA
Glicerol	Sigma	≥ 99 %
Glicina	Sigma	para eletroforese, ≥ 99 %
Hidróxido de sódio em pérolas	Alphatec	PA
Metanol anidro	Sigma	99,8 % PA
Persulfato de amônio	Sigma	≥ 98 % PA
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Sigma	≥ 99 % PA
TEMED	Sigma	para eletroforese, ≥ 99 %
Tris (hidroxi) amino metano	Sigma	≥ 99,8 % PA

4.2. Caracterização da farinha de arroz

A determinação da composição centesimal da farinha de arroz foi realizada nos laboratórios de Análise de Alimentos e de Pesquisa em Cereais do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA/UFV). Todas as análises da composição química da matéria-prima foram realizadas segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1998) em triplicata: O teor de água foi determinado em estufa à 105 °C (n. 925.10) e o de lipídeos foi obtido após extração com éter de petróleo em extrator Soxhlet (n. 920.85). O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Micro-Kjedahl, empregando-se o fator 5,95 para a conversão do nitrogênio em proteína bruta (n. 960.52). Resíduo mineral fixo foi determinado após incineração em mufla a 550 °C. O teor de carboidratos foi calculado por diferença e o teor de amido total

determinado de acordo com a metodologia proposta pela Megazyme (Irlanda, 2011), utilizando-se o Kit Total Starch.

Para determinar o tamanho das partículas da farinha foi utilizado um agitador de peneiras (W.S. Tyler, modelo RO-TAP, Cleveland, EUA). Foram peneirados 100 g de farinha de arroz durante 10 minutos, em um conjunto de sete peneiras arredondadas, com aberturas de malhas de 35; 60; 80; 100; 170; 200 mesh e uma base. Em seguida, os conteúdos retidos em cada peneira foram pesados e expressos em porcentagens de retenção, conforme o método da AACC 55-60.01 (AACC, 2012).

Capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com o método da AACC 56-11.02 (AACC, 2009a).

4.3. Extração das proteínas da farinha de arroz

4.3.1. Delineamento experimental

A extração da orizenina da farinha de arroz foi feita por três protocolos distintos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. Para avaliação das propriedades emulsificantes e espumantes foi utilizado um DIC em esquema fatorial 2x2x3 (dois protocolos de extração, dois de sonicação e três valores de pH) com duas repetições.

4.3.2. Protocolo Extração Sequencial (ES)

A extração foi conduzida como descrito por Turley e Ching (1986) com modificações (Figura 6). Primeiramente, uma amostra de 100 g de farinha de arroz desengordurada foi pesada e adicionada de 0,5 L de solução salina (29,2 g de NaCl·L⁻¹ e 20 mg de EDTA·L⁻¹).

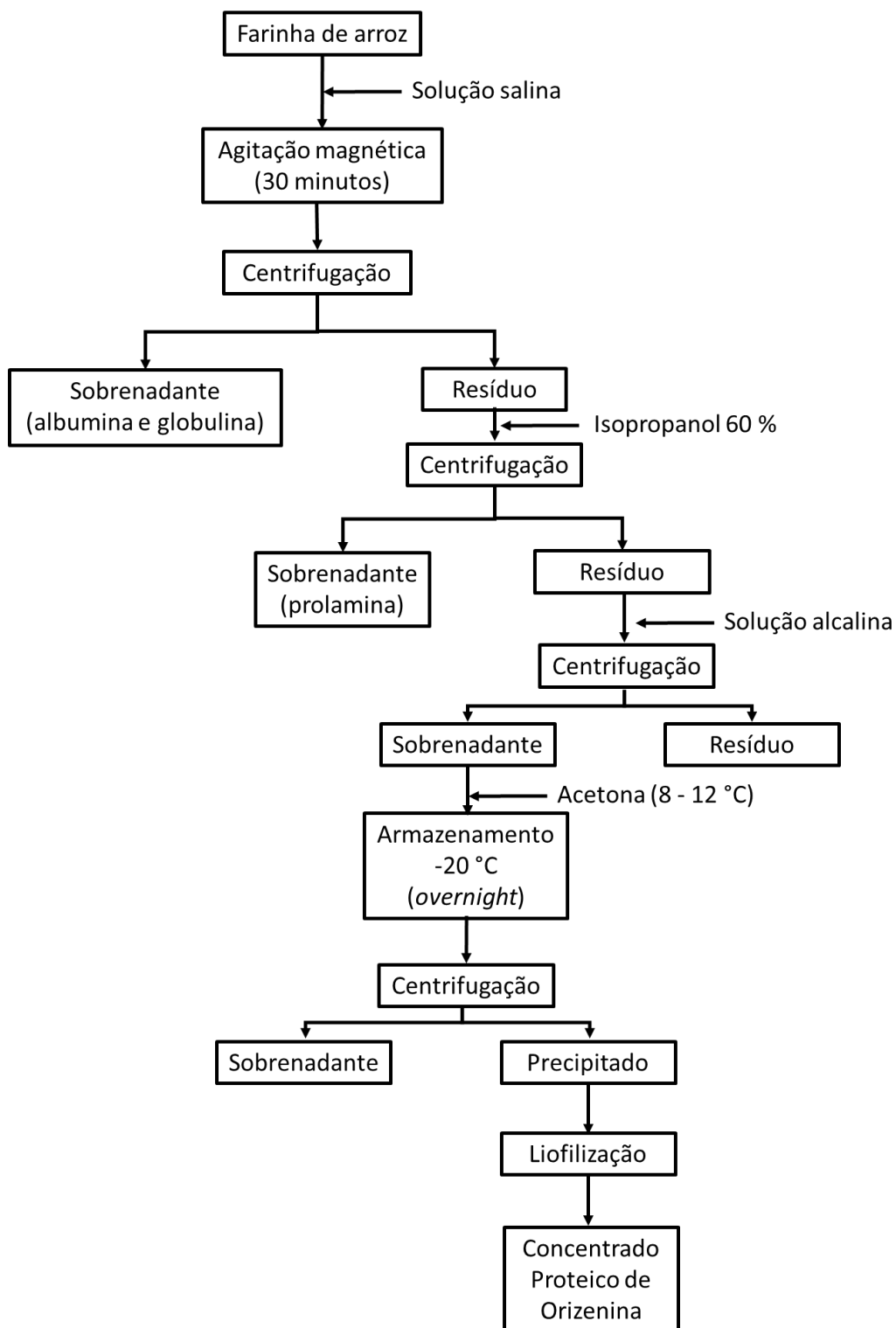


Figura 6 - Fluxograma de extração da orizenina pelo protocolo Extração Sequencial

Esta suspensão foi mantida a temperatura ambiente sob agitação magnética (Marconi, MA085, Brasil) por 30 minutos. Em seguida foi centrifugada (Beckman, modelo J2-MC, Pasadena, EUA) a 12000 x g por 10

minutos a 10 °C, sobrenadante constituído por albumina e globulina foi descartado em outro recipiente. Para extração da prolamina, 500 mL de isopropanol 60 % (v/v) foi adicionado ao resíduo da etapa anterior. A suspensão foi agitada e centrifugada como feito anteriormente e no resíduo sólido obtido foi adicionada uma solução alcalina (4,8 g de ácido bórico, 1,7 g de NaOH e 5 g de SDS por litro de solução) e a orizenina foi extraída do sobrenadante. Este foi precipitado com 1,5 L de acetona fria (8 - 12 °C), homogeneizado por inversão de recipiente de 2 L de capacidade e armazenado no freezer (-20 °C) *overnight*. A suspensão foi centrifugada a 10 °C por 10 minutos a 12000 x g e o resíduo sólido úmido liofilizado em liofilizador semi-industrial (Terroni Equipamentos Científicos, modelo LH 0401, São Carlos, Brasil).

4.3.3. Protocolo Precipitação por TCA (PA)

Modificação do protocolo usado por Zarins e Chrastil (1992) (Figura 7). Uma amostra de 500 g da farinha de arroz desengordurada foi adicionada de 2 L de água destilada e mantida sob agitação magnética por 3 h, depois centrifugada a 3000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo submetido a uma nova extração com água destilada. Posteriormente, o resíduo foi lavado duas vezes com solução NaCl 5 % e centrifugado a 3000 x g por 15 minutos. O resíduo sólido foi tratado duas vezes consecutivas com solução de etanol 70 % e novamente centrifugado a 3000 x g por 15 minutos. Após descarte do sobrenadante, o resíduo sólido da lavagem anterior foi tratado por três horas com solução NaOH 0,025 mol·L⁻¹ e depois centrifugado a 3000 x g por 15 minutos, sendo que, nesta etapa, o sobrenadante foi recolhido. Esse procedimento foi repetido e os

sobrenadantes foram precipitados por TCA 70 % (concentração final do TCA por volta de 5 %) e centrifugados a 3000 x g por 15 minutos. O sólido decantado foi lavado duas vezes com 1 L água destilada e etanol 70 % e centrifugado novamente. O resíduo sólido úmido foi liofilizado.

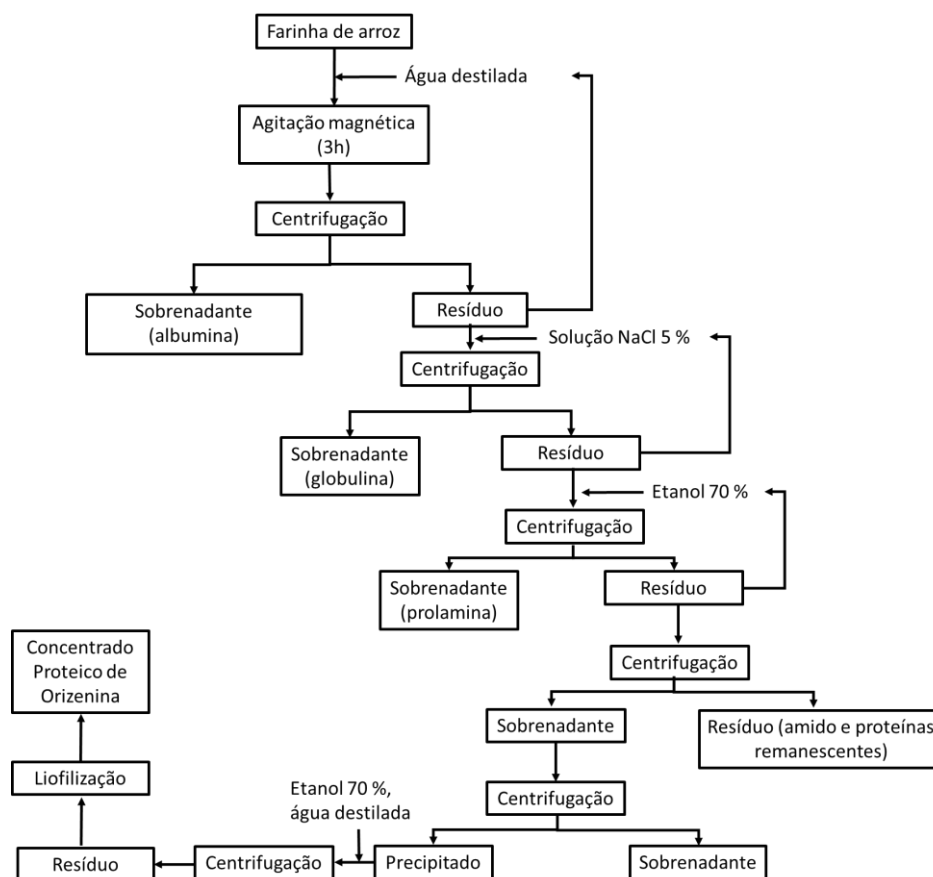


Figura 7 - Fluxograma de extração da orizenina pelo protocolo Precipitação por TCA

4.3.4. Protocolo Rápido Alcalino (RA)

O terceiro protocolo de extração, modificado de SOUZA e colaboradores (2016) (Figura 8), consiste em uma extração alcalina rápida. Farinha de arroz desengordurada (100 g) foi adicionada de 1 L de solução de NaOH 0,1 M sob agitação magnética por 1 h a temperatura ambiente. Depois, foi centrifugada por 30 minutos a 3000 x g. O sobrenadante foi recolhido e o pH foi ajustado com HCl 1 mol·L⁻¹ e 0,1 mol·L⁻¹ até o ponto isoelétrico da

orizenina (pH 4,8) (JU; HETTIARACHCHY; RATH, 2001), o precipitado foi lavado duas vezes com 1 L água destilada e centrifugado. O resíduo sólido úmido foi liofilizado.

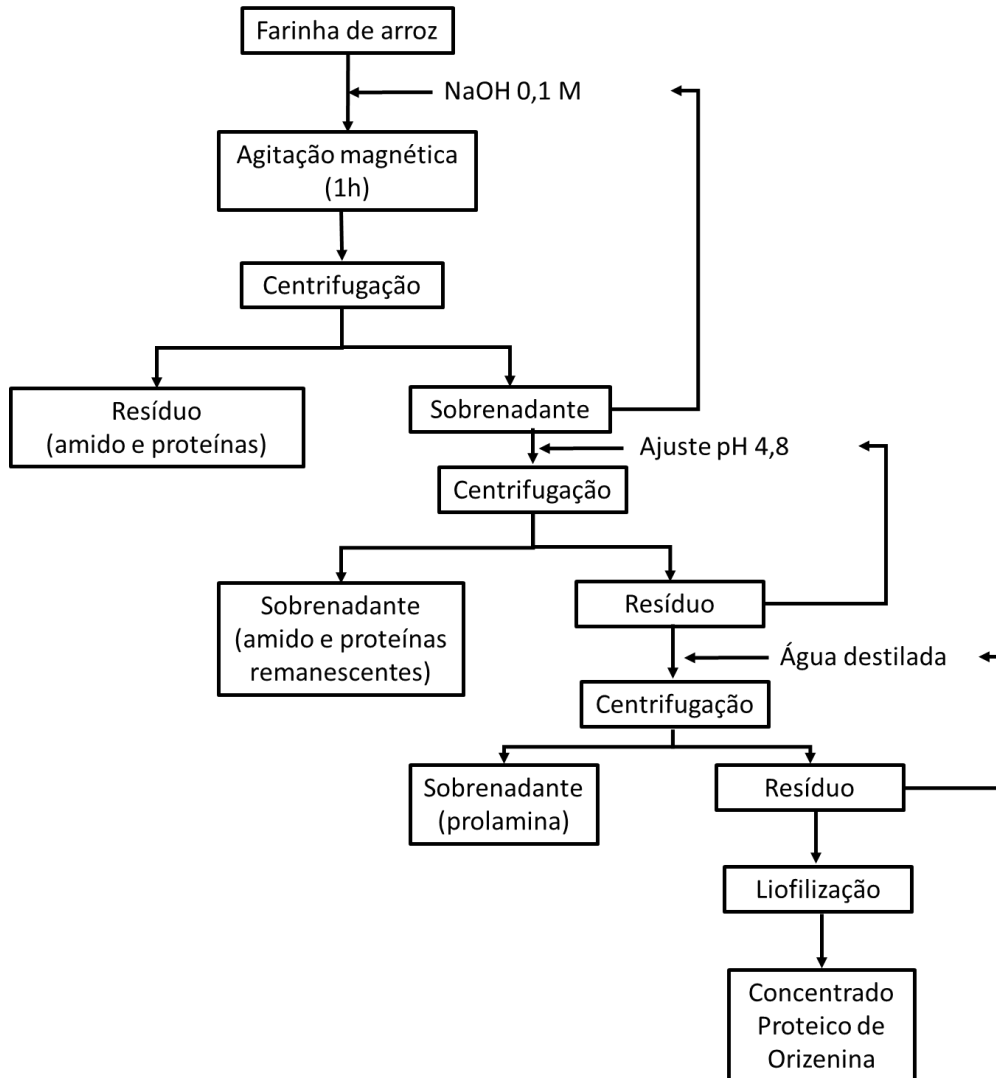


Figura 8- Fluxograma de extração da orizenina pelo protocolo Rápido Alcalino.

Para avaliar a eficiência dos protocolos para obtenção de concentrados proteicos de orizenina foi determinado o teor de proteína bruta (AOAC, 1998) e o rendimento total de extração. Os protocolos de extração mais eficientes e selecionados para estudo de propriedades técnico-funcionais foram aqueles que obtiveram maior rendimento de extração e teor proteico.

4.4. Caracterização dos concentrados proteicos de arroz

4.4.1. Perfil de massas molares - SDS-PAGE

A distribuição da massa molar dos concentrados proteicos de orizenina foi estudada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE). Foi utilizado o método vertical com placas de 10x10 cm, descontínuo de alta resolução em SDS–PAGE, descrito por LAEMMLI (1970) e modificado por FULLINGTON, COLE e KASARDA, (1983) empregando-se gel de empilhamento (“stacking gel”) de poliacrilamida a 4 % (m/v) e gel de fracionamento (“running gel”) de poliacrilamida a 15 % (m/v). A eletroforese foi conduzida a tensão constante de 200 V. Os padrões de baixa massa molar utilizados fazem parte do kit Amersham (GE Healthcare) de calibração de baixa massa molar (14 kDa a 97 kDa). A coloração dos géis foi feita com Comassie Blue.

4.4.2. Solubilidade

Os concentrados proteicos de orizenina obtidos pelos protocolos ES (CES) e RA (CRA) (3 g) foram suspensos em 100 mL de água deionizada. O pH foi ajustado e mantido em 2,0; 3,0;4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 ou 9,0, com soluções de HCl 1 mol·L⁻¹ ou NaOH 1,0 mol·L⁻¹. As soluções foram agitadas em temperatura ambiente por 24 h e em seguida centrifugadas a 10 000 x *g* por 20 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de seringa com poro de 0,45 µm Merck Milipore (Darmstadt, Alemanha) e o teor de proteínas determinados pelo método da reação de Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949), utilizando uma curva analítica obtida com albumina de soro bovino nas concentrações aquosas de 1,0 mg·mL⁻¹ a 10,0 mg·mL⁻¹. A leitura

da absorvância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, UVmini1240, Japão), sendo, portanto, a concentração de proteína determinada para cada concentrado proteico usando a equação de regressão da curva analítica.

4.4.3. Propriedades interfaciais

Os concentrados proteicos de orizenina CES e CRA foram diluídos em 100 mL de água destilada de modo a preparar uma solução com 5,7 mg e 7,5 mg de proteína solúvel, respectivamente. O pH foi ajustado para extremo ácido (2,0), ponto isoelétrico da orizenina (4,8) e extremo básico (9,0) e foram submetidos ao processo de sonicação por 80 segundos a uma potência de 24 W no disruptor de células ultrassônico (Fisher Scientific, modelo 120, Pittsburgh, EUA). Água destilada, soluções sonicadas e não sonicadas tiveram sua tensão interfacial (óleo/solução proteica) medida usando o método da gota pendente no tensiômetro DSA100 Kruss (Hamburg, Alemanha) por 3600 segundos.

O modelo matemático (Equação 1) foi ajustado aos dados experimentais que descrevem a cinética de adsorção das proteínas na interface e a queda da tensão interfacial:

$$\gamma = \gamma_{eq} + \kappa_1 \cdot e^{(-\kappa_2 t)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que γ_{eq} é a tensão interfacial no equilíbrio, κ_1 e κ_2 (min.^{-1}) são a taxa de adsorção e a constante de decaimento da tensão na interface, respectivamente.

A avaliação do modelo ajustado foi feita por meio do coeficiente de determinação (R^2) e da estimativa do erro percentual absoluto médio (MAPE) (Eq. 2):

$$\text{MAPE} = \frac{\sum |(y_t - \hat{y}_t) / y_t|}{n} \times 100, (y_t \neq 0) \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que onde y_t é o valor real, \hat{y}_t é o valor ajustado, e n é igual ao número de observações.

4.4.4. Propriedades emulsificantes

- **Preparação das emulsões**

Os concentrados proteicos de orizenina CES e CRA foram diluídos em 100 mL de água destilada de modo a preparar uma solução com 5,7 mg e 7,5 mg de proteína solúvel, respectivamente. O pH foi ajustado para extremo ácido (2,0), ponto isoelétrico da orizenina (4,8) e extremo básico (9,0) e foi mantido sob agitação constante por 24 h a temperatura ambiente. Após a agitação as soluções foram submetidas ou não a sonicação por 80 segundos a uma potência de 24 W. Adicionou-se óleo de girassol (10 % v/v) com 0,05 % de corante Sudan Black foi adicionado e misturados em homogeneizador Ultra Turrax (Yellow line DI25 basic, IKA, Staufen, Alemanha) a 24 000 rpm por 15 minutos em banho de gelo. Imediatamente após o processo de homogeneização, alíquotas de emulsão foram transferidas para tubos de ensaio ($\varnothing = 1,5$ cm).

- **Avaliação macroscópica: índice de cremeação**

As emulsões foram fotografadas e a altura da fase separada foi medida durante 30 minutos em intervalos de 5 minutos e depois de 3 em 3 h

até completar 24 h. O percentual do índice de cremeação (IC %) foi reportado como (Equação 3):

$$IC \% = 100 \times \frac{AI}{AT} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que AI é a altura da fase separada e AT é a altura total da emulsão. O modelo matemático foi ajustado aos dados experimentais que descrevem a cinética da cremeação da emulsão (Eq. 4):

$$IC \% = IC_{eq}(1 - e^{(-kt)}) \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que IC_{eq} é o índice de cremeação no equilíbrio e k constante relacionada a velocidade de cremeação.

A avaliação dos modelos ajustados foi feita por meio do coeficiente de determinação (R^2) e do erro percentual absoluto médio (MAPE).

- **Avaliação microscópica: tamanho médio das gotículas e polidispersidade**

As análises microscópicas das emulsões foram realizadas em microscópio óptico Olympus modelo BX50 (Tóquio, Japão), em que uma alíquota da emulsão foi colocada em lâmina, coberta com lamínula e visualizada com um aumento de 400 x e 1000 x. As imagens foram obtidas no dia do preparo das emulsões. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente após 1h. Quatro imagens de cada emulsão foram analisadas com o auxílio do software Image J 1.50b ([HTTP://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)), as fotografias foram primeiramente convertidas para imagens em escala de cinza 8-bit de 640-480 pixels, apresentando níveis

de cinza entre 0 e 255. O tamanho das gotas foi caracterizado em termos do diâmetro médio superficial d_{32} e o desvio padrão (Equação 5),

$$d_{32} = \frac{\sum nd^3}{\sum nd^2} \pm \sqrt{\frac{\sum (d_{32} - \bar{d}_{32})^2}{n-1}} \quad (\text{Eq. 5})$$

em que n é o número de partículas com diâmetro d .

4.4.5. Propriedades espumantes

Os concentrados proteicos de orizenina CES e CRA foram diluídos em 100 mL de água destilada de modo a preparar uma solução com 5,7 mg e 7,5 mg de proteína solúvel, respectivamente. O pH foi ajustado para extremo ácido (2,0), ponto isoelétrico da orizenina (4,8) e extremo básico (9,0) e as soluções foram mantidas sob agitação constante por 24 h em temperatura ambiente. Após a agitação as alíquotas de 25 mL foram submetidas ou não a sonicação por 80 segundos a uma potência de 24 W. Em seguida foram homogeneizadas em homogeneizador Ultra Turrax por um minuto a 20 500 rpm e fotografadas.

A densidade (ρ_e) de cada espuma foi determinada pela razão massa e volume ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$); a fração volumétrica de ar (ϕ) foi calculada de acordo com a equação 6, baseada na densidade calculada anteriormente e na densidade da solução proteica (ρ_l) e considerando que a densidade do ar é desprezível; a porcentagem de expansão da espuma (overrun) foi calculada de acordo com a equação 7 (FRANCO et al., 2015).

$$\phi = 1 - \frac{\rho_e}{\rho_l} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\text{overrun}(\%) = \frac{\left(\frac{1}{\rho_e} - \frac{1}{\rho_l}\right)}{\frac{1}{\rho_l}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que ϕ é a fração volumétrica de ar, ρ_l é a densidade da solução e ρ_e é a densidade da espuma.

4.5. Elaboração e avaliação de pães isentos de glúten formulados com farinha de arroz

4.5.1. Delineamento experimental

Os pães sem glúten foram formulados com modificações na temperatura da mistura, concentrado proteico de orizenina (CPO) obtido pelo protocolo de extração com maior teor de proteína bruta e de transglutaminase (ETG) seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) com três fatores e cinco níveis (Tabela 6), mais seis pontos axiais e o ponto central. O ponto central foi repetido duas vezes totalizando 16 ensaios (2^3+6+2).

Tabela 6 - Delineamento composto central do experimento de panificação

Fatores	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
Temperatura de mistura (°C)	28	32,5	39	45,5	50
Concentrado proteico de orizenina (g/100 g farinha de arroz)	0	1,2	3,0	4,8	6
Transglutaminase (U/g de proteína na farinha de arroz)	0	2,4	3	9,6	12

As combinações dos níveis de temperatura, concentrado proteico e transglutaminase que originaram as formulações dos pães encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Combinações dos níveis de temperatura de mistura (°C), concentrado proteico de orizenina (g/100g farinha de arroz) e transglutaminase (U/g de proteína na farinha de arroz)

Tratamento (ordem de corrida)	Temperatura (°C)	Concentrado Proteico (g/100g farinha de arroz)	Transglutaminase (U/g de proteína na farinha de arroz)
1	45,5	4,80	2,43
2	39,0	3,00	12,00
3	39,0	6,00	6,00
4	32,5	1,20	2,43
5	32,5	4,80	9,60
6*	39,0	3,00	6,00
7	45,5	1,20	2,43
8	45,5	1,20	9,60
9	32,5	1,20	9,60
10	39,0	3,00	0,00
11	39,0	0,00	6,00
12*	39,0	3,00	6,00
13	32,5	4,80	2,43
14	28,0	3,00	6,00
15	50,0	3,00	6,00
16	45,5	4,80	9,60

*Ponto central com duas repetições

4.5.2. Elaboração das massas

Pães sem glúten foram produzidos a partir de uma formulação controle, composta de farinha de arroz, açúcar, sal, fermento biológico instantâneo e óleo vegetal (Tabela 8), sem adição de orizenina e transglutaminase e mistura a 28 °C.

Tabela 8 - Formulação controle de pães a base de farinha de arroz

Formulação Controle	(g/100g de farinha de arroz)
Açúcar	5
Sal	1,5
Fermento biológico instantâneo	2
Óleo vegetal	3
Água destilada	<i>q.s.p.</i>

O preparo das massas foi baseado no método direto rápido (Figura 9), pelo qual os ingredientes foram misturados por 10 minutos no farinógrafo Brabender (Duisburg, Alemanha). Em seguida, a massa foi cortada ($10\pm 0,1$ g), modelada, disposta em formas de alumínio retangulares (dimensões de 5,6 cm de comprimento, 2,7 cm de largura e 2,1 cm de altura), e mantida por 90 minutos em câmara de fermentação a 38 °C. A massa

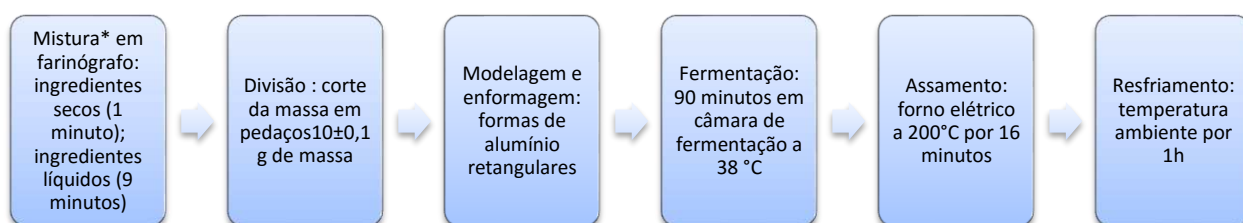


Figura 9 - Fluxograma de processamento das massas de pão sem glúten.

*A temperatura de mistura foi controlada de acordo com os tratamentos da Tabela 7.

fermentada foi assada por 16 minutos a 200 °C em forno elétrico Fischer (Brusque, Brasil).

Os pães assados foram removidos das formas e resfriados à temperatura ambiente por 1h antes das avaliações de volume específico e firmeza de miolo (STORCK et al., 2013).

4.5.3. Caracterização das massas

- **Propriedades de textura**

A textura da massa dos pães foi avaliada em texturômetro Stable Micro Systems modelo TA-XTEExpress (Godalming, Inglaterra) através do teste de perfil de textura adaptado (ARMERO; COLLAR, 1997), utilizando uma sonda cilíndrica de 38 mm de diâmetro. A massa não fermentada foi colocada em placa de vidro, para ser comprimida até atingir 60 % do volume original, a uma velocidade de 2 mm·s⁻¹ com o tempo de 25 s entre compressões.

- **Propriedades reológicas**

O comportamento viscoelástico das massas foi determinado pela realização de provas oscilatórias em reômetro de tensão controlada HAAKE MARS Thermo Electron Corp (Waltham, EUA). O sistema de medição consistia de placas paralelas (placas ásperas de 35 mm de diâmetro, 1 mm entre as placas). Amostras das massas de pão após a fermentação foram colocadas entre as placas e descansaram por 5 minutos antes de iniciar o teste. As medidas foram realizadas a 30 °C. Testes de varredura de frequência foram realizados a partir de 0,01 a 10 Hz para determinar o módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') e a tangente do ângulo de

defasagem ($\tan \delta$) em função da frequência de 1 Hz (MARCO e ROSELL, 2008).

- **Propriedades térmicas**

A análise térmica das massas foram examinadas por um calorímetro diferencial de varredura DSC, como descrito por RIBOTTA; LEÓN; AÑÓN (2003). Cerca de 10 mg da amostra foi colocada em um recipiente de alumínio e um recipiente vazio foi utilizado como referência. A temperatura foi mantida a 30 °C por dois minutos e posteriormente aquecidas de 30 a 110 °C a uma taxa de 11,7 °C/minuto e mantida a 110 °C por 5 minutos.

4.5.4. Caracterização dos pães

- **Volume total e específico**

O volume total dos pães foi determinado pelo método de deslocamento de sementes AACC 10-05.01 (AACC, 2009b), utilizando sementes de painço. O volume específico ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) foi calculado pela razão entre a massa do pão e volume total.

- **Propriedades de textura**

Análise de firmeza do miolo dos pães foi conduzida no texturômetro Stable Micro Systems modelo TA-XTEExpress (Godalming, Inglaterra). As amostras foram fatiadas para se obter uma fatia central de 12,5 mm de espessura. Uma sonda cilíndrica de 12,7 mm de diâmetro (P/0.5R) a uma velocidade de teste de $2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ comprimiu a amostra por uma distância de 10 mm. O pico de força de compressão foi reportado como firmeza de acordo

com o método da AACC 74-09 (AACC, 2009c). A análise foi repetida após 24h e 48h de armazenamento em sacos de polipropileno a temperatura ambiente.

- **Análise por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)**

A análise de MCVL foi realizada no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM/UFV) para análise da microestrutura do miolo dos pães. Amostras dos pães de aproximadamente 5x5x2 mm de dimensão foram cortadas com bisturi (Walmur, Porto Alegre, Brasil), colocadas em lâmina microscópica e Nile Blue aquoso (0,1 % m/m) foi adicionado à superfície (ALVAREZ-JUBETE et al., 2009). Uma lamínula foi colocada sobre a fatia corada e as amostras analisadas em um microscópio confocal de varredura a laser LSM510 META Zeiss (Oberkochen, Alemanha). Imagens dual channel foram feitas com uma objetiva de 40x, utilizando laser hélio-neon excitado 633 nm e laser argônio-ion 488 nm para revelar gorduras, proteínas e amido gelatinizado. Imagens de 512x512 pixels foram obtidas.

4.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS v9.4 (SAS Institute, Cary, EUA) licenciado para uso da Universidade Federal de Viçosa. Os dados obtidos do estudo das propriedades emulsificantes e espumantes dos concentrados proteicos avaliadas foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e para as variáveis em que foram encontradas diferença significativa o teste de comparação de médias de Tukey foi aplicado, com nível de significância de 10 %. Regressão não linear

foi aplicada para ajuste dos modelos cinéticos de adsorção na interface e cremeação.

Para cada característica da massa e do pão testadas (variável resposta) foi conduzida a análise de variância, para determinar diferenças significativas ($p < 0,1$). Para a seleção do modelo de regressão mais adequado, foram avaliados a falta de ajuste, os coeficientes de regressão e o coeficiente de determinação R^2 . A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para análise dos dados experimentais e otimizar a variável resposta. As correlações significativas ($p < 0,1$) entre as diferentes variáveis testadas nos pães e nas massas foram calculadas utilizando os coeficientes de correlação de Pearson.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da farinha de arroz

5.1.1. Composição centesimal

A composição centesimal média da farinha de arroz encontra-se na Tabela 9. O teor de proteína e lipídeos se aproximam dos valores reportados na literatura (JULIANO; BOULTER, 1976; SINGH et al., 2000; UNICAMP, 2011). O teor de proteína total e lipídeos na farinha de arroz é o menor entre os cereais. A farinha de trigo, por exemplo, contém por volta de 12 % de proteínas e 1 % de lipídeos e menos de 1 % de lisina. O milho com 6 % de proteínas e 2 % de lipídeos aproximadamente, e conteúdo de lisina por volta de 0,30 %, mas o conteúdo de lisina da farinha de arroz está entre 3 – 4 % o que faz destas proteínas as com melhor qualidade nutricional entre eles (LORENZ; KULP, 1991; ZHOU et al., 2002).

Tabela 9 - Composição centesimal da farinha de arroz

Componente	Composição centesimal (g/100g)
Amido	82,22 ± 2,29
Lipídeos totais	0,61 ± 0,05
Proteína total	6,44 ± 0,14
Resíduo Mineral Fixo	0,46 ± 0,00
Água total	10,19 ± 0,00

O amido é o maior constituinte da farinha de arroz, informação corroborada pelos resultados obtidos, e o teor de amilose desta, juntamente com as proteínas e os lipídeos, são determinantes nas características de pasta e das massas produzidas com esta farinha (BHATTACHARYA, 2011).

5.1.2. Distribuição de tamanho das partículas

A distribuição do tamanho de partículas revelou que a maior retenção ocorreu nas malhas de 177 μm e 88 μm (29,7 e 22,5 %) de abertura. As partículas mais finas (< 74 μm) assim como as mais grossas (> 420 μm) estão em menor quantidade (Figura 10).

O perfil de distribuição de tamanho de partículas evidencia uma distribuição bimodal. Em farinha de arroz é um comportamento típico (HAN et al., 2012) e que também foi observado em farinha de trigo de dureza média adequada à panificação, mas sem um perfil com distinção clara entre partículas finas e grossas. No trigo partículas mais grossas estão associadas a um maior teor de glúten e conseqüentemente a adequação a panificação (BLANCHARD et al., 2012; PROTONOTARIOU et al., 2014).

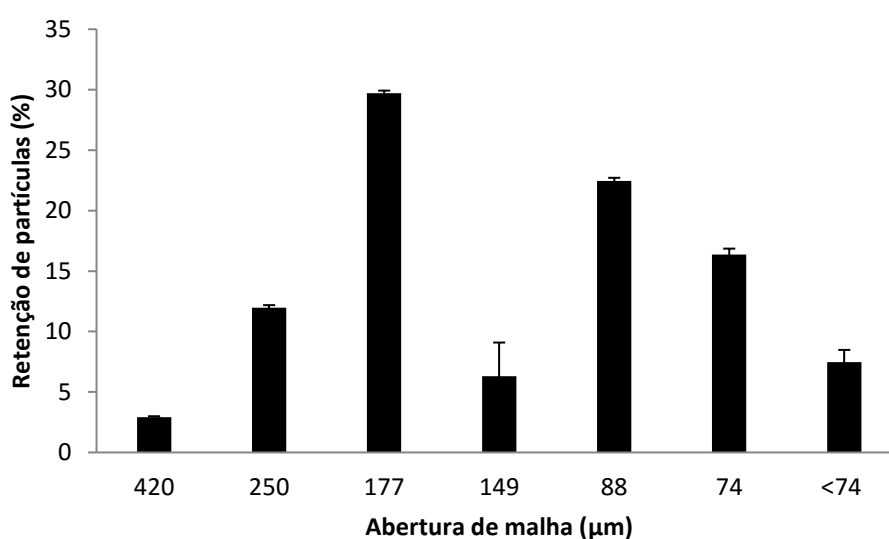


Figura 10 - Distribuição do tamanho de partículas da farinha de arroz

A distribuição bimodal e proporção de partículas menores e maiores (> 250) da farinha de arroz se assemelha às farinhas de trigo mole que não são adequadas a panificação (BLANCHARD et al., 2012).

Embora o perfil de distribuição de tamanho de partículas seja semelhante, o tamanho médio de partículas da farinha analisada supera o de farinhas de trigo de dureza média e mole. O processo de mistura da farinha de arroz é mais sensível a distribuição de tamanho de partículas que a farinha de trigo (OSZVALD et al., 2008). Quando se trata de desempenho em panificação sem glúten, farinhas com média de tamanho das partículas menores (<80 µm), como o da farinha de trigo de dureza média, levam a produção de pães com menor volume quando o teor de água das massas é o mesmo, concluindo-se que as massas produzidas com partículas mais grosseiras (>180 µm) retêm mais gás durante fermentação. Em farinha de trigo observa-se uma tendência contrária, ou seja, as partículas mais finas são mais favoráveis à panificação (BLANCHARD et al., 2012; DE LA HERA; MARTINEZ; GÓMEZ, 2013; DE LA HERA; ROSELL; GOMEZ, 2014; PROTONOTARIOU et al., 2014).

O tamanho das partículas influencia diretamente na retenção de água da farinha. As partículas mais finas possuem maior área superficial de contato, portanto retêm mais água que partículas grandes (Tabela 10).

Tabela 10 - Capacidade de retenção de água (CRA) das amostras de farinha de arroz retidas nas peneiras de abertura de malha (µm).

<i>Abertura de malha (µm)</i>	<i>CRA (g água/g amostra seca)</i>
420	1,52 ± 0,16
250	1,52 ± 0,19
177	1,68 ± 0,24
149	1,79 ± 0,31
88	1,81 ± 0,29
74	1,89 ± 0,26
<74	1,91 ± 0,30

Em estudo com farinhas de diferentes variedades, amostra com mesma capacidade de retenção de água que uma farinha de trigo com 63 %

de absorção de água não produziu pães com maior volume específico, mas sim aquelas com menor capacidade de retenção de água ($< 1,0 \text{ g/g}$) (HAN et al., 2012). A farinha de arroz apresentou CRA de $1,70 \pm 0,31$, semelhante a CRA da fração da farinha mais abundante retida na peneira com $177 \mu\text{m}$ de abertura de malha.

Para farinha de trigo, o aumento da retenção de água permite durante o forneamento, após desnaturação das proteínas, maior disponibilidade de água que é prontamente absorvida pelo amido e fibras. A gelatinização do amido depende da disponibilidade de água para determinar a textura final e volume dos pães (BLANCHARD et al., 2012).

5.1.3. Conclusão parcial

A farinha de arroz contém teor relativamente baixo de proteínas, lipídeos e o amido é o componente mais abundante. As partículas médias (entre 88 e $250 \mu\text{m}$) são as majoritárias e influenciam diretamente na absorção e retenção de água da farinha.

O perfil bimodal da distribuição de tamanho se assemelha ao perfil de farinhas de trigo, principalmente das de trigo mole que não são adequadas para panificação.

Logo, a composição química foi o esperado para a farinha de arroz, o tamanho médio de partículas se encaixam em um perfil adequado para panificação sem glúten, porém a capacidade de retenção de água não.

5.2. Caracterização das proteínas da farinha de arroz

5.2.1. Rendimento de extração

Os concentrados proteicos obtidos e os três protocolos de extração foram avaliados quanto ao rendimento de extração (%) e o teor de proteína total (%) para avaliar a eficiência dos protocolos (Tabela 11).

Tabela 11 - Rendimento de extração e teor de proteína total dos materiais proteicos obtidos por cada protocolo de extração

<i>Protocolo de extração</i>	<i>Rendimento bruto</i>	<i>Proteína Total (%)</i>
Extração Sequencial (ES)	3,18 ± 0,26b	15,72 ± 1,47c
Precipitação por TCA (PA)	1,81 ± 0,58c	67,34 ± 0,89b
Rápido Alcalino (RA)	4,63 ± 0,35a	73,53 ± 0,39a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os concentrados proteicos obtidos pelos protocolos Rápido Alcalino (CRA) e pelo protocolo Precipitação por TCA (CPA) com maior teor de proteína total foram caracterizados quanto as suas propriedades técnico funcionais. O extrato obtido pelo protocolo ES embora com alto rendimento não possui teor proteico adequado para caracterização.

O baixo teor de proteínas no extrato ES pode ser efeito do uso de SDS na extração. O SDS desnatura as proteínas e se liga a elas, carregando-as negativamente e dificultando a interação proteína - proteína. Conseqüentemente elas se solubilizam e são descartadas com o sobrenadante. Além disso, o solvente para precipitação, a acetona, pode não ter sido capaz de promover a precipitação da maior parte das proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

5.2.2. Perfil de massas molares – SDS-PAGE

Os tamanhos das subunidades proteicas dos concentrados estão resumidos e os perfis de eletroforese obtidos para farinha e concentrados são mostrados na Tabela 12 e Figura 11, respectivamente.

Tabela 12 – Massa molar (kDa) das subunidades proteicas dos concentrados proteicos caracterizados por SDS-PAGE.

Banda	CES (kDa)	CPA (kDa)	CRA (kDa)
1	76,3	-	74,2
2	70,6	-	70,5
3	-	67	-
4	59,8	-	59,9
5	57,3	57,1	57,4
6	41,9	-	-
7	37,8	-	-
8	35,4	35,2	35,1
9	33,7	33,2	33,8
10	25,4	25,4	25,3
11	19,6	19,5	19,6
12	16,5	-	-
13	14,8	14,8	-
14	14,4	14,4	14,4

CES – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Extração Sequencial; CPA – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA; CRA - Concentrado proteico obtido pelo protocolo Rápido Alcalino.

O concentrado proteico obtido por Extração Sequencial (CES) com 13 bandas supera em número de subunidades tanto dos outros concentrados obtidos neste estudo, quanto os registrados nas referências da literatura, com

6 e 4 bandas (AGBOOLA; NG; MILLS, 2005; PARAMAN et al., 2006). Há a possibilidade de contaminação do concentrado por subunidades de prolamina e albumina (~16 kDa) (KUMAGAI et al., 2006), devido ao isopropanol 60 % não solubilizar a prolamina como o etanol 70 % utilizado no protocolo PA.

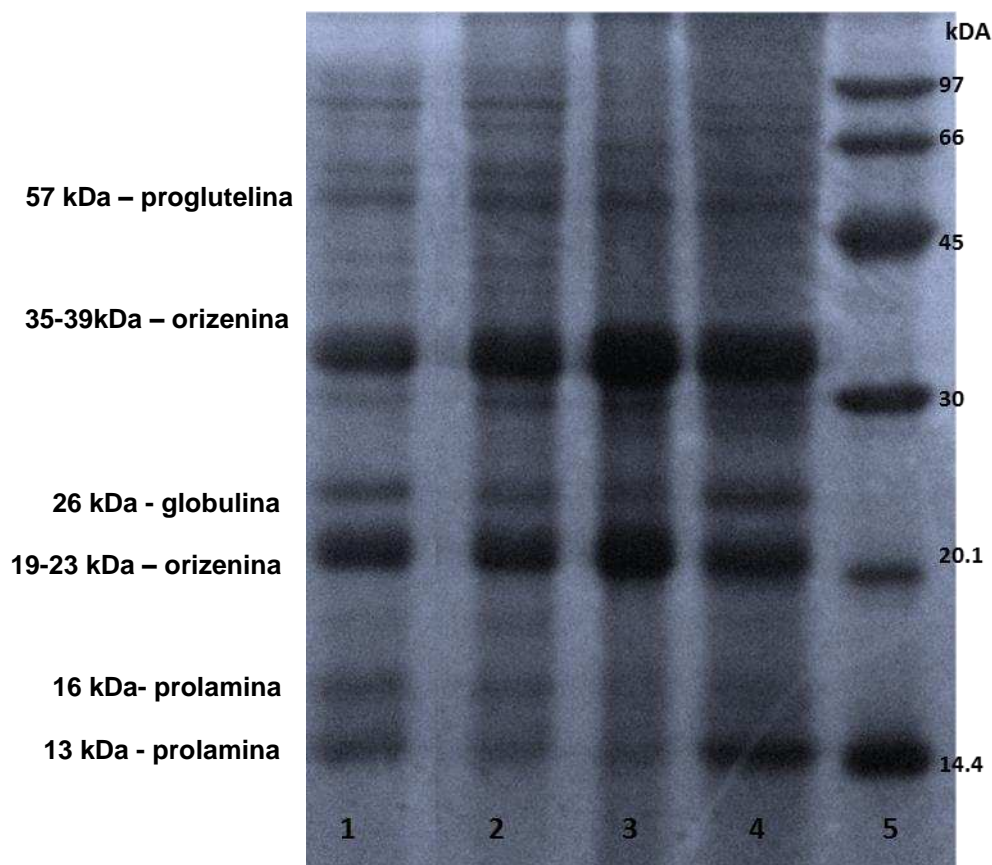


Figura 11 - Perfis de eletroforese da farinha de arroz (1), CES (2), CPA (3) e CRA (4). À direita encontra-se o padrão de massa molar (5).

Existe também a possibilidade do procedimento ter promovido a formação de polipeptídios menores provavelmente a partir da hidrólise de ligações intermoleculares durante o processo de extração com NaOH.

O maior efeito de desnaturação ou contaminação foi observado visualmente no CRA cuja a banda de aproximadamente 14 kDa apresentou maior intensidade.

A composição proteica dos concentrados é a mesma da farinha de arroz, sendo perceptível o aumento da concentração das subunidades de orizenina.

Pode-se inferir, pela intensidade das bandas, que o CPA tem maior concentração de orizenina que os demais. As subunidades de α -glutelina (~35 kDa) e β -glutelina (~19 kDa), referentes à orizenina, são as bandas de maior intensidade em todos os concentrados proteicos e também na farinha de arroz. A proglutelina (~57 kDa), um polipeptídeo formado pelas subunidades α -glutelina e β -glutelina por ligação dissulfídrica intermolecular, é também visível na farinha e nos concentrados (KUMAGAI et al., 2006).

5.2.3. Solubilidade

A solubilidade em diferentes valores de pH dos concentrados proteicos de orizenina CPA e CRA é baixa como pode ser visto no gráfico a seguir (Figura 12).

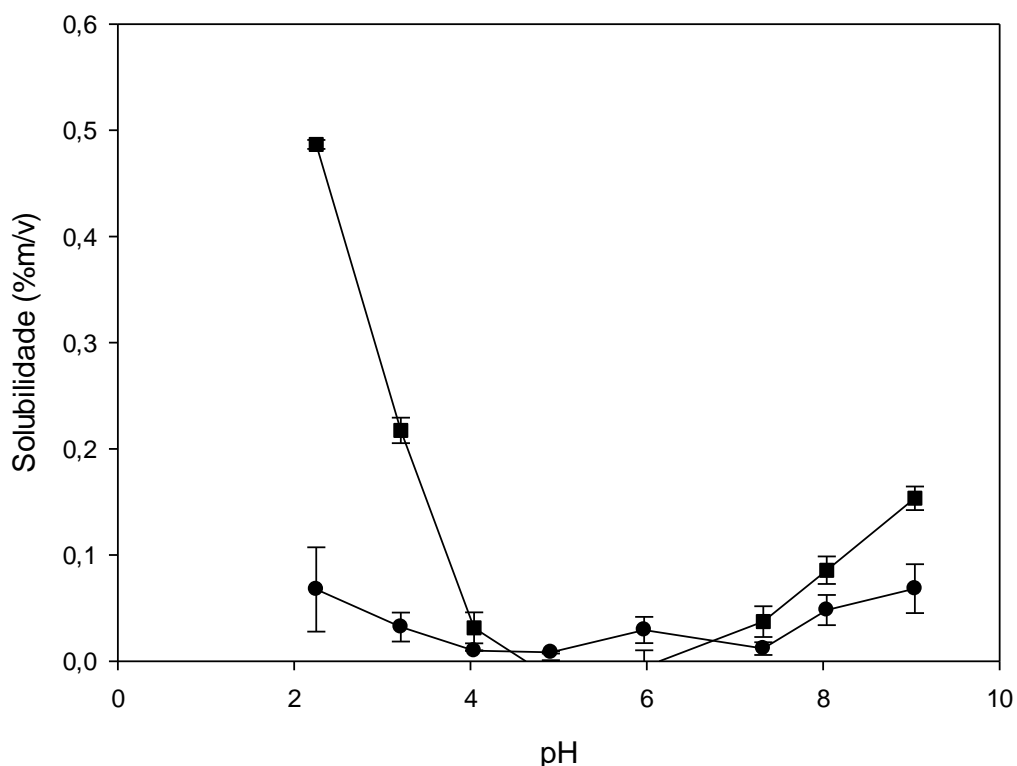


Figura 12 – Variação da solubilidade em função do pH dos concentrados proteicos de orizenina CPA (●) e CRA (■).

O ponto isoelétrico (pI) dos concentrados proteicos se encontram próximo ao pH 4,8, como descrito por outros autores (JU; HETTIARACHCHY; RATH, 2001; CAO et al., 2009; ROMERO et al., 2012). Em valores de pH extremos (ácido ou alcalino) a solubilidade aumentou no CRA. Os maiores valores de solubilidade foram encontrados em pH 2 e 9 (0,49 % m/v e 0,16 % m/v, respectivamente) no CRA. Isolados extraídos de variedades de arroz latino-americanas com aproximadamente 85 % de proteína, e australiana, com teor de orizenina maior que 94 %, exibiram maior solubilidade em pH ácido (50 % m/m) (PINCIROLI et al., 2009) e alcalino (0,48 % m/v) (AGBOOLA; NG; MILLS, 2005), respectivamente. Em ambos estudos citados, a extração foi feita com base no método de Osborne (1907), semelhante ao

usado na extração CPA. Diferenças entre as variedades provavelmente estão ligadas a estrutura e grau de polimerização da orizenina. O maior grau de polimerização das subunidades é um fator levaria a formação de complexos proteicos maiores e mais insolúveis (KATSUBE-TANAKA et al., 2004).

A dependência da solubilidade pelo pH do meio está relacionada às características físico-químicas da orizenina. Esta proteína possui elevada massa molar, ligações dissulfídicas e interações hidrofóbicas que a torna extremamente insolúvel em meio aquoso. Entre os dois protocolos de extração, a diferença observada pode ser atribuída à contaminação por prolamina devido à ausência de uma etapa para extraí-la no RA.

A partir dos perfis de eletroforese SDS-PAGE observa-se no CRA uma maior intensidade de polipeptídeos de baixa massa molar que resultou em aumento na solubilidade, enquanto o CPA exibiu maior intensidade nas bandas de orizenina (35 e 19 kDa) que diminui a solubilidade.

5.2.4. Propriedades Interfaciais

A atividade na interface, ou seja, a habilidade de diminuir a tensão interfacial das soluções de CRA e CPA na interface óleo/água em pH 2; 4,8 e 9 (Figura 13) apresenta um comportamento comum às proteínas em geral. Ao longo do tempo há uma queda típica na tensão interfacial, rápida inicialmente devido a rápida adsorção das proteínas na interface.

Análise dos resultados na Tabela 13, onde κ_1 é a taxa de adsorção das proteínas na interface, κ_2 é a constante do tempo de adsorção e γ_{eq} é a tensão interfacial de equilíbrio, permite concluir que as maiores taxas de

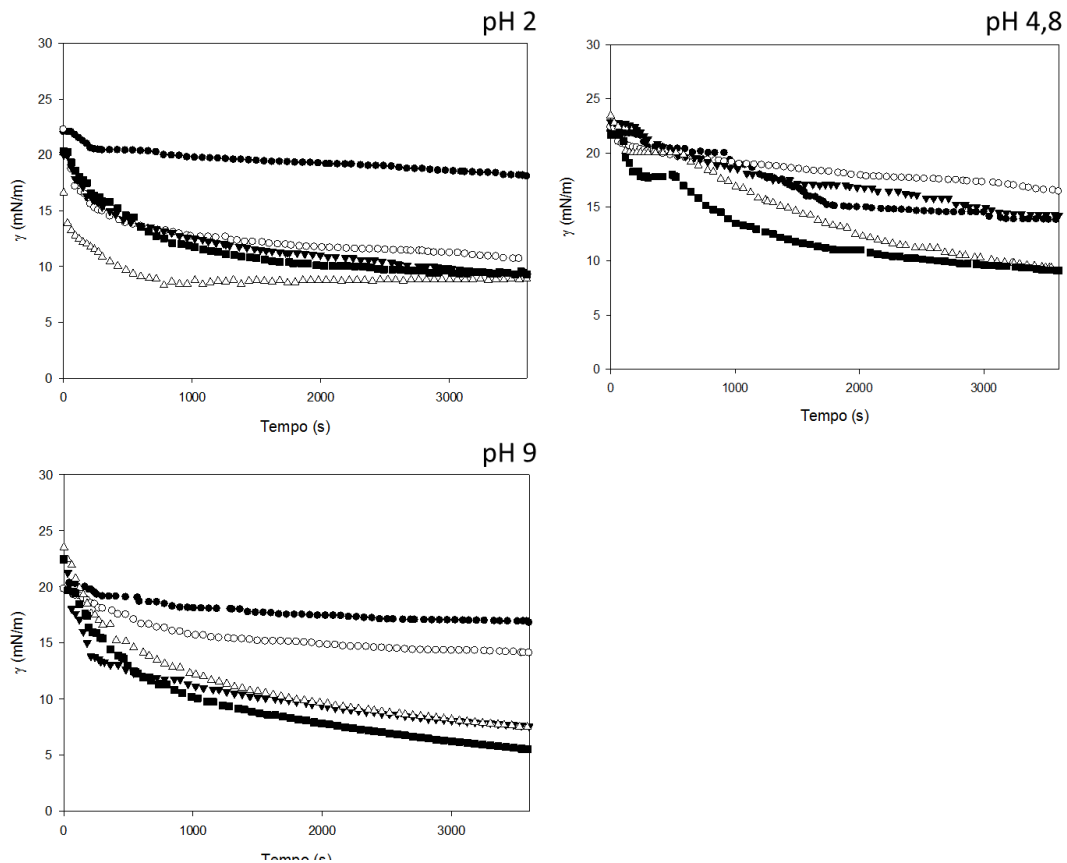


Figura 13 - Tensão interfacial (mN/m) em pH 2; 4,8 e 9 dos concentrados proteicos. Representados por ● controle; ○ CPA; ▼ CPA_S; Δ CRA; ■ CRA_S.

adsorção (κ_1) são observadas no CRA e CRA_S indicando que as proteínas presentes são mais rápidas na adsorção na interface em pH 4,8 e pH 9 ou que a presença de íons sódio (Na^+) remanescentes do protocolo de extração RA contribuísssem para este resultado. Em emulsões, concentrações de NaCl de até 10 mM podem aumentar o potencial zeta de 10 mV para valores absolutos de até 90 mV, ou seja, os íons na interface diminuiriam a tensão interfacial devido ao efeito de repulsão eletrostática (TADROS, 2013).

O tempo para que ocorra a adsorção até o equilíbrio, considerando a constante κ_2 , tende a aumentar no pH em que as proteínas estão próximas ao ponto isoelétrico. Próximo a este ponto, as proteínas têm sua carga neutralizada, diminuindo a repulsão eletrostática e provocando agregação e

floculação das proteínas adsorvidas na interface. Esta movimentação na interface permanece até se alcançar um equilíbrio e pode levar horas (ROMERO et al., 2012).

Tabela 13 - Constantes da equação ($\gamma = \gamma_{eq} + \kappa_1 \cdot \exp(-\kappa_2 t)$) que descreve a cinética da queda da tensão interfacial em função do pH (2;4,8 e 9) e uso da sonicação nos concentrados proteicos de orizenina (CPA_S e CRA_S).

<i>pH</i>	<i>Amostra</i>	γ_{eq} (mN/m)	κ_1	κ_2 (min ⁻¹)	R^2
2	CPA	14,1	7,809	2,08x10 ⁻³	0,946
	CPA_S	9,8	9,011	1,21x10 ⁻³	0,974
	CRA	8,8	6,348	4,09x10 ⁻³	0,973
	CRA_S	9,6	10,460	1,60x10 ⁻³	0,995
4,8	CPA	13,8	8,055	3,29x10 ⁻⁴	0,989
	CPA_S	12,9	10,020	5,15x10 ⁻⁴	0,987
	CRA	4,6	17,760	3,85x10 ⁻⁴	0,986
	CRA_S	8,8	12,590	9,27x10 ⁻⁴	0,952
9	CPA	14,2	5,590	1,21x10 ⁻³	0,995
	CPA_S	8,6	10,640	1,74x10 ⁻³	0,908
	CRA	8,0	13,800	1,22x10 ⁻³	0,984
	CRA_S	6,3	14,000	1,31x10 ⁻³	0,983

γ_{eq} : Tensão interfacial de equilíbrio; κ_1 : taxa de adsorção; κ_2 : constante de decaimento da tensão na interface; CPA – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA; CPA_S – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA sonicado; CRA - Concentrado proteico obtido pelo protocolo Rápido Alcalino; CRA_S – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Rápido Alcalino sonicado.

A sonicação foi realizada com a expectativa de melhora desta propriedade. Seu efeito na conformação das proteínas poderia torná-las mais ativas na superfície, aumentar a velocidade de adsorção das proteínas na interface e diminuir a tensão de equilíbrio. No entanto, os resultados não são

conclusivos a respeito do efeito e impacto da sonicação nas propriedades técnico-funcionais e devem ser melhor investigados.

Proteínas do soro de leite, por exemplo, tem suas propriedades funcionais afetadas por sonicação (20 kHz/15 minutos). A alta intensidade do tratamento aumenta a solubilidade da proteína ao modificar a conformação e estrutura, de maneira que as partes hidrofílicas dos aminoácidos voltadas para o interior sejam voltadas para a água. Este tratamento também leva a diminuição da massa molar da proteína o que implica em grande área da proteína é coberta por moléculas de água. A hidrólise da proteína do soro geralmente resulta no aumento da capacidade de formação de espumas devido ao efeito de homogeneização (dispersão das proteínas) da sonicação (JAMBRAK et al., 2008).

Neste estudo, o tempo não foi suficiente para atingir o equilíbrio em todos valores de pH, mas os modelos de cinética de adsorção ajustados descrevem a variação da tensão com o tempo ($R^2 > 0,90$). As menores tensões de equilíbrio foram obtidas em soluções de CRA. A leitura dos gráficos destaca uma tendência, mesmo com o tratamento de sonicação, de todas as soluções convergirem para a mesma tensão de equilíbrio e favorecimento da atividade na interface em meio básico.

A maioria das proteínas diminuem a tensão na interface água/óleo para cerca de $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). Em estudos com concentrado proteico de arroz com 75% de proteína total, a tensão de equilíbrio foi de $10,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ e $12,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em pH 2 e 8, respectivamente (ROMERO et al., 2012). Em proteína de batata a tensão de

equilíbrio atingiu valores menores de 10 e 9,2 mN·m⁻¹ em pH 2 e 8 (ROMERO et al., 2011).

Para compreender o processo de emulsificação e de formação de espuma é importante obter informações sobre a tensão interfacial. A estabilidade da emulsão depende da diminuição da tensão interfacial e é uma das características mais importantes para aplicação na indústria de alimentos (MCCLEMENTS, 1999).

5.2.5. Propriedades emulsificantes

- **Avaliação macroscópica: índice de cremeação**

A atividade na interface O/A das proteínas do concentrado proteico de orizenina tende a estabilizar as gotículas da emulsão e impedir a floculação por um curto período de tempo (Figura 14). A combinação de repulsão eletrostática, estérica, e a variação do pH contribuem para instabilidade, sendo alta nos concentrados proteicos testados.

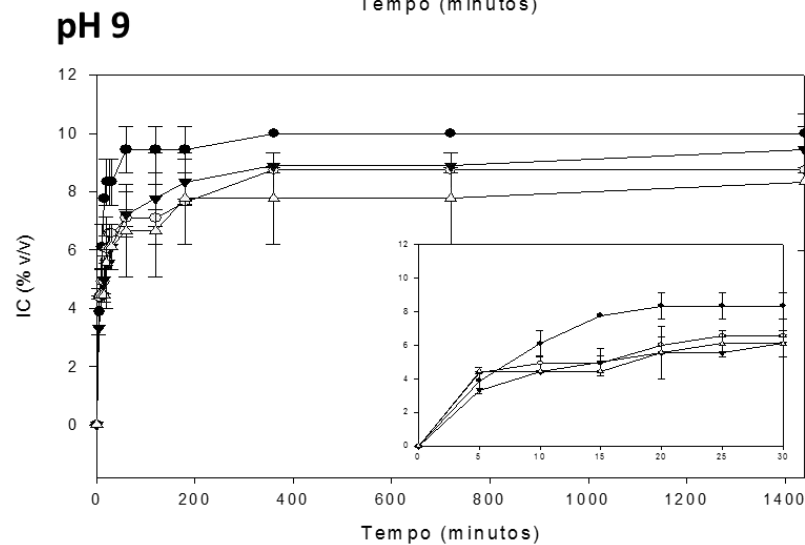
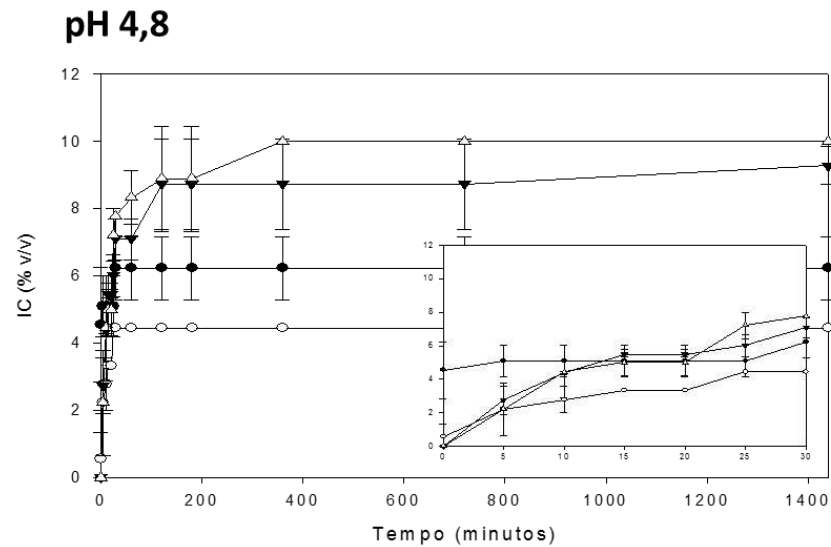
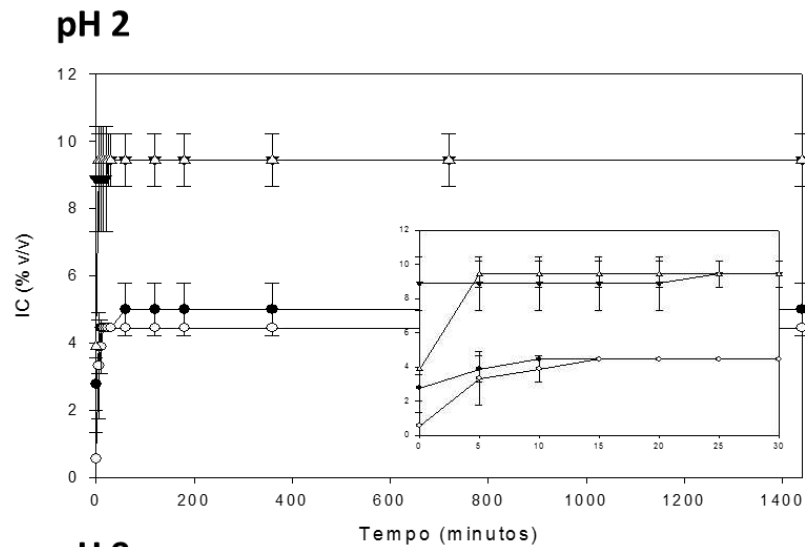


Figura 14- Efeito do pH e da sonicação no índice de cremação (IC) das emulsões estabilizadas por CRA (Δ); CPA (▼); CRA_S (○); CPA_S (●). Os gráficos menores destacam o IC (%v/v) nos primeiros 30 minutos.

Na Figura 15 é possível atestar visualmente que após 30 minutos depois de formadas todas as emulsões apresentavam separação das fases. A homogeneidade das emulsões caracteriza a dificuldade de se produzir emulsões com os concentrados proteicos de orizenina, sendo possível ver gotas de corante e óleo não emulsionadas no tempo 0. As emulsões mais homogêneas foram obtidas no pH 9 e o estudo de tensão interfacial O/A já indicava que neste pH as proteínas do concentrado proteico deixariam as emulsões mais estáveis porque reduziram a tensão interfacial para valores relativamente baixos.

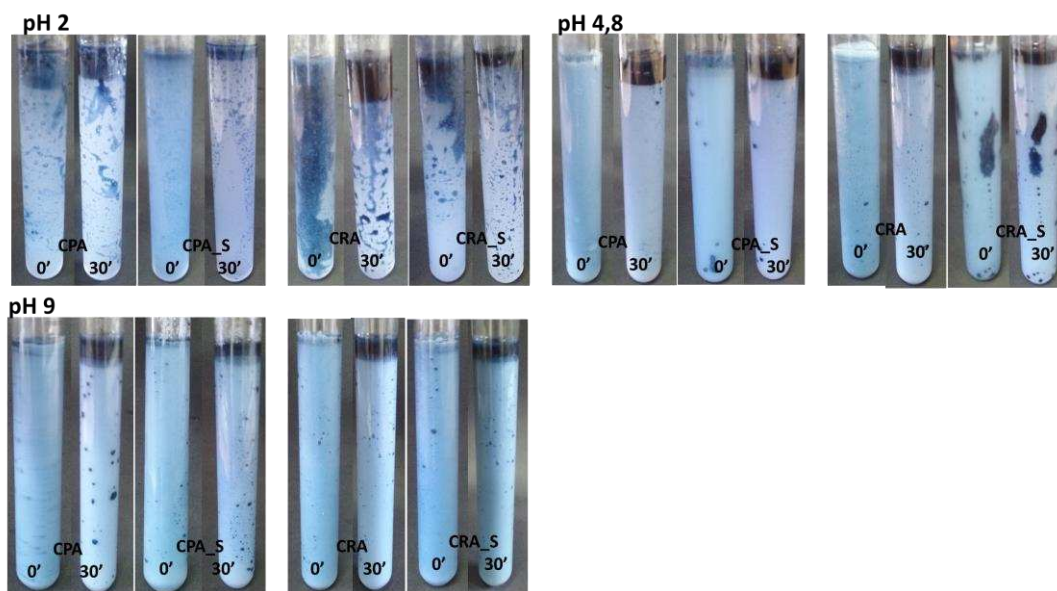


Figura 15 - Imagens das emulsões O/A estabilizadas com concentrado proteico de orizenina obtido pelo protocolo Precipitação por TCA e Rápido alcalino (CPA e CRA) e sonicados (CPA_S e CRA_S) em pH 2, 4,8 e 9 imediatamente após preparo (0') e após 30 minutos (30').

O tratamento de sonicação visualmente não provocou mudanças na maioria das emulsões, mas em pH 2 foi observado uma melhor distribuição das gotículas de óleo no meio.

A Tabela 14 apresenta às médias do índice de cremeação no equilíbrio (IC_{eq}) e da taxa de cremeação (κ), é um resumo do estudo da

cinética da separação de fases e pode ajudar a compreender melhor o que foi observado visualmente. Os dois tipos de concentrado proteico, o tratamento de sonicação e o pH foram os fatores testados.

Tabela 14 – Índice de cremação no equilíbrio (IC_{eq} (%)), taxa de cremação (κ (min^{-1})), coeficiente de determinação (R^2) da equação ajustada da cinética de cremação ($IC = IC_{eq}(1 - e^{(-\kappa t)})$) e o erro percentual absoluto médio MAPE (%).

pH	Amostra	IC_{eq} (%)	κ (min^{-1})	R^2	MAPE (%)
2	CPA	5,7	2,06	0,000	9,7
	CPA_S	4,8	1,18	0,059	12,3
	CRA	5,8	3,01	0,995	0,0
	CRA_S	4,5	2,52	0,920	8,6
4,8	CPA	8,6	0,85	0,950	7,0
	CPA_S	5,9	1,24	0,000	7,8
	CRA	9,5	0,68	0,940	6,8
	CRA_S	4,4	0,88	0,840	4,3
9	CPA	8,4	0,76	0,905	10,2
	CPA_S	9,6	2,48	0,970	3,2
	CRA	7,3	0,70	0,860	10,6
	CRA_S	7,9	0,66	0,880	10,6

CPA – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA; CPA_S – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA sonicado; CRA - Concentrado proteico obtido pelo protocolo Rápido Alcalino; CRA_S – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Rápido Alcalino sonicado

O ajuste do modelo de regressão não linear que descreve a cinética de cremação não explica a variação do IC com o tempo para todas as amostras e de fato, as curvas das emulsões em pH 2 não tem comportamento semelhante às demais.

A interação entre os fatores não é significativa, mas o fator pH tem influência sobre a constante κ ao nível de 10 % de probabilidade (Tabela 15). Em pH 4,8, foi observada a menor constante κ , que pode ser reflexo de uma adsorção mais rápida das proteínas na interface retardando a cremação.

Tabela 15 - Médias da constante κ (min^{-1}) das emulsões no pH 2, 4,8 e 9

pH	κ (min^{-1})
2	2,19 ^a
4,8	0,91 ^b
9	1,14 ^a

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ($p > 0,1$) pelo teste Tukey.

O índice de cremação no equilíbrio reflete a separação de fases até a estabilização deste. Portanto, um IC_{eq} menor que 10 %v/v assinala que o concentrado proteico é capaz de manter parte do óleo emulsionado até o fim do experimento. A interação entre o tipo de concentrado proteico de orizenina e o pH do meio foi significativa ao nível de 10 % de probabilidade.

O IC_{eq} do CPA e CRA, no pH 2, são os menores (Tabela 16), mas visualmente são as emulsões mais instáveis. As emulsões estabilizadas por CPA em pH 9 tem o maior IC_{eq} e são as emulsões de menor instabilidade. A falta de homogeneidade das emulsões, pode ser o principal motivo para essas divergências, mas ainda assim todas as médias são menores que 10 % v/v.

Tabela 16 - Médias do IC_{eq} das emulsões estabilizadas por CPA e CRA em pH 2, 4,8 e 9.

	pH 2	pH 4,8	pH 9
CPA	5,3 ^{Ba}	7,3 ^{ABa}	9,0 ^{Aa}
CRA	5,2 ^{Aa}	7,0 ^{Aa}	7,6 ^{Aa}

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na mesma linha, não diferem entre si ao nível de 10 % de probabilidade pelo teste Tukey. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 10 % de probabilidade pelo teste Tukey.

No pH 2, o comportamento de CPA não pode ser avaliado de forma conclusiva ($R^2 < 0$), mas neste pH as emulsões apresentam a maior média da taxa de cremação, confirmado pela análise visual das emulsões formadas

que eram as mais heterogêneas imediatamente após a homogeneização (tempo 0'). O resultado esperado nesse pH, ao avaliar os resultados de tensão interfacial, era de emulsões tão estáveis quanto às do pH 9 e menor taxa de cremeação. Embora o IC_{eq} menor, aparentemente os pontos de acúmulo de óleo não homogeneizado não cremearam e ficaram na parede dos tubos subestimando o resultado.

A sonicação não tem efeito significativo nos parâmetros analisados ($p > 0,1$). A sonicação em CPA e CRA provavelmente não altera características das proteínas ligados a estabilidade de emulsões como repulsão estérica e eletrostática (BOS; VLIET, 2001). O pH tem efeito significativo ($p < 0,1$), onde o pH 2 e pH 9 são, respectivamente, as menores e maiores médias

A estabilidade das emulsões O/A depende do desdobramento e interação das moléculas de proteínas na superfície das gotículas de óleo. Em diferentes valores de pH as proteínas apresentam diferentes cargas, nos extremos, ácido ou básico, a carga das proteínas aumenta e quando esta carga é suficientemente grande previne a coalescência das gotículas devido a repulsão eletrostática entre elas. Quando as proteínas se encontram no pl e a carga é nula, as forças repulsivas não previnem a coalescência e a instabilidade da emulsão aumenta (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Estudos com concentrados e isolados proteicos confirmam a baixa capacidade emulsificante e a estabilidade das emulsões O/A formadas com concentrado proteico de orizenina em relação a proteínas como a albumina do sêrum bovino e uma relação entre a tensão interfacial e capacidade

emulsificante (ANDERSON; HETTIARACHCHY; JU, 2001; CAO et al., 2009; PINCIROLI et al., 2009; HAMADA et al., 2013).

Quando a farinha de trigo é misturada, lipídeos não polares presentes naturalmente na forma de óleo são emulsificados. A massa é, portanto, uma emulsão O/A. Esta emulsão é estabilizada por um filme interfacial de moléculas anfifílicas, que podem ser proteínas (ELIASSON; LARSSON, 1993). Na farinha de trigo, a maioria dos lipídeos polares e uma fração significativa dos não polares estão associados firmemente ao glúten, permitindo a retenção de CO₂ e assim são responsáveis pelo volume dos pães. A interação entre lipídeos e amido pode diminuir a velocidade de retrogradação. Uma proteína com boa capacidade emulsificante, portanto, é importante para panificação e em pães sem glúten podem eliminar a adição de emulsificantes (STAUFFER, 2007; DEMIRKESEN et al., 2010).

- **Avaliação microscópica: distribuição de diâmetro das gotículas da emulsão**

As emulsões avaliadas neste trabalho foram homogeneizadas com Ultra - Turrax e este método não permite a formação de pequenas gotas monodispersas. As micrografias das emulsões mostram que as macroemulsões formadas são polidispersas (Figura 16).

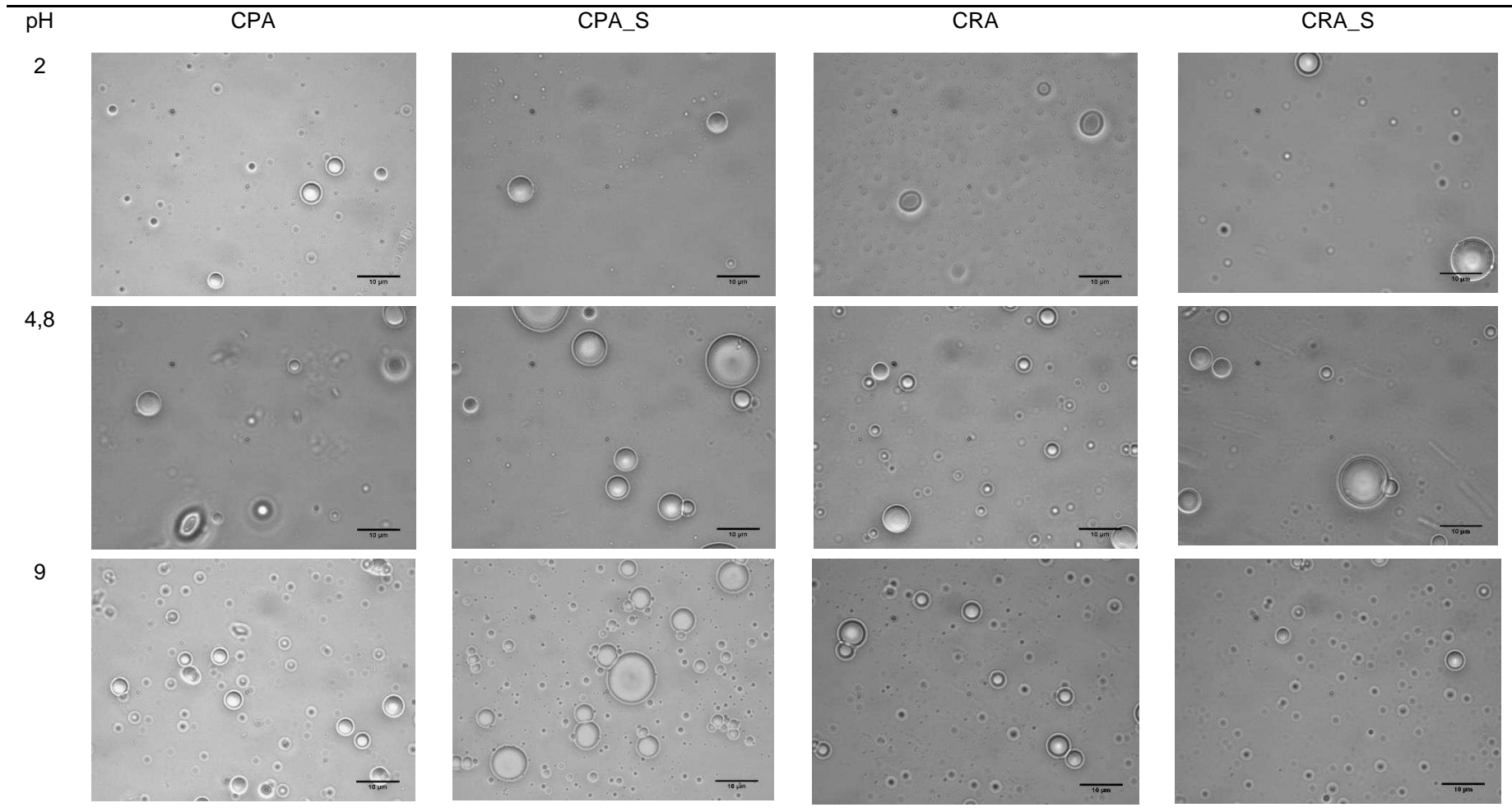


Figura 16 - Micrografias das emulsões O/A com concentrado proteico de orizenina e 10 % (m/m) de óleo de girassol. Barra de escala = 10 µm.

O tamanho médio das gotas variou de 9,40 μm a 2,37 μm , a interação entre os três fatores testados foi significativa ($p < 0,1$). As médias dos doze tratamentos resultantes da interação de terceiro grau (Tabela 17), desdobrados em função do pH mostram que as maiores gotas de emulsões ocorreram no pH 4,8 e 9.

Nas condições mais próximas do pl, onde as proteínas têm carga nula, as gotas são maiores devido as forças repulsivas diminuírem e não prevenirem as gotas de se agregarem. Longe do pl, as forças repulsivas não são fortes o suficiente para evitar a coalescência das gotas.

Os tratamentos com menor tamanho médio de gotas se encontram em pH 2, onde as proteínas são ligeiramente mais solúveis e segundo o estudo das emulsões são as menos instáveis.

Tabela 17 - Tamanho médio de gotas (d_{32}) em μm das emulsões estabilizadas com concentrado proteico de orizenina (CPA e CRA) sonicados ou não em diferentes valores de pH.

Sonicação	Concentrado Proteico	pH		
		pH 2	pH 4,8	pH 9
Sim	CPA	6,57 \pm 2,59 ^{Aa}	6,12 \pm 1,72 ^{Ab}	4,48 \pm 1,53 ^{Ab}
	CRA	4,68 \pm 1,96 ^{Aab}	8,86 \pm 4,55 ^{Aa}	6,53 \pm 3,07 ^{Aab}
Não	CPA	2,37 \pm 1,28 ^{Bb}	9,40 \pm 3,65 ^{Aa}	7,99 \pm 2,00 ^{Aa}
	CRA	5,13 \pm 0,69 ^{Aa}	4,93 \pm 1,79 ^{Ab}	5,07 \pm 2,81 ^{Aa}

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na mesma linha, não diferem entre si ao nível de 10 % de probabilidade pelo teste Tukey. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 10 % de probabilidade pelo teste Tukey. CPA – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA; CPA_S – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA sonicado; CRA - Concentrado proteico obtido pelo protocolo Rápido Alcalino; CRA_S – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Rápido Alcalino sonicado.

Observa-se que nas micrografias das emulsões há uma baixa dispersão de gotas na fase observada. Os resultados confirmam as observações feitas quanto a instabilidade das emulsões refletindo na dificuldade em encontrar gotas que ainda não haviam coalescido e que

permaneciam na fase fotografada. Em pH 9, com CPA e CPA_S, a densidade de gotas aparentemente é maior.

O uso de um homogeneizador de alta pressão poderia melhorar a estabilidade ao diminuir o tamanho das gotas. Quanto maior a pressão, menor o tamanho das gotas e maior a estabilidade da emulsão (MCCLEMENTS, 1999). A redução do tamanho das partículas provocada pelo aumento de pressão gera um aumento da área interfacial que possibilita maior interação com as proteínas.

Emulsões estabilizadas por isolado proteico de orizenina em pH 7, homogeneizadas sob alta pressão (14,3 mPa) resultou em d_{32} menores que 2 μm , mas ainda são valores altos quando comparadas com proteínas com boa capacidade emulsificante, como a proteína de soja (AGBOOLA; NG; MILLS, 2005; WANG et al., 2012).

5.2.6. Propriedades espumantes

Apenas as proteínas do CPA foram capazes de formar espuma nas condições testadas (Figura 17).

Em pH 4,8, pI da orizenina, as proteínas do arroz têm a menor solubilidade. O CRA em pH 9, apesar da solubilidade ser relativamente maior que no pH 4,8 não houve formação de espuma, o que leva a acreditar que a concentração de proteínas solúveis foi fator determinante na capacidade de formação de espuma, como foi demonstrado nos estudos com concentrado proteico de arroz (HOU; ZHU; LI, 2010) e ovoalbumina (FRANCO et al., 2015).

A densidade da espuma é uma propriedade muito importante por ter influência na estabilidade, pois menores densidades são mais favoráveis

a esta (FRANCO et al., 2015). A densidade das espumas formadas nas soluções de concentrado proteico de orizenina em pH 2 foram iguais ($p > 0,1$), ou seja, o tratamento de sonicação não afetou esta propriedade (Tabela 18). Em soluções de proteína da clara do ovo com concentração de 0,3 % pode-se chegar até $0,118 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e a fração volumétrica de ar a 0,89 (PTASZEK et al., 2015), uma evidência de que o concentrado proteico de orizenina não possui boa capacidade de formação de espuma. Proteínas conhecidas por sua capacidade de formação de espuma, caseína e ovoalbumina, em pH 2 são instáveis ou não exibem capacidade de formação de espuma (NARSIMHAN, 2000).



Figura 17 - Aspecto das espumas formadas pelo CPA (A) e CPA_S (B) em pH 2.

A fração volumétrica de ar incorporado na espuma é inversamente proporcional a densidade das espumas. Espumas mais densas contêm mais umidade, incorporam menos ar e são menos estáveis. O concentrado proteico de orizenina atingiu um valor máximo de 0,15. A relação entre fração volumétrica de ar e expansão da espuma é diretamente proporcional. Proteínas com boa capacidade de formação de espuma, como a proteína da clara do ovo, atingem uma expansão maior que 100 % (PTASZEK et al., 2015).

Tabela 18 - Densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), fração volumétrica de ar (ϕ) e expansão da espuma (%) das espumas formadas com CPA em pH 2.

	<i>Densidade</i> <i>($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)</i>	<i>Fração</i> <i>volumétrica de</i> <i>ar (ϕ)</i>	<i>Expansão da</i> <i>espuma (%)</i>
CPA	0,88 \pm 0,05	0,11 \pm 0,05	13,53 \pm 6,95
CPA_S	0,84 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00	18,98 \pm 0,53

CPA – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA; CPA_S – Concentrado proteico obtido pelo protocolo Precipitação por TCA sonicado

A formação de espuma também depende da atividade interfacial das proteínas. A tensão interfacial depende da solubilidade na fase aquosa das proteínas, por meio da qual a espuma é formada, de forma que elas adsorvam na superfície das bolhas. A diminuição desta tensão permite a encapsulação e retenção do ar com gasto menor de energia. No entanto, pode ser possível que proteínas menos solúveis sejam transportadas para a interface através da mistura (WILDE, 2003).

É importante para a panificação que durante certas etapas do processamento quando as bolhas de gás se aproximam, elas permaneçam estáveis como ocorre em uma espuma. Caso contrário, as bolhas de gás coalescem e a massa vai colapsar. A habilidade da rede de glúten para suportar as bolhas de gás é muito importante e quando ausente deve ser substituída por agentes que estabilizem essa estrutura (WILDE, 2003).

5.2.7. Conclusão parcial

Os protocolos de extração de orizenina utilizados neste estudo produziram concentrados proteicos com maior concentração de orizenina.

O protocolo de extração mais rápido (RA), foi aquele com maior rendimento de extração e maior teor de proteínas total. O protocolo ES teve o pior desempenho em relação aos outros dois, principalmente em relação ao teor de proteínas total tornando inviável o uso dos extratos na caracterização funcional.

A interação dos fatores concentrado proteico (CRA e CPA), o tratamento de sonicação e o pH do meio produziram diferenças significativas nas propriedades emulsificantes e espumantes. A ação da sonicação, neste caso, ainda é desconhecida e deve ser investigada mais a fundo para verificar possíveis modificações na estrutura da proteína e consequências nas propriedades técnico-funcionais.

As proteínas dos concentrados proteicos de orizenina obtidos neste estudo apresentaram características pouco adequadas quanto a solubilidade, capacidade emulsificante e de formação de espuma para aplicação em alimentos.

5.3. Caracterização de massas sem glúten formuladas com farinha de arroz

5.3.1. Propriedades de textura (TPA)

O perfil de textura das massas de pão a base de farinha de arroz tivera seus modelos de regressão ajustados. As equações e os coeficientes de determinação de cada um estão na Tabela 19.

A dureza foi afetada diretamente pelos três fatores estudados. A temperatura (TMP) foi menos significativa que a adição de ETG, de CPO, e que interação ETG X CPO.

Tabela 19- Equações de regressão e coeficientes de determinação (R²) das propriedades obtidas por meio do teste TPA das massas não fermentadas.

<i>Variáveis</i>	<i>Equação</i>	<i>R²(%)</i>
Dureza (g)	- 2178,80+114,13CPO+64,96TMP+445,45ETG - 11,26ETGTMP	54,30
Adesividade (g.s)	-1502 + 72,1TMP - 0,878TMP ²	30,64
Elasticidade	0,1766 - 0,001891TMP	36,56
Mastigabilidade	22,86 - 3,36CPO - 0,315TMP + 0,624CPO ²	49,58
Gomosidade	- 352 + 18,20 CPO + 68,6 ETG + 10,09 TMP – 1,698 ETGTMP	48,89
Coesividade	-0,97+0,05TMP+0,049CPO+0,01ETG-6,24x10 ⁻⁴ TMP ² -4,47x10 ⁻⁴ CPOTMP-4,28x10 ⁻³ CPO ² - 4,46x10 ⁻⁵ ETGTMP-6,23x10 ⁻⁴ ETGCPO- 3,73x10 ⁻⁴ ETG ²	96,44
Resiliência	0,05 + 2,34x10 ⁻³ CPO	19,36

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina.

A dureza da massa aumentou com o incremento do teor de ETG, sendo provavelmente devido à formação de ligações cruzadas com as proteínas, aumentando o tamanho dos polímeros e retendo mais água em sua

estrutura. A Figura 18 mostra que a adição de CPO potencializa o efeito da ETG.

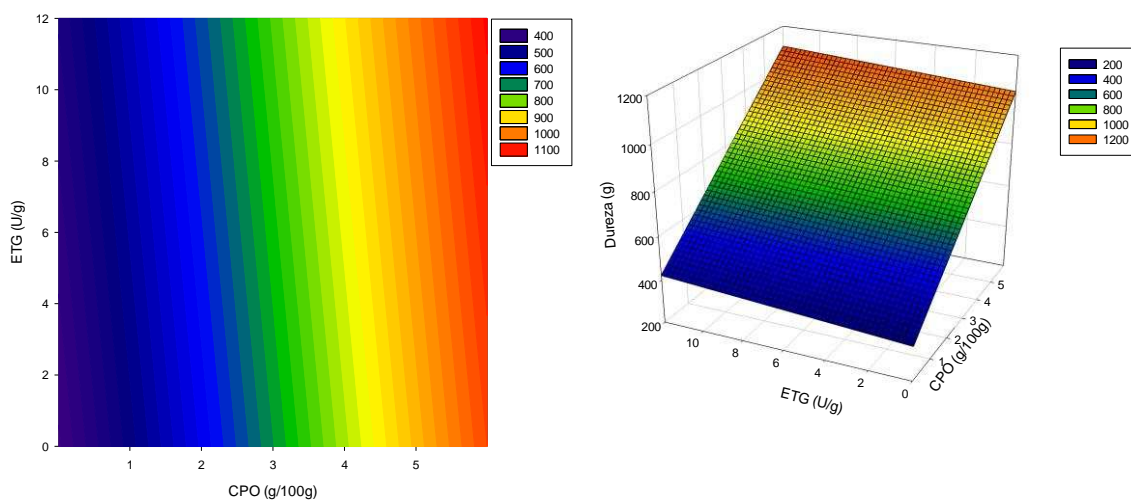


Figura 18 - Gráfico de contorno e de superfície de resposta do efeito de ETG (U/g de proteína) e CPO (g/100 g de farinha) na dureza (g) das massas de pão a base de farinha de arroz.

Algumas correlações entre outras propriedades de textura e a dureza foram encontradas ($p < 0,01$); gomosidade (0,922) e mastigabilidade (0,880) estão fortemente correlacionadas, dado que a dureza é um componente da determinação da gomosidade (coesividade x dureza) e, conseqüentemente, da mastigabilidade (elasticidade x gomosidade) (ARMERO; COLLAR, 1997).

A adesividade, de acordo com o modelo de regressão, sofreu influência significativa ($p < 0,1$) da temperatura de mistura das massas. Ao analisar os resultados a atenção se volta para o amido que tem suas propriedades afetadas pelo calor. O teor presente na massa e a sua gelatinização estão relacionados com a adesividade.

Quando os grânulos de amido são imersos em água, na temperatura ambiente, eles incham ao absorver por volta de 20% de água e

isto é reversível. A hidratação e inchamento das regiões amorfas, são favorecidas pelo aumento de temperatura, diminuem a disponibilidade de água na massa e a fase amorfa é “plastificada” (BEMILLER; WHISTLER, 2009). A redução da adesividade da massa, que ocorre até a temperatura de 41 °C, pode ser consequência desse fenômeno.

Ao aumentar a temperatura e a incorporação de água na fase amorfa aumenta-se a distância entre as cadeias de amido, permitindo a lixiviação da amilose. Considerando que as moléculas menores de amilose são as primeiras a serem lixiviadas levando a uma mudança de textura na massa, a adesividade vai aumentar (BEMILLER; WHISTLER, 2009). Em macarrão, por exemplo, a adesividade também é mais alta nas fases iniciais do cozimento e menor no ponto ideal de cocção (SOZER; DALGIÇ; KAYA, 2007).

Na Figura 19, observa-se o comportamento da adesividade com o aumento da temperatura de mistura das massas. Embora o teor de amido danificado não tenha sido quantificado na farinha de arroz utilizada, em farinhas com granulometria semelhante a utilizada neste trabalho pode ocorrer até 20 % de amido danificado dependendo do processo de moagem (NISHITA; BEAN, 1982). Nos grânulos danificados, o processo descrito anteriormente, pode ocorrer em temperaturas relativamente baixas como as temperaturas utilizadas neste estudo.

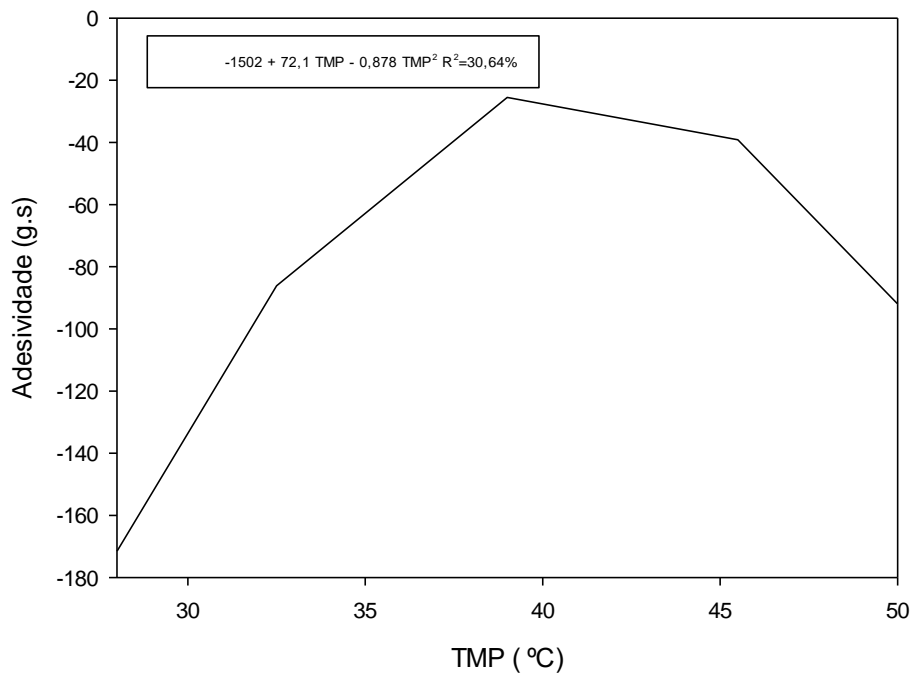


Figura 19 – Variação da adesividade em função da temperatura de mistura (TMP) da massa de pão a base de farinha de arroz.

A enzima transglutaminase pode atuar na diminuição da adesividade em conjunto com outras proteínas, como a caseína e albumina, em massas sem glúten, mas no presente trabalho ETG e CPO não tiveram efeito significativo (STORCK et al., 2013).

A adesividade tem grande impacto na maquinabilidade da massa. Uma menor adesividade facilita o manuseio da massa em equipamentos para panificação (ARMERO; COLLAR, 1997). A diminuição desta propriedade é importante para a indústria e a temperatura de mistura pode ser útil para as massas sem glúten.

A elasticidade das massas de farinha de arroz foi outra propriedade de textura influenciada ($p < 0,01$) pelo fator temperatura de mistura. Na Figura 20 é possível ver que a relação entre os dois é linear.

A elasticidade é definida como a porcentagem de recuperação da massa após deformação (ARMERO; COLLAR, 1997). Se o tempo entre as

compressões é longo o suficiente para eliminar a tensão da massa, imediatamente antes da segunda compressão pela sonda, uma força positiva será gravada e a elasticidade será próxima de 100 % (ARMERO; COLLAR, 1997; MARCO; ROSELL, 2008b). Para massas de pão a elasticidade deve ser considerada uma consequência do descanso e da viscoelasticidade da massa no início da segunda compressão.

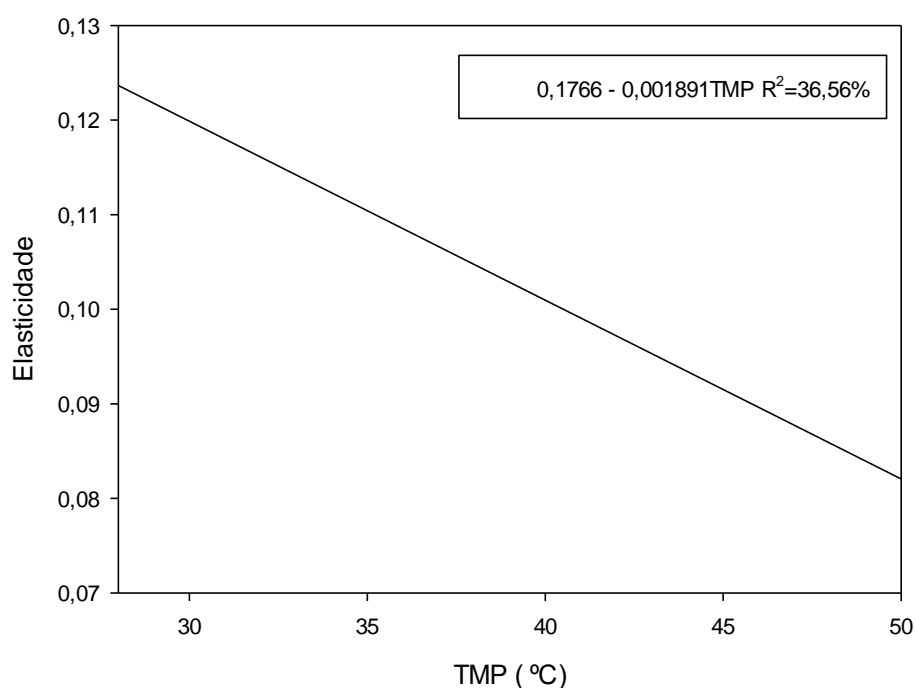


Figura 20 – Variação da elasticidade em função da temperatura de mistura (TMP) da massa de pão a base de farinha de arroz.

Existe pouca variação da elasticidade das formulações e este valor é baixo se comparado com a elasticidade próxima a 1 em um estudo com isolados proteicos de soja e ervilha que produziram massas de farinha de arroz com alta elasticidade ao aumentar o teor de proteínas, mas sem alterar a temperatura de mistura (MARCO; ROSELL, 2008b).

Segundo Brites e colaboradores (2010) a propriedade elasticidade está positivamente associada aos fenômenos de gelatinização e

retrogradação. A temperatura, neste caso, desempenha um papel importante na elasticidade das massas de farinha de arroz.

De acordo com os resultados houve uma tendência da elasticidade diminuir com o aumento de temperatura (Tabela 20). De fato, no intervalo de temperatura testado não ocorre uma gelatinização, mas o aumento de temperatura poderia iniciar uma mudança na textura da massa devido ao inchamento dos grânulos de amido e lixiviação da amilose.

A elasticidade da massa também está correlacionada com a coesividade e a dureza, quanto mais macia e mais coesa a massa, melhor a recuperação após compressão (MARCO; ROSELL, 2008b), levando à hipótese de que nas formulações testadas o calor influenciou negativamente na elasticidade ao aumentar a dureza da massa. A massa misturada à 28 °C sem adição de CPO e ETG, neste estudo, apresentou maior elasticidade que as demais.

Tabela 20- Valores das variáveis de textura obtidos por meio de teste TPA para as massas de pão a base de farinha de arroz.

<i>Fatores</i>		<i>Variáveis</i>						
Tratamentos	TMP (°C)	ETG (U/g de proteína da farinha de arroz)	CPO (g/100g de farinha de arroz)	Dureza (g)	Adesividade (g/s)	Elasticidade	Coesividade	Resiliência
controle	28,00	0,00	0,00	340,40	-357,93	0,37	0,40	0,04
1	45,50	2,43	4,80	373,17	-23,00	0,09	0,14	0,05
2	39,00	12,00	3,00	212,95	-31,80	0,13	0,17	0,05
3	39,00	6,00	6,00	999,95	-5,93	0,10	0,15	0,07
4	32,50	2,43	1,20	471,87	-72,27	0,11	0,14	0,05
5	32,50	9,60	4,80	1035,20	-23,70	0,10	0,14	0,06
6	39,00	6,00	3,00	588,40	-1,50	0,10	0,12	0,06
7	45,50	2,43	1,20	966,23	-177,85	0,08	0,14	0,07
8	45,50	9,60	1,20	334,75	-75,80	0,11	0,15	0,05
9	32,50	9,60	1,20	1303,30	-12,95	0,09	0,14	0,07
10	39,00	0,00	3,00	288,70	-10,80	0,10	0,13	0,04
11	39,00	6,00	0,00	323,90	-89,95	0,11	0,15	0,05
12	39,00	6,00	3,00	437,35	-42,40	0,11	0,15	0,06
13	32,45	2,43	4,80	778,35	-48,57	0,11	0,16	0,06
14	28,00	6,00	3,00	368,90	-276,10	0,16	0,18	0,06
15	50,00	6,00	3,00	293,45	-4,20	0,08	0,12	0,05
16	45,50	9,60	4,80	452,40	-15,25	0,09	0,16	0,06

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina.

Uma massa mais elástica é importante para o manuseio nas mãos e principalmente nos equipamentos. Assim como na adesividade temperaturas mais altas tem efeito antagonista. Deve-se investigar mais a fundo a influência do CPO, devido ao potencial que concentrados proteicos tem no aumento da elasticidade já demonstrados em outros trabalhos.

Gomosidade e mastigabilidade são propriedades que dependem da dureza, elasticidade e coesividade e descrevem a sensação na boca que o alimento produz. As massas não são consumidas antes do assamento e, portanto, não são relevantes neste estudo.

A resiliência é a área formada no perfil durante a retirada da penetração, dividida pela área da primeira penetração, representando a energia absorvida pela massa. Os resultados de resiliência estão correlacionados ($p < 0,01$) com a dureza (0,873) das massas de farinha de arroz. O aumento do teor de concentrado proteico pode aumentar a resiliência das massas. Na prática isso também ajudaria na manipulação das massas e do uso de equipamentos sem comprometer formato e tamanho das peças.

A coesividade significa o quão bem a amostra resiste a uma segunda deformação em relação a sua resistência à primeira deformação. Esta propriedade em massas de farinha de trigo é um bom indicador da qualidade dos pães.

Neste trabalho, o CPO afetou a coesividade, assim como TMP e ETG. A avaliação da equação de regressão e dos gráficos mostra que a interação significativa ($p < 0,1$) entre os fatores, levou a coesividade a atingir um valor máximo de 0,1. Isso ocorreu para a temperatura de mistura de aproximadamente 40 °C, teor de ETG de aproximadamente 9,7 U/ g de

proteína na farinha de arroz e 2,9 g de CPO por 100g de farinha de arroz (Figura 21).

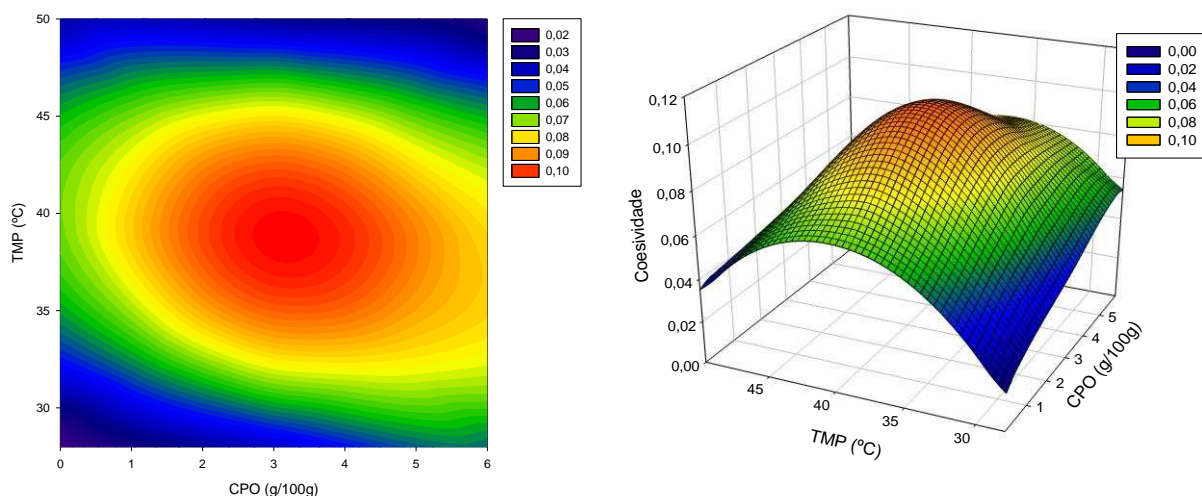


Figura 21 - Gráfico de contorno e superfície de resposta do efeito de ETG (U/g de proteína na farinha de arroz) e CPO (g/100 g de farinha) na coesividade das massas de farinha de arroz.

Em massas de farinha de arroz, a coesividade pode ser afetada pelo teor de proteína de soja, como foi reportado por Marco e Rosell (2008). As massas mais duras, com maior teor de proteína, sofreram danos permanentes, na estrutura interna, maiores que as massas mais leves submetidas a mesma deformação.

A coesividade tem correlação ($p < 0,1$) com características dos pães, como a firmeza de miolo dos pães no dia do processamento (0,422) e após 24h de armazenamento (0,586). A dureza também está correlacionada com a firmeza de miolo após 48h (-0,487), perda de massa (-0,542) e volume específico (- 0,496).

Assim, as propriedades de textura das massas de farinha de arroz, como das massas de farinha de trigo, mostram-se boas preditoras das características de qualidade dos pães. Investigar outros níveis das variáveis

significativas e buscar técnicas de medição dessas propriedades de textura que levem a resultados mais precisos e mais próximos das características adequadas para panificação é de extrema importância.

5.3.2. Propriedades reológicas

O comportamento das massas submetidas ao teste de varredura de frequência em reômetro de tensão controlada mostrou semelhanças aos reportados na literatura durante estudos reológicos dinâmicos para massas sem glúten (GUJRAL; ROSELL, 2004; SIVARAMAKRISHNAN; SENGE; CHATTOPADHYAY, 2004; MARCO; ROSELL, 2008b; PRUSKA-KĘDZIOR et al., 2008; RONDA et al., 2013; TURKUT et al., 2016). Na Tabela 21 são apresentados as equações de regressão e os respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Tabela 21 - Equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2) da tangente δ , G' e do G'' a 1 Hz.

<i>Variável</i>	<i>Equação</i>	<i>R²(%)</i>
G'	$3,63 \times 10^5 + 1,55 \times 10^5 \text{CPO} + 1,19 \times 10^5 \text{ETG} - 3,95 \times 10^4 \text{CPOETG}$	30,56
G''	$7,00 \times 10^5 - 3,55 \times 10^5 \text{CPO} + 4,90 \times 10^4 \text{CPOCPO}$	36,68
Tan δ	$1,88 - 0,24 \text{CPO} - 0,19 \text{ETG} - 0,026 \text{TMP} + 0,02 \text{CPO}^2 + 0,012 \text{CPOETG} + 0,0034 \text{TMPETG}$	78,41

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina

As características reológicas da massa são fatores essenciais para determinação da qualidade dos pães. Massa de pão é viscoelástica e exibe características elásticas e fluidas (BELTON; ANGLIA, 2003). As massa de pão sem glúten, inclusive a formulação controle, podem ser caracterizadas como géis macios ou sólidos viscoelásticos com o módulo elástico (G') maior que o módulo viscoso (G'') (SANZ; SALVADOR; FISZMAN, 2007; ZIOBRO et al., 2013). A Figura 22 é um reograma da

formulação controle que ilustra o comportamento típico das massas durante o teste oscilatório, onde $G' > G''$ e $\tan \delta < 1$ na frequência de 1Hz, característico de géis macios e fracos.

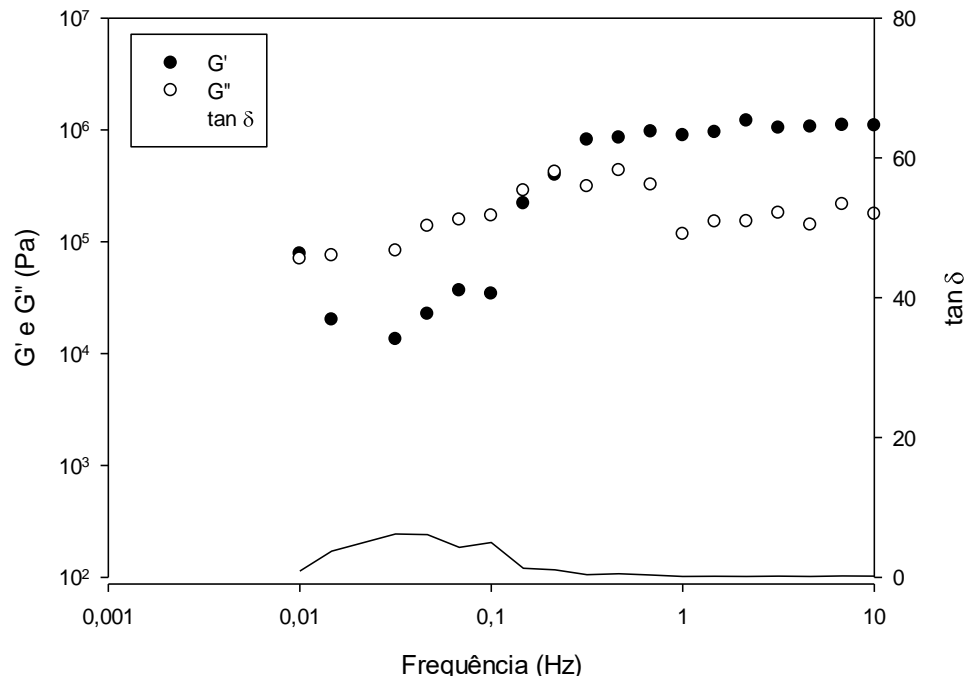


Figura 22 - Perfil reológico de massa para pão a base de farinha de arroz sem adição de concentrado proteico e enzima transglutaminase misturada a 28 °C.

O fator concentrado proteico de orizenina juntamente com a enzima transglutaminase são os mais relevantes ($p < 0,1$) para explicar a variação dos módulos de G' e G'' medidos na frequência de 1 Hz, valor de frequência adotado e escolhido de forma totalmente eventual (THOMAS; ZAIKOV, 2010).

Aumento e redução do teor de orizenina e ETG concomitantemente, diminuíram o módulo elástico G' nas condições testadas. Porém, quando a concentração dos dois aumenta isoladamente uma tendência no aumento deste módulo ocorreu. Isto é um indicativo de fortalecimento da massa de farinha de arroz. Considerando que pela ação da ETG as proteínas da massa sofreram modificações pela formação de ligações

cruzadas e aumento da massa molar, houve um aumento da interação com a água e aumento da resistência da massa.

Quanto a interação entre os dois fatores ETG e CPO, houve diminuição do módulo elástico mostrando que as massas sofreram um enfraquecimento da estrutura, provavelmente a quantidade de água foi insuficiente para quantidade de CPO e enzima adicionados e uma provável interrupção da estrutura da massa por amido e proteínas não completamente hidratados. O gráfico de contorno ilustra a interação CPO e ETG (Figura 23). A temperatura de mistura não teve efeito significativo ($p > 0,1$) nesta resposta.

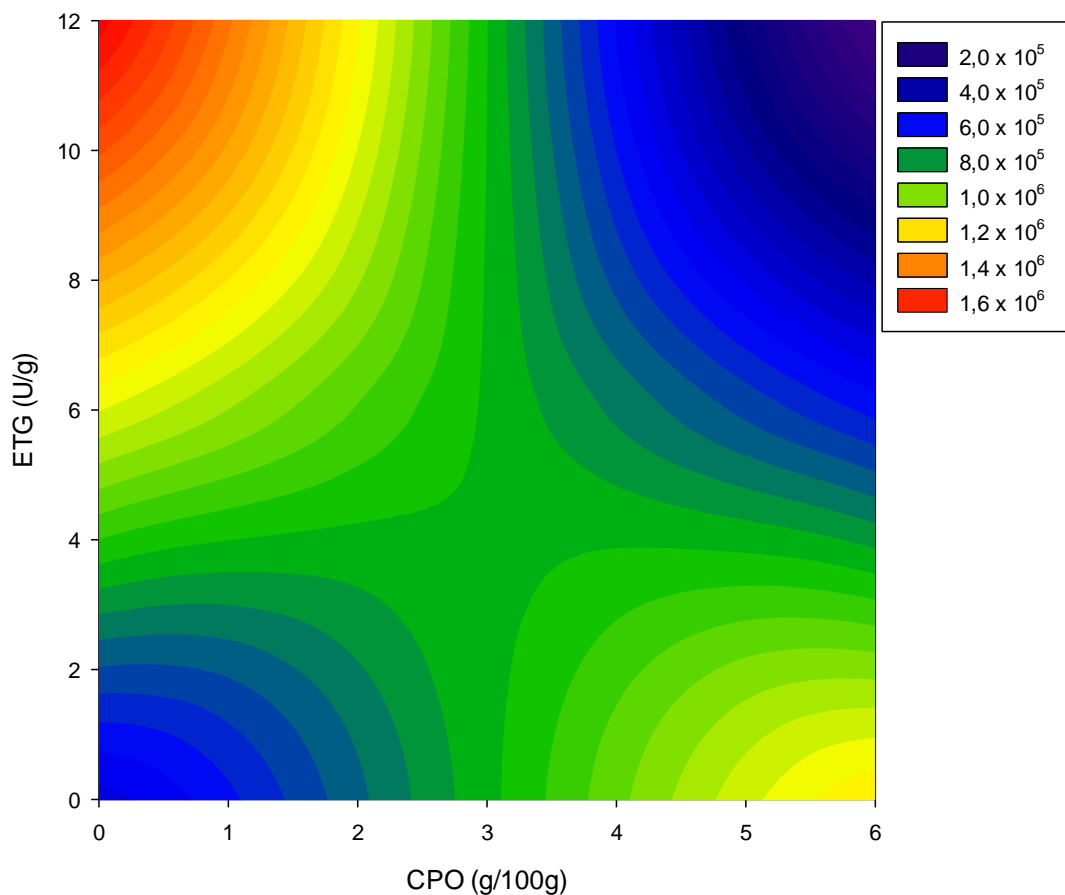


Figura 23- Gráfico de contorno da superfície de resposta do módulo G' a 1 Hz das formulações de massas de pão a base de farinha de arroz em função de CPO e ETG.

Massas de farinha de trigo quando submetidas ao mesmo teste, com absorção de água por volta de 60 %, alcançaram a magnitude de 10^4 para G' a 1 Hz quando se fez uso de farinha não adequada para panificação e 10^3 para farinha adequada (SKENDI; PAPAGEORGIOU; BILIADERIS, 2010; MACHADO, 2012). Em massas de farinha de arroz adicionadas da protease ciclodextrina foi observada queda do módulo elástico e da consistência da massa, efeito da modificação na estrutura das proteínas, sem aumento da massa molar e absorção de água (GUJRAL et al., 2003). Massa para pão sem glúten com 90% de água na formulação são capazes de produzir um efeito semelhante às massas de farinha de trigo com 60% para G' a 1 Hz (GUJRAL et al., 2003). Há uma tendência de queda do módulo G' em menores concentrações de ETG e CPO que deve ser investigada em outros níveis em busca de otimização das variáveis.

Para o módulo viscoso (G''), de acordo com o modelo ajustado quadrático (Tabela 21), o fator CPO é o mais importante para explicar sua variação. Embora o coeficiente de determinação seja relativamente baixo podemos inferir que há um limite para adição do CPO e é o ponto mínimo localizado em 3,62 g/100g de CPO (Figura 24). Estatisticamente, quando o objetivo é avaliar como mudanças nos fatores influenciam nas respostas e se eles são significativos, um valor baixo de R^2 não interfere nesta interpretação (FROST, 2014). Uma massa de farinha de trigo com boa qualidade para panificação atinge valores entre 10^4 e 10^3 e com a mesma tendência de crescimento observada na frequência de G' , mas com valores inferiores. Para atingir valores menores que os observados, que variam entre 10^4 e 10^5 , o teor de CPO deveria estar entre 3 e 4 g/100g de farinha de farinha de arroz.

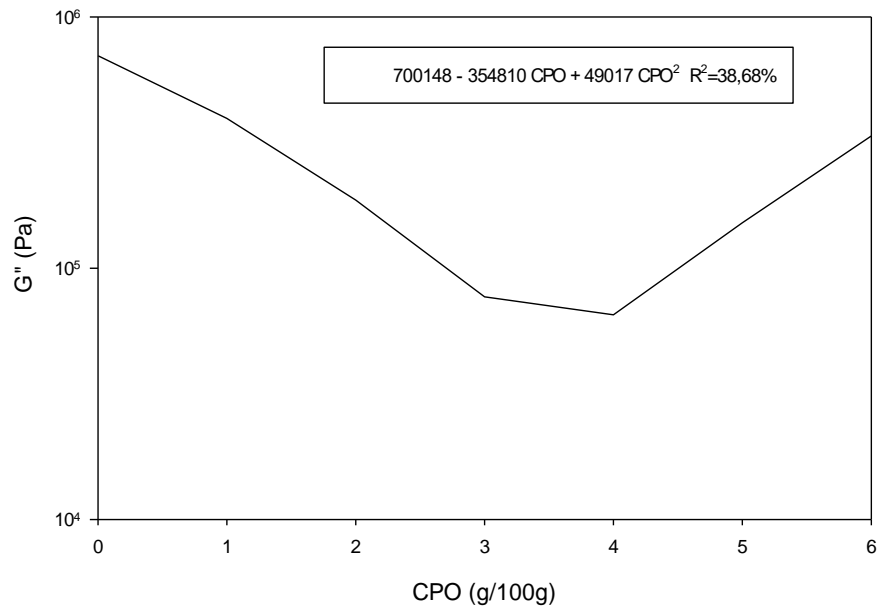


Figura 24 – Variação de G'' a 1 Hz de massa de farinha de arroz em função de CPO (g/100g de farinha de arroz).

A equação de regressão de $\tan \delta$ a 1 Hz (Tabela 21) diferentemente das duas anteriores inclui o fator temperatura de mistura (TMP), mas ainda assim este não é o fator mais significativo do modelo.

A $\tan \delta$ na frequência de 1 Hz varia entre 0,022 e 0,8112 (Tabela 22) o que é característico de sistemas conhecidos como géis fracos e são semelhantes com observações em massas sem glúten com adição de concentrados e isolados de proteínas como albumina e proteína de soja (ZIOBRO et al., 2013).

Tabela 22- Valores de G', G'' e tan δ a 1 Hz para massas sem glúten a base de farinha de arroz.

<i>Fatores</i>				<i>Variáveis</i>		
Tratamentos	TMP (°C)	ETG (U/g de proteína da farinha)	CPO (g/100g de farinha de arroz)	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tan δ
Controle	28,00	0,00	0,00	890800	116900	0,1312
1	45,50	2,40	4,80	421700	57150	0,1355
2	39,00	12,00	3,00	784500	17250	0,0220
3	39,00	6,00	6,00	918100	118100	0,1286
4	32,50	2,40	1,20	1457000	1064000	0,8112
5	32,50	9,60	4,80	660900	112800	0,1707
6	39,00	6,00	3,00	1057000	135800	0,1285
7	45,50	2,40	1,20	464900	116600	0,2508
8	45,50	9,60	1,20	363000	66230	0,1825
9	32,50	9,60	1,20	1083000	157500	0,1454
10	39,00	0,00	3,00	1078000	354900	0,3292
11	39,00	6,00	0,00	1487000	632400	0,4253
12	39,00	6,00	3,00	694800	94060	0,1354
13	32,50	2,40	4,80	1529000	351300	0,2298
14	28,00	6,00	3,00	524900	20050	0,0382
15	50,00	6,00	3,00	621600	14670	0,0236
16	45,50	9,60	4,80	188600	38110	0,2021

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina; G': módulo elástico; G'': módulo viscoso e Tan δ :

tangente do ângulo de fase.

Como as massas de pão necessitam de um equilíbrio entre propriedades elásticas (formação de filme e retenção de gás) e viscosas (adsorção de proteínas na interface e flexibilidade para expansão de gás) a $\tan \delta$ pode ser investigada como marcador de performance (LAZARIDOU et al., 2007). Assim como nas respostas anteriores, teores maiores de CPO e ETG podem induzir resultados mais próximos de massas mais adequadas para panificação (Figura 25). A farinha de trigo apresenta valores entre 0,2 e 0,5 dependendo do variedade do trigo e qualidade da proteína (SHEWRY; HARDT; BOOM; VAN DER GOOT, 2014).

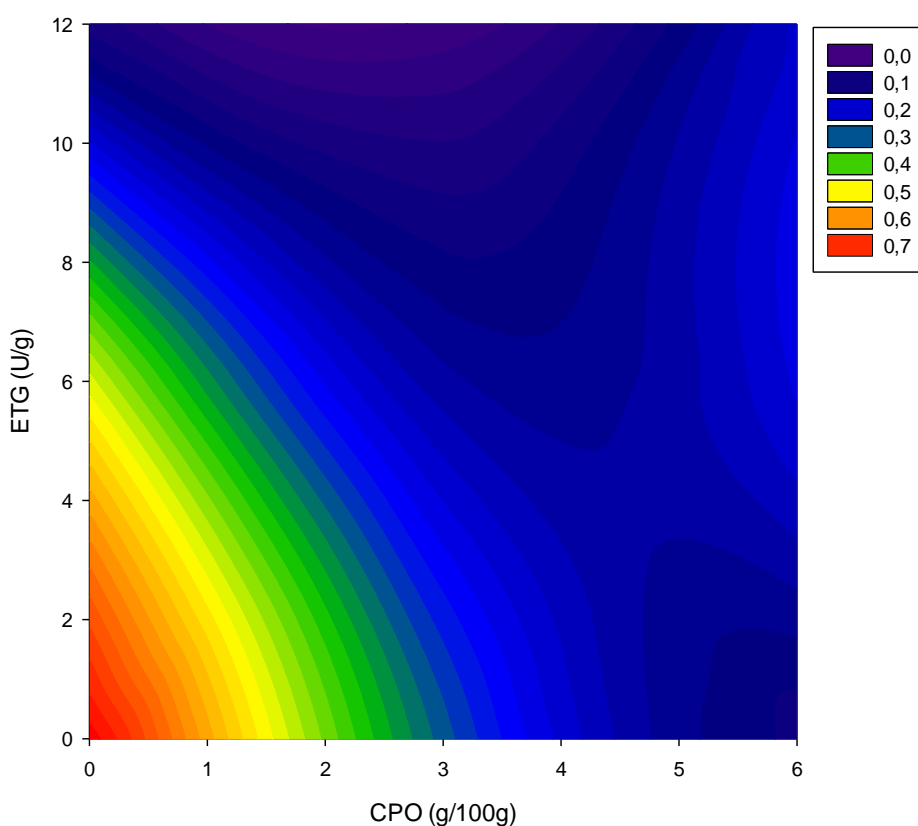


Figura 25 – Gráfico do contorno da superfície de resposta para $\tan \delta$ (1 Hz) em função de ETG (U/g de proteína da farinha de arroz) e CPO (g/100g de farinha de arroz).

5.3.3. Propriedades térmicas

Temperaturas associadas a gelatinização (inicial e de pico), variação da temperatura de gelatinização ($\Delta T = T_f - T_o$) e entalpia (ΔH), neste estudo, foram influenciados pelos fatores CPO, ETG e TMP. Para investigar as possíveis mudanças que possam ocorrer nas massas devido a adição de orizenina, uso de enzima transglutaminase e mudanças na temperatura de mistura, a faixa de temperatura de gelatinização (ΔT) e a variação de entalpia (ΔH) foram avaliadas.

Os modelos de regressão foram ajustados para as respostas medidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) com o objetivo de caracterizar a gelatinização do amido nas massas (Tabela 23).

Tabela 23 - Equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2) para as variáveis T_o (°C), T_p (°C) ΔT (°C) e ΔH (J/g) nas massas de pão fermentadas.

<i>Variável</i>	<i>Equação</i>	<i>R² (%)</i>
T_o (°C)	$49,29 + 2,047ETG + 0,279TMP - 0,0420ETGTMP$	64,29
T_p (°C)	$62,5 + 0,293ETG$	27,70
ΔT (°C)	$79,6 - 3,84CPO - 4,577ETG - 2,344TMP + 0,0925ETG^2 + 0,02047TMP^2 + 0,0956CPOTMP + 0,0789ETGTMP$	83,92
ΔH (J/g)	$2,841 - 0,239ETG - 0,0505TMP + 0,00494ETGTMP$	63,25

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina; T_o : temperatura inicial; T_p : temperatura de pico; ΔT : faixa temperatura de gelatinização e ΔH (J/g): entalpia de gelatinização.

As temperaturas de transição do amido de arroz dependem da variedade e do teor de amilose/amilopectina, teor de água e outras condições, mas em média a temperatura inicial (T_o) é de 64 °C, a temperatura de pic o (T_p) é 68 °C, a temperatura final (T_f) é de 74 °C e entalpia (ΔH) de 10 J/g (GALLAGHER, 2009). Nas farinhas de arroz a gelatinização ocorre em temperaturas maiores e entalpia menor que as observadas. Nas massas de

pão e na farinha de arroz, além do amido temos outros biopolímeros importantes, como as proteínas e lipídeos que afetam a absorção de água das amostras para atingir a consistência desejada e alteram os parâmetros determinados via DSC (MOREIRA; CHENLO; ARUFE, 2015).

A temperatura inicial de gelatinização, neste estudo, variou entre 59,07 °C e 66,46 °C e sofreu influência ($p < 0,1$) de TMP e ETG (Tabela 24). O aumento da temperatura de mistura (TMP) levou a um aumento de T_o quando não foi adicionada ETG na massa (Figura 26).

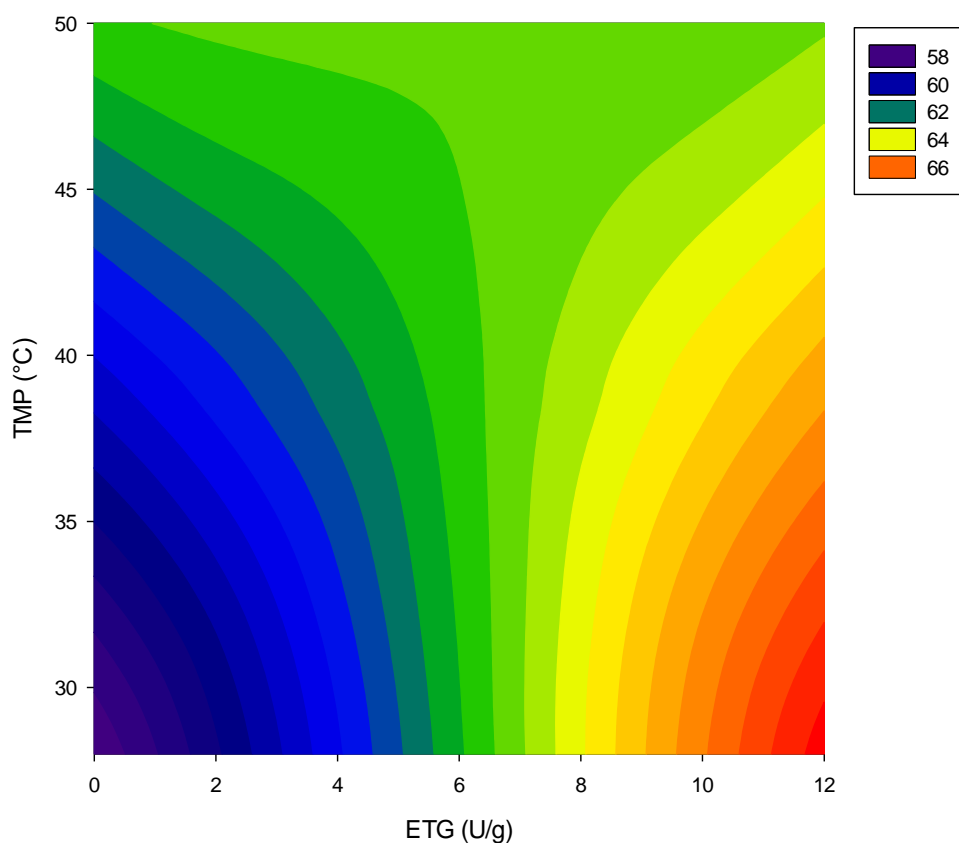


Figura 26- Gráfico de contorno da superfície de resposta para temperatura inicial de gelatinização (T_o) das massas de farinha de arroz em função de TMP e do teor de ETG.

Tabela 24 – Valores de temperatura inicial (T_0), temperatura de pico (T_p), variação da temperatura de gelatinização (ΔT), entalpia de gelatinização (ΔH) para massas sem glúten a base de farinha de arroz.

Tratamentos	Fatores			Variáveis			
	TMP(°C)	ETG (U/g de proteína na farinha de arroz)	CPO(g/100g de farinha de arroz)	T_0 (°C)	T_p (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
controle	28,00	0,00	0,00	63,94	64,97	18,26	-0,43
1	45,50	2,43	4,80	60,82	63,75	16,48	-0,58
2	39,00	12,00	3,00	66,46	70,56	14,78	-0,13
3	39,00	6,00	6,00	63,28	63,38	11,65	-0,38
4	32,50	2,43	1,20				
5	32,50	9,60	4,80	64,14	64,53	11,73	-0,55
6	39,00	6,00	3,00	63,47	64,54	12,77	-0,63
7	45,50	2,43	1,20	63,04	64,6	13,27	-0,60
8	45,50	9,60	1,20	61,83	63,16	14,07	-0,73
9	32,50	9,60	1,20	64,19	64,28	11,60	-0,45
10	39,00	0,00	3,00	59,07	62,27	18,98	-0,71
11	39,00	6,00	0,00	62,73	64,92	15,28	-0,57
12	39,00	6,00	3,00	63,56	64,78	13,82	-0,80
13	32,45	2,43	4,80	60,61	62,66	16,92	-1,08
14	28,00	6,00	3,00	62,46	63,6	15,94	-0,81
15	50,00	6,00	3,00	64,74	65,3	16,11	-0,24
16	45,50	9,60	4,80	61,89	62,6	17,04	-0,28

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina; T_0 : temperatura inicial; T_p : temperatura de pico; ΔT : faixa temperatura de gelatinização e ΔH : entalpia de gelatinização.

O efeito de ETG tem relação com a absorção de água do amido. A enzima ao promover ligações cruzadas pode aumentar a absorção de água pelas proteínas. Com menos água disponível, os grânulos de amido tem seu inchamento reduzido e a temperatura de gelatinização aumenta (BEMILLER; WHISTLER, 2009; AHMED; AL-ATTAR, 2015).

A temperatura (T_p) de pico foi considerada como a temperatura de gelatinização propriamente dita. O efeito de ETG nesta variável pode ser atribuído também com o aumento de absorção de água pela estrutura proteica.

A variação de temperatura (ΔT) foi avaliada para que se pudesse acompanhar o aumento ou diminuição do evento de gelatinização como um todo (Figura 27). Quando o teor de água é intermediário, o pico de fusão pode se fundir com o pico de gelatinização resultando em grande variação de temperatura, que neste estudo variaram de 22 °C a 12 °C. A medida que o teor de água diminui os eventos ficam mais distintos e a gelatinização e fusão ocorrem em temperaturas diferentes. A partir dessa variação espera-se prever como o processo de gelatinização vai acontecer e usar os resultados para formular as massas e dosar a quantidade de água necessária para que a massa asse corretamente.

Considerando que ao competir com o amido por água, as proteínas modificadas pela ação da ETG diminuíram a absorção do amido ocorreu ao mesmo tempo uma queda no ΔT , ou seja, o evento de gelatinização é mais curto já que não se confunde a fusão. Quando a temperatura de mistura aumentou também houve diminuição na faixa de temperatura de gelatinização, mas provavelmente porque a estrutura dos grânulos de amido

foi comprometida antes da massa ser assada. A TMP, neste estudo, influenciou ΔT e provavelmente pode influenciar o assamento das massas.

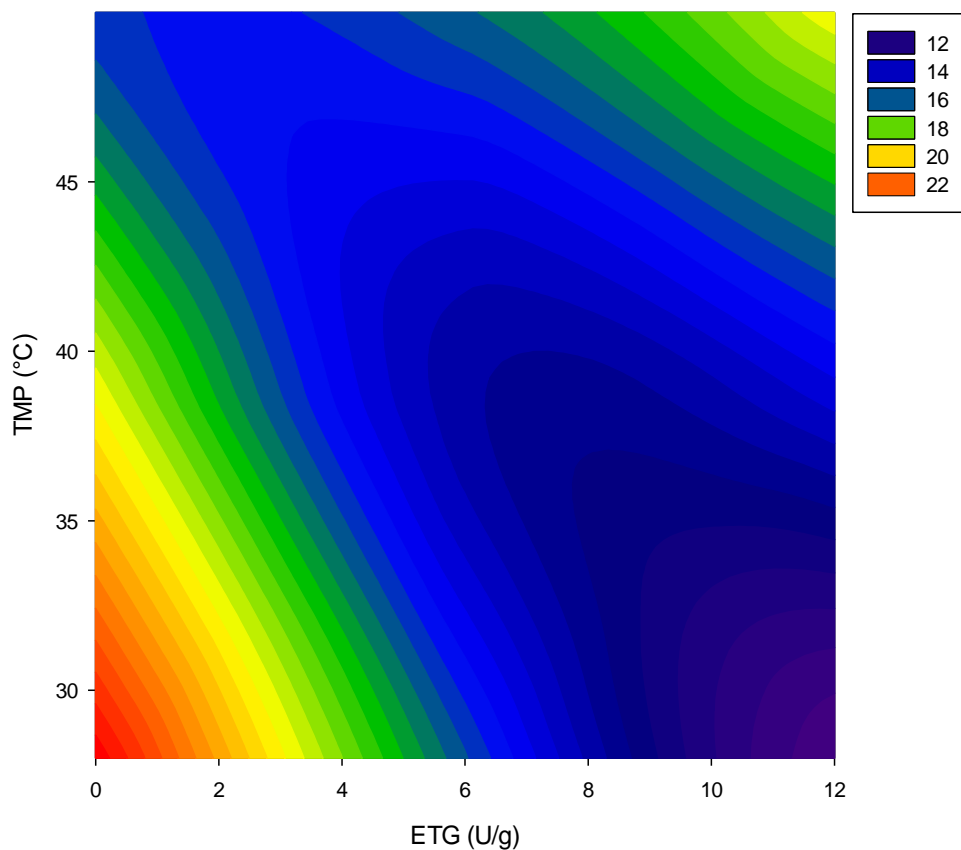


Figura 27- Gráfico de contorno da superfície de resposta para ΔT (°C) em função de ETG (U/g de proteína na farinha de arroz) e TMP (°C).

O CPO não é o fator mais significativo, mas sabendo que proteínas também podem interferir na absorção de água do amido (MOREIRA; CHENLO; ARUFE, 2015) a influência da orizenina pode ter sido mascarada pelos outros fatores. Isso deve ser investigado, considerando a importância desse evento para panificação e também o papel da água nesta resposta.

A entalpia de gelatinização é um valor líquido que corresponde a todos os eventos que compõe essa transição, ou seja, o inchamento do

grânulo de amido, fusão da região cristalina, hidratação e até recristalização (exotérmico) quando há lipídeos presentes.

A entalpia de gelatinização de todas as massas foi menor em relação a outras massas a base de farinha de arroz com teor de água semelhante (SCIARINI et al., 2012). A área do pico endotérmico caiu continuamente com o aumento da temperatura (Figura 28), como aconteceu em pão francês com o aumento do tempo de assamento (ROUILLÉ et al., 2010) e com o tempo de cozimento do macarrão (SOZER; DALGIÇ; KAYA, 2007) até desaparecer completamente.

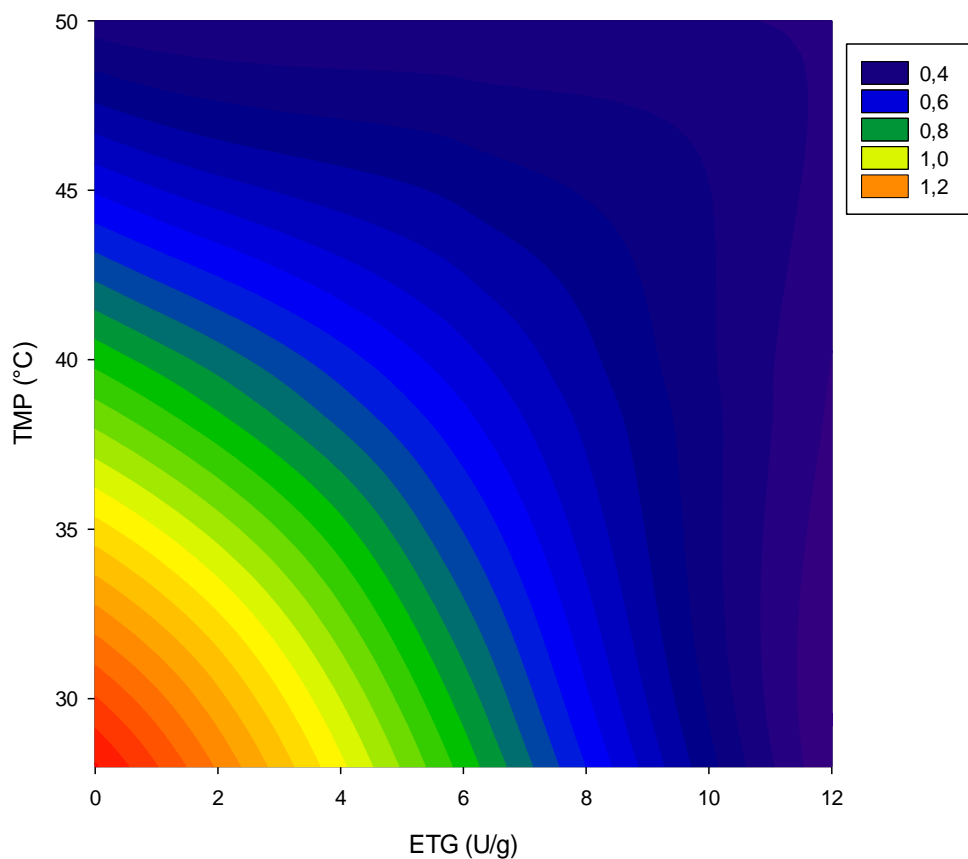


Figura 28- Gráfico de contorno da superfície de resposta para ΔH (J/g) em função de ETG (U/g de proteína da farinha de arroz) e TMP (°C).

Estes autores ponderaram que a energia para gelatinização do amido diminui porque os grânulos se tornam menos termoestáveis, ou seja, acontece uma “desorganização” na estrutura do grânulo.

As propriedades de gelatinização como as temperaturas de transição e entalpia são cruciais na determinação da textura e aparência dos pães sem glúten, porque o amido gelatinizado tem influência no volume da massa e do pão e na textura do miolo (GALLAGHER, 2009). A gelatinização deve ocorrer no tempo certo e na temperatura certa durante o assamento, mas pode ser afetada pelas mudanças na cristalinidade, composição química, presença de lipídeos, açúcares e fosforilação (ELIASSON, 2003). As alterações nas formulações com uso de TMP e ETG devem ser feitas com cautela.

5.3.4. Conclusão parcial

As massas de pão sem glúten a base de farinha de arroz são géis macios e fracos, característico de massas sem glúten.

Temperatura de mistura, concentrado proteico de orizenina e enzima transglutaminase influenciaram as propriedades térmicas, reológicas e de textura das massas.

As massas de farinha de arroz obtidas apresentaram características que podem se aproximar das massas de farinha de trigo em relação ao balanço de propriedades elásticas e viscosas.

As propriedades de textura apontam para uma facilidade de manipulação das massas por equipamentos. Uma característica importante para o processamento em maior escala.

O valor máximo de coesividade atingido ainda está distante do desejável para massas convencionais.

As alterações das formulações afetaram a gelatinização.

A adição de enzima transglutaminase e mudanças na temperatura de mistura podem comprometer o produto final.

As propriedades reológicas e de textura das massas tem potencial para predizer qualidade de pães sem glúten.

5.4. Caracterização de pães sem glúten formulados com farinha de arroz

5.4.1. Volume específico e perda de massa

O volume específico talvez seja a característica de qualidade mais valorizada em pães. Através dele pode-se inferir a respeito da qualidade da farinha, dos ingredientes utilizados, do processamento desde a mistura até o assamento.

O volume específico dos pães variou entre $1,53 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e $1,23 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Tabela 25). A equação de regressão ajustada ajuda na compreensão de quais fatores tiveram mais influência no volume específico (Tabela 26). Os resultados são semelhantes a pães de farinha de amaranto (SCHOENLECHNER et al., 2010b), não muito distante dos pães com hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e farinha de arroz com $1,80 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e longe do pão de farinha de trigo integral com $5,00 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (KADAN et al., 2001).

Pães de farinha de arroz com o dobro de água utilizados neste estudo também tiveram desempenho melhor que os aqui apresentados (LAZARIDOU et al., 2007).

Tabela 25- Valores para volume específico, perda de massa e firmeza de miolo depois do assamento (0h, 24h e 48h), para pães a base de farinha de arroz.

Tratamentos	Fatores			Variáveis				
	TMP (°C)	ETG (U/g de proteína na farinha de arroz)	CPO (g/100g de farinha de arroz)	Volume Específico (cm ³ /g)	Perda de massa (g)	Firmeza (g) (0h)	Firmeza (g) (24h)	Firmeza (g) (48h)
controle	28,00	0,00	0,00	1,40	2,39	686,93	2958,90	5269,83
1	45,50	2,43	4,80	1,14	2,07	500,48	2900,88	-
2	39,00	12,00	3,00	1,37	2,27	397,53	4256,30	-
3	39,00	6,00	6,00	1,43	2,26	491,83	2952,73	4934,63
4	32,50	2,43	1,20	1,23	2,19	341,53	3190,63	5466,23
5	32,50	9,60	4,80	1,34	2,36	449,35	2556,30	4199,33
6	39,00	6,00	3,00	1,29	2,30	291,73	1915,70	4800,50
7	45,50	2,43	1,20	1,29	2,07	809,15	3621,33	5212,25
8	45,50	9,60	1,20	1,39	2,09	473,17	3179,70	5420,33
9	32,50	9,60	1,20	1,42	2,01	541,43	2845,48	5487,70
10	39,00	0,00	3,00	1,38	2,17	459,47	2524,00	5042,30
11	39,00	6,00	0,00	1,53	2,31	594,13	3332,63	5911,85
12	39,00	6,00	3,00	1,23	2,16	521,90	1866,25	3608,53
13	32,50	2,43	4,80	1,26	1,91	790,70	3263,13	5097,53
14	27,99	6,00	3,00	1,46	2,17	627,65	2838,40	5755,27
15	50,00	6,00	3,00	1,39	2,40	370,80	1754,53	4224,80
16	45,50	9,60	4,80	1,37	2,21	592,57	2655,78	-

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina

Tabela 26- Equações dos modelos de regressão e coeficientes de determinação para as variáveis volume específico e perda de massa.

Variável	Equação	R²(%)
Volume (cm³·g⁻¹)	0,912 +0,0412CPO +0,0379 ETG + 0,00571TMP -0,01144CPOETG	64,04
Perda de massa (g)	2,060 + 0,2327CPO - 0,0368CPOCPO	35,82

TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina.

Pães sem glúten, de maneira geral, não tem o mesmo desempenho que os pães com farinhas que contém glúten. Pães a base de farinha de arroz tem menor volume específico, textura de miolo mais firme e maior tendência a retrogradação durante o armazenamento do que pães de farinha de trigo integral (KADAN et al., 2001).

Neste estudo acredita-se que a resistência da massa impediu a expansão durante a fermentação e assamento. Foi encontrada uma correlação negativa entre dureza da massa e volume específico (-0,496; $p < 0,05$).

Era esperado que o teor de ETG levasse a um aumento do volume específico (Figura 29), a escolha da enzima foi baseada em seu desempenho com proteínas de outros cereais. As ligações cruzadas promovidas pela transglutaminase resultam em uma estrutura capaz de sustentar a massa durante a fermentação e assamento (GUJRAL; ROSELL, 2004). Gujral e Rosell (2004b) encontraram um aumento no volume de pães de farinha de arroz na presença de transglutaminase e o maior volume obtido foi de 1,73 cm³·g⁻¹ e o controle sem transglutaminase teve desempenho semelhante ao controle do presente trabalho (1,47 cm³·g⁻¹).

O efeito de ETG no aumento do volume dos pães foi potencializado pelo aumento de TMP, tendência corroborada pela temperatura ótima para

atividade enzimática da transglutaminase que foi reportada como 50 °C (MOTOKI; KUMAZAWA, 2000).

A água tem uma influência direta nestas variáveis, em massas com teor maior de 90 % e com o mesmo teor de água utilizado neste trabalho foi encontrada uma correlação negativa entre resistência da massa e volume específico (RENZETTI; ARENDT, 2009; SCIARINI et al., 2012), mas em sistemas com 150% de água em relação a farinha de arroz houve uma redução do volume mesmo com redução de resistência (SCIARINI et al., 2010).

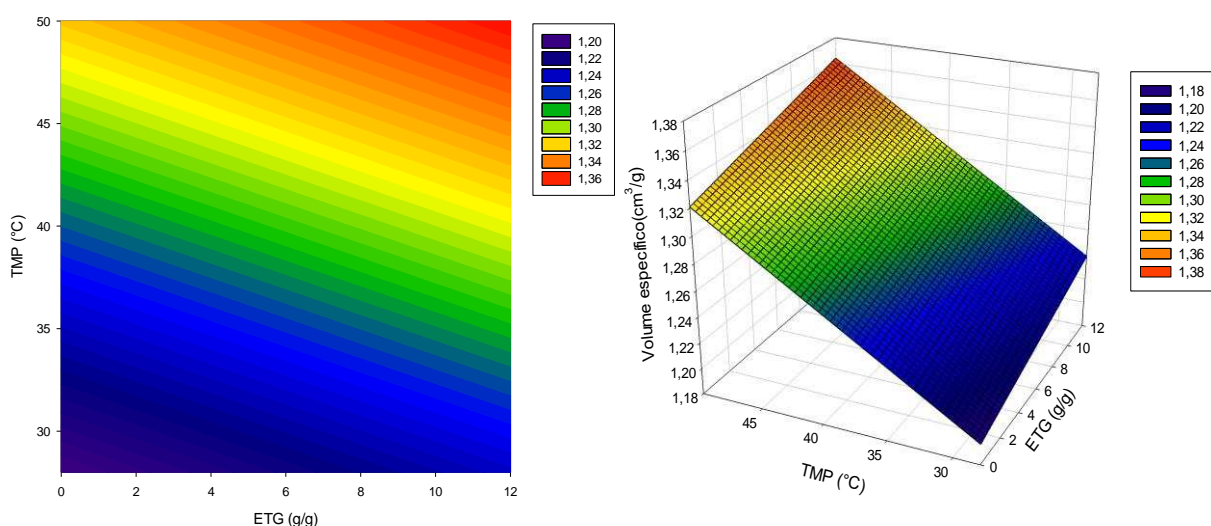


Figura 29- Gráfico de contorno e de superfície do efeito de ETG (U/g de proteína) e TMP (°C) no volume específico dos pães a base de farinha de arroz.

O fator CPO não produziu efeito significativo no volume específico, mas houve interação significativa com ETG ($p < 0,01$). A interação entre ETG e CPO, provavelmente deve envolver a orizenina. Proteínas do arroz e soja tiveram suas interações fortalecidas pela formação de ligações covalentes e também pela formação indireta de ligações dissulfídicas. Eletroforese indicou que na proteína de soja as principais frações envolvidas nas ligações

cruzadas foram β -conglucina e a glicina da soja e a orizenina da farinha de arroz, embora albuminas e globulinas também apresentarem ligações cruzadas (MARCO; ROSELL, 2008b).

Na Figura 30 é possível observar que o modelo de regressão para perda de massa aponta apenas CPO como fator significativo. As massas perderam por volta de 20 % - 24 % da massa inicial. Interessante observar que ao adicionar 3,16 g de concentrado proteico de orizenina para cada 100g de farinha de arroz atingiu-se um máximo de perda. Considerando a influência de ETG e CPO na dureza da massa e a correlação negativa com a perda de massa (-0,453, $p < 0,1$), a enzima também pode ter influência nesta característica.

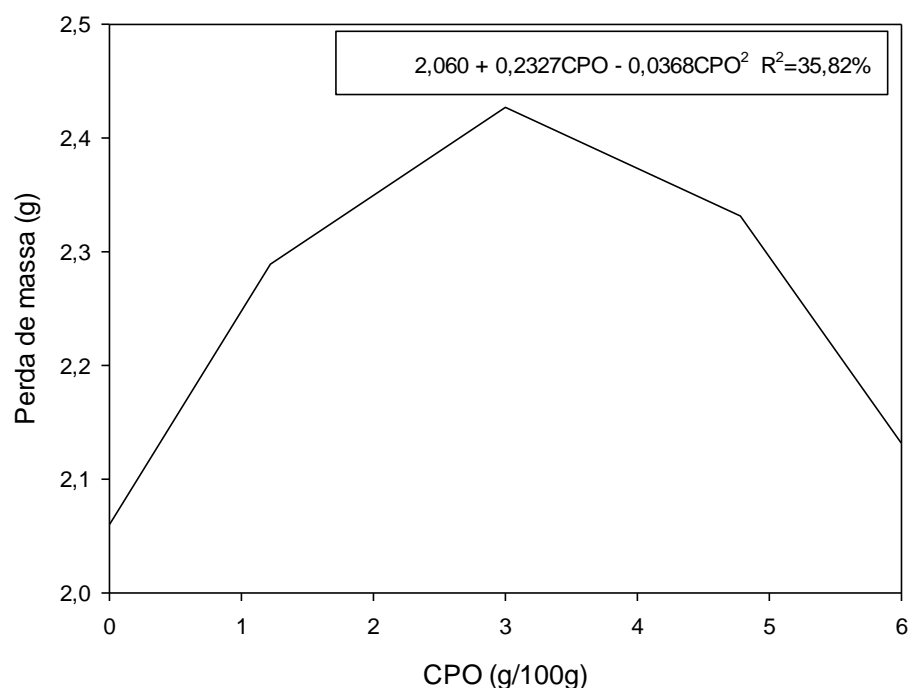


Figura 30- Variação da perda de massa em função da adição de concentrado proteico de orizenina.

Perda de massa é definida como a quantidade de água e matéria orgânica (gases de fermentação) perdidas durante o assamento. Ela pode ser

influenciada por diversos fatores quando se trata de panificação sem glúten, como adição de transglutaminase, adição de proteínas do leite e de outras fontes. A estrutura formada pela transglutaminase tem a habilidade de absorver água e isso conseqüentemente leva a uma perda menor de massa durante o assamento, mas existem estudos que chegaram a uma conclusão contrária (MOORE et al., 2006; RENZETTI; ARENDT, 2009; STORCK et al., 2013). No presente trabalho a adição de concentrado proteico provavelmente tem maior influência nesta característica.

5.4.2. Propriedades de textura

Neste estudo a firmeza de miolo medida no dia do processamento não apresentou um modelo de regressão significativo (Tabela 27). A firmeza 24 h após o processamento foi influenciada pelos fatores CPO e ETG (Figura 31).

Tabela 27- Equações dos modelos de regressão e coeficientes de determinação para firmeza de miolo no dia do processamento (0h) e após 24 h e 48 h de armazenamento.

<i>Variável</i>	<i>Equação</i>	<i>R²(%)</i>
Firmeza 0h	655 - 0,2 CPO - 10,0 ETG - 2,01 TMP ^{ns}	6,37
Firmeza 24h	4664 - 815 CPO - 421 ETG + 121,5 CPO ² + 37,1 ETG ²	59,69
Firmeza 48h	5540 - 193CPO	25,34

^{ns} Falta de ajuste não significativa ao nível de 1 % de probabilidade. TMP: temperatura de mistura; ETG: enzima transglutaminase; CPO: concentrado proteico de orizenina.

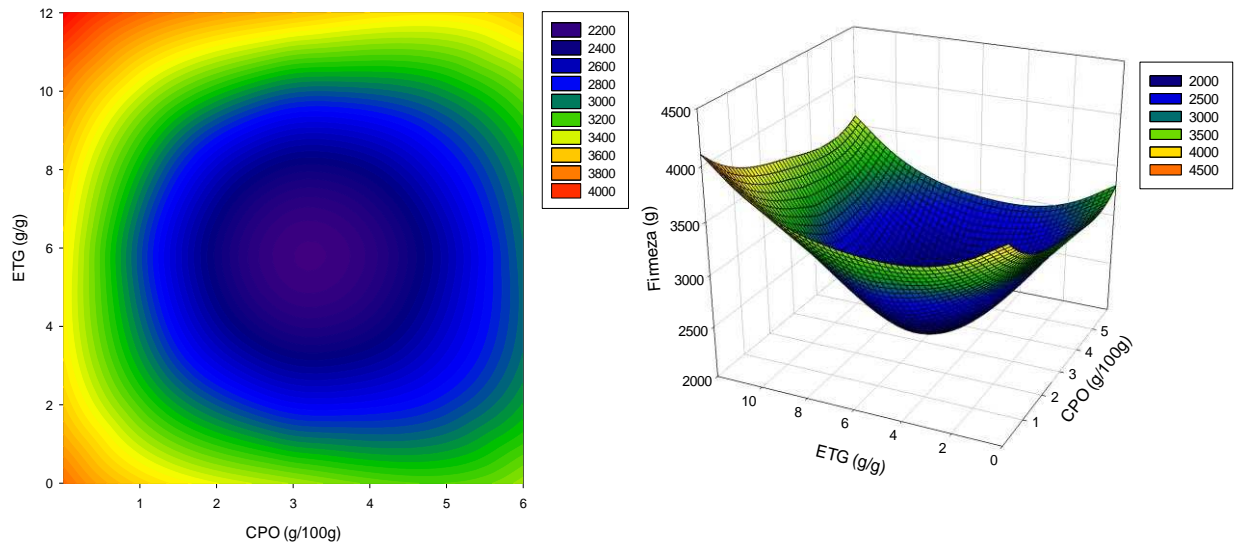


Figura 31-Gráfico de contorno e superfície de resposta para firmeza de miolo após 24h do processamento dos pães a base de farinha de arroz.

A diminuição da firmeza pode ser resultado da capacidade da enzima formar uma estrutura proteica capaz de se ligar e reter água durante o armazenamento e uma possível ligação com amido que de alguma forma atrasou a retrogradação. A firmeza do miolo envolve mais do que a retrogradação da amilopectina, embora exista essa contribuição (MOORE et al., 2006; HAN et al., 2012).

A resistência do miolo à deformação é um importante atributo de firmeza para a panificação, uma vez que está ligada a percepção do consumidor de pão fresco. Emulsificantes e gomas são utilizados em pães de farinha de trigo e sem glúten para diminuir a firmeza do miolo. O emulsificante vai facilitar a agregação das proteínas do glúten, criando uma estrutura que pode melhorar a retenção de gás e resultando em melhor volume e textura. Em pães sem glúten, ele pode aumentar a absorção de água e retenção de gás durante a fermentação e descanso das massas (DEMIRKESEN et al.,

2010). Neste estudo, foi observado que efeito semelhante foi obtido ao usar simultaneamente transglutaminase e concentrado proteico de orizenina.

Uma correlação entre propriedades viscoelásticas e firmeza de miolo já foi reportada na literatura, e neste estudo ela ocorre entre G' (0,655, $p < 0,01$), G'' (0,455, $p < 0,1$) e firmeza logo após o processamento. Elevada rigidez da massa pode resultar em pães sem glúten com menor volume e maior firmeza de miolo (LAZARIDOU et al., 2007).

5.4.3. Análise por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

As micrografias dos miolos dos pães têm o seguinte aspecto (Figura 32), onde as proteínas aparecem em vermelho brilhante, amido gelatinizado em vermelho opaco e em verde os lipídeos.

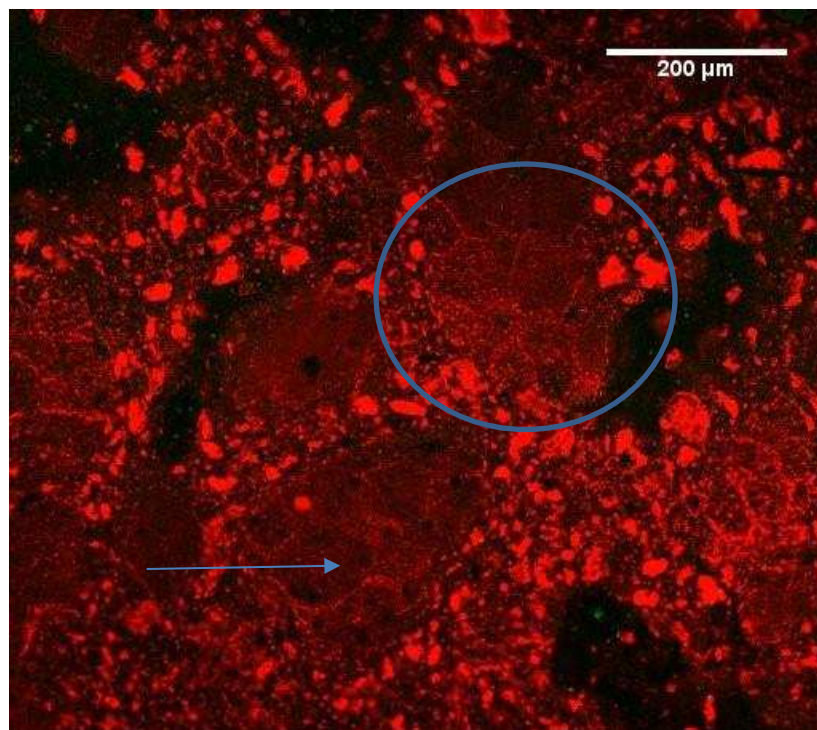


Figura 32 - Micrografia confocal a laser de varredura de pão a base de farinha de arroz. A seta indica células de ar e no círculo a estrutura proteica semelhante a uma colmeia.

As imagens digitais permitiram visualização do miolo extremamente denso e pequenas células de ar, praticamente imperceptíveis em todos os tratamentos. A microscopia confocal permite a visualização do miolo em sua forma hidratada e já foi utilizada com sucesso em pães sem glúten (DÜRRENBARGER et al., 2001; ALVAREZ-JUBETE et al., 2009).

Em algumas delas é possível ver algumas células maiores, provavelmente resultado de coalescência de bolhas de ar e parte da espiral formada na moldagem dos pães (Figura 33).

Todas as amostras apresentaram pequenas gotículas de lipídeos dispersas por todo miolo e as gotas maiores são lipídeos que foram carregados pelo corante no momento da análise. Não foi identificada estrutura proteica, a “colmeia”, no controle e tratamentos 1, 2 e 7.

Quando estes quatro tratamentos são comparados em relação ao volume específico, percebe-se que o tratamento com menor volume (1) apresentou acúmulo de proteínas, grandes borrões vermelhos brilhantes, e nos outros tratamentos mesmo ocorrendo acúmulo das proteínas, estes aparentemente estão mais distribuídos entre o amido gelatinizado.

A matriz de amido gelatinizado e proteína com menos espaços vazios e células de ar interrompendo-a tem potencial para se espalhar por toda a massa e reter melhor os gases de fermentação como uma rede de glúten. As formulações 11 e 13 se encaixaram nestas características, mas diferem quanto ao teor de proteínas na massa. O volume específico do 13 é menor que do 11 e este tratamento tem maior teor de CPO.

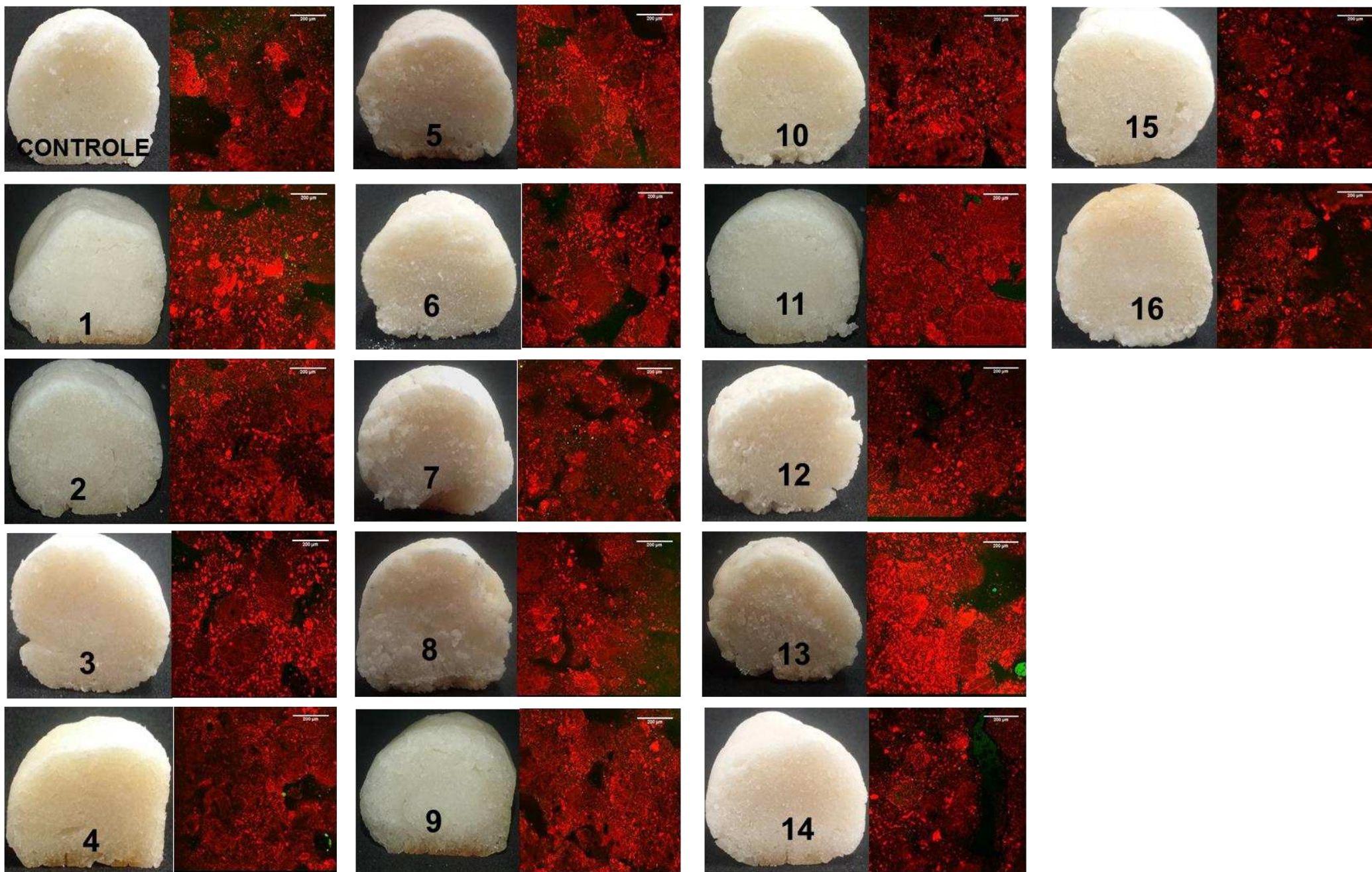


Figura 33 - Imagens digitais e micrografias obtidas através de microscopia de varredura a laser (MCVL) do miolo dos tratamentos de pães sem glúten a base de farinha de arroz. Barra de escala = 200 µm.

Há evidências que a transglutaminase interagiu com as proteínas de arroz adicionadas a massa. Em 3 e 6 os pontos mais brilhantes parecem estar orientados e não distribuídos aleatoriamente como estão nos tratamentos em que a transglutaminase está ausente, como no tratamento 10 e controle.

Apesar de não poder afirmar que a adição do concentrado proteico tem influência sobre as características de qualidade dos pães, nas micrografias é possível observar que os tratamentos controle e 10, que não possuem transglutaminase, mas que contém concentrado proteico de orizenina e foram misturados em temperatura mais alta que o controle, tem diferenças quanto a estrutura. O tratamento 10 apresenta superfície contínua e com pequenas células de ar e ela resultou em pães com menor perda de massa e menor firmeza de miolo durante todo o armazenamento.

A falta de continuidade na matriz proteína e amido nos tratamentos 15,16, 8 e 7 levanta a hipótese de que as temperaturas de mistura mais altas desestruturam o miolo, mas que o teor de transglutaminase compensaria esse efeito deletério. Todos foram processados em temperaturas maiores que 39 °C e o menor volume específico dos quatro tratamentos é justamente a que contém menor teor de transglutaminase (7) e não aquele que é processado na temperatura mais alta (15).

As imagens analisadas ajudaram a compreender como as proteínas e o amido se comportam com a variação dos fatores testados neste estudo. As diferenças entre o desempenho de panificação estão aparentemente relacionadas com a distribuição e arranjo das proteínas na massa. A limitação para que ocorra essa distribuição uniforme tem relação

com as características da orizenina, que apesar de serem poliméricas e interagirem com as proteínas monoméricas, como o glúten faz, elas são mais curtas (GUJRAL; ROSELL, 2004; SIVARAMAKRISHNAN; SENGE; CHATTOPADHYAY, 2004; OSZVALD et al., 2008). A transglutaminase estaria contribuindo com a distribuição dessas proteínas ao promover ligações cruzadas.

5.4.4. Conclusão parcial

A adição de concentrado proteico de orizenina e o uso de temperaturas mais altas na mistura influenciaram as características de qualidade de pães sem glúten a base de farinha de arroz.

Em relação ao volume específico, o desempenho foi fraco, mas a interação entre concentrado proteico de orizenina e enzima melhorou esta característica.

Há uma influência negativa do CPO na variação da firmeza do miolo com o tempo.

As micrografias se mostraram eficientes em esclarecer efeito sinérgico do concentrado proteico de orizenina e enzima transglutaminase nas características dos pães.

O teor de concentrado proteico de orizenina e de enzima transglutaminase foram importantes para essas mudanças e o concentrado proteico tem potencial para substituir hidrocolóides, amido e emulsificantes na produção de pães sem glúten a base de farinha de arroz.

A temperatura de mistura e o teor de concentrado proteico precisam ser testados isoladamente para confirmar hipótese levantada na

avaliação das micrografias de que concentrado proteico de orizenina pode influenciar na qualidade dos pães sem adição de transglutaminase.

6. CONCLUSÃO GERAL

A temperatura de mistura e concentrado proteico de orizenina tem potencial para produzir massas com facilidade para manuseio em equipamentos de panificação convencionais e pães com maior volume específico e miolo macio.

Concentrado proteico de orizenina extraído por meio de protocolo rápido e simples possui propriedades técnico-funcionais semelhantes a um protocolo de extração com mais etapas e de longa duração.

A influência do concentrado proteico de orizenina nos pães sem glúten a base de farinha de arroz foi, principalmente, resultado da interação das proteínas com a enzima transglutaminase.

Os fatores testados mudaram o comportamento das massas e dos pães. Embora, os resultados não sejam conclusivos eles indicam uma tendência de melhora dos indicadores de qualidade utilizando temperaturas de mistura maiores que a ambiente e adição tanto do concentrado proteico quanto da enzima transglutaminase.

Este trabalho foi o passo inicial para o desenho de novos experimentos para atingir o objetivo de produzir pães sem glúten a base de farinha de arroz de melhor qualidade, de fácil processamento e com menor necessidade do uso de aditivos.

7. REFERÊNCIAS

- AACC. Solvent Retention Capacity Profile. In: **AACC International Approved Methods**. [s.l.] AACC International, 2009a. p. 10–11.
- AACC. Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement. In: **AACC International Approved Methods**. [s.l.] AACC International, 2009b. cp. 3–6.
- AACC. Measurement of Bread Firmness by Universal Testing Machine. In: **AACC International Approved Methods**. [s.l.] AACC International, 2009c. p. 7–10.
- AACC. Guideline for Determination of Particle Size Distribution. In: **AACC International Approved Methods**. [s.l.] AACC International, 2012. p. 54–55.
- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 283–290, maio 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521005000111>>. Acesso em: 12 abr. 2013.
- AHMED, J.; AL-ATTAR, H. Effect of drying method on rheological, thermal, and structural properties of chestnut flour doughs. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 76–87, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X15001952>>.
- ALVAREZ-JUBETE, L.; AUTY, M.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 3, p. 437–445, 25 nov. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-009-1184-z>>. Acesso em: 11 abr. 2013.
- ANDERSON, A.; HETTIARACHCHY, N.; JU, Z. Y. Physicochemical Properties of Pronase-Treated Rice Glutelin. v. 78, n. 1, p. 1–6, 2001.
- ARMERO, E.; COLLAR, C. Texture properties of formulated wheat doughs - Relationships with dough and bread technological quality. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology**, v. 204, n. 2, p. 136–145, 1997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WQ97300010>.
- ATWELL, W. A. **Wheat flour**. 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota 55121-2097, USA: American Association of Cereal Chemists, 2001.
- BAI, J. C.; FRIED, M.; CORAZZA, G. R.; SCHUPPAN, D.; FARTHING, M.; CATASSI, C.; GRECO, L.; COHEN, H.; CIACCI, C.; ELIAKIM, R.; FASANO, A.; GONZÁLEZ, A.; KRABSHUIS, J. H.; LEMAIR, A. World Gastroenterology Organisation global guidelines on celiac disease. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 47, n. 2, p. 121–6, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23314668>>.
- BAO, J.; BERGMAN, C. J. The functionality of rice starch. In: **Starch in Food**. [s.l.] Elsevier, 2004. p. 258–294.
- BELTON, P. S.; ANGLIA, E. Part II Dough and bread quality The molecular basis of dough rheology. **East**, 2003.
- BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch**. Third ed. Burlington, MA: Academic Press Inc., 2009.
- BHATTACHARYA, K. R. **Rice quality: a guide to rice properties and**

analysis. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011.

BLANCHARD, C.; LABOURÉ, H.; VEREL, A.; CHAMPION, D. Study of the impact of wheat flour type, flour particle size and protein content in a cake-like dough: Proton mobility and rheological properties assessment. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 691–698, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.08.005>>.

BOS, M. a.; VLIET, T. van. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, n. 3, p. 437–471, 2001.

BRITES, C.; TRIGO, M. J.; SANTOS, C.; COLLAR, C.; ROSELL, C. M. Maize-based gluten-free bread: Influence of processing parameters on sensory and instrumental quality. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 5, p. 707–715, 2010.

CAGAMPANG, G. B.; CRUZ, L. J.; ESPIRITU, S. G.; SANTIAGO, R. G.; JULIANO, B. O. Studies on the extraction and composition of rice proteins. **Cereal Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 145–155, 1966.

CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 184–189, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.009>>.

CAPPA, C.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; LUCISANO, M.; MARIOTTI, M. Effect of high pressure processing on the baking aptitude of corn starch and rice flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 20–27, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643816302869>>.

CROCKETT, R.; IE, P.; VODOVOTZ, Y. Effects of soy protein isolate and egg white solids on the physicochemical properties of gluten-free bread. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 84–91, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.030>>.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. 4th editio ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

DE LA HERA, E.; MARTINEZ, M.; GÓMEZ, M. Influence of flour particle size on quality of gluten-free rice bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 199–206, nov. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813001485>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

DE LA HERA, E.; ROSELL, C. M.; GOMEZ, M. Effect of water content and flour particle size on gluten-free bread quality and digestibility. **Food chemistry**, v. 151, p. 526–31, 15 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423566>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

DEMIRKESEN, I.; MERT, B.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Rheological properties of gluten-free bread formulations. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 295–303, jan. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409003860>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

DÜRRENBARGER, M. B.; HANDSCHIN, S.; CONDE-PETIT, B.; ESCHER, F. Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). **LWT - Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 11–17, fev. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643800907394>>.

Acesso em: 12 set. 2014.

ELGETI, D.; NORDLOHNE, S. D.; FÖSTE, M.; BESL, M.; LINDEN, M. H.; HEINZ, V.; JEKLE, M.; BECKER, T. Volume and texture improvement of gluten-free bread using quinoa white flour. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 1, p. 41–47, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.010>>.

ELIASSON, A. C. Starch structure and bread quality. In: CAUVAIN, S. P. (Ed.). **Bread Making: Improving Quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2003. p. 145–167.

ELIASSON, A.-C.; LARSSON, K. Cereals in Breadmaking: A Molecular Colloidal Approach. v. 41, n. October, p. 392, 1993. Disponível em: <<https://books.google.com/books?id=9k20sKKC6tIC&pgis=1>>.

FABIAN, C.; JU, Y.-H. A Review on Rice Bran Protein: Its Properties and Extraction Methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 9, p. 816–827, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2010.482678>>.

FASANO, A.; SAPONE, A.; ZEVALLOS, V.; SCHUPPAN, D. Nonceliac Gluten Sensitivity. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1195–1204, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.12.049>>.

FELIX, M.; ROMERO, A.; VERMANT, J.; GUERRERO, A. Interfacial properties of highly soluble crayfish protein derivatives. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 499, p. 10–17, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775716301790>>.

FRANCO, T. S.; ELLENDERSEN, L. N.; FATTORI, D.; GRANATO, D.; MASSON, M. L. Influence of the Addition of Ovalbumin and Emulsifier on the Physical Properties and Stability of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Juice Foams Prepared for Foam Mat Drying Process. **Food and Bioprocess Technology**, p. 2012–2026, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11947-015-1553-5>>.

FROST, J. **How High Should R-squared Be in Regression Analysis?**, 2014. Disponível em: <<http://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics/how-high-should-r-squared-be-in-regression-analysis>>.

FULLINGTON, J. G.; COLE, E. W.; KASARDA, D. D. Quantitative Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Total Proteins Extracted from Different Wheat Varieties: Effect of Protein Content. **Cereal Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 65–71, 1983. Disponível em: <http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1983/Documents/chem60_65.pdf>.

GALLAGHER, E. **Gluten-free food science and technology**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009.

GALLAGHER, E.; GORMLEY, T. R.; ARENDT, E. K. Crust and crumb characteristics of gluten free breads. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2–3, p. 153–161, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877402002443>>.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. DETERMINATION OF SERUM PROTEINS BY MEANS OF THE BIURET REACTION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1 fev. 1949. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/177/2/751.short>>.

GUANDALINI, S.; ASSIRI, A. Celiac Disease: A review. **JAMA Pediatrics**, v.

168, n. 3, p. 272–278, 20 dez. 2014.

GUERRIERI, N. 8 - Cereal proteins. In: YADA, R. Y. (Ed.). **Proteins in Food Processing**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2004. p. 176–196.

GUJRAL, H. S.; GUARDIOLA, I.; CARBONELL, J. V.; ROSELL, C. M. Effect of cyclodextrin glycosyl transferase [corrected] on dough rheology and bread quality from rice flour. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 13, p. 3814–8, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf034112w>>.

GUJRAL, H. S.; ROSELL, C. M. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 225–230, mar. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521003000936>>. Acesso em: 23 mar. 2013.

HAMADA, J. S. Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases. **JFS: Food Chemistr and Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 305–310, 2000.

HAMADA, J. S.; SPANIER, A. M.; BLAND, J. M.; DIACK, M. Preparative separation of value-added peptides from rice bran proteins by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 827, n. 2, p. 319–327, 1998.

HAMADA, S.; SUZUKI, K.; AOKI, N.; SUZUKI, Y. Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 1, p. 91–97, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.10.008>>.

HAN, H. M.; CHO, H.; KANG, W.; KYUNG, B. Rice varieties in relation to rice bread quality. n. September 2011, p. 1462–1467, 2012.

HARDT, N. A.; BOOM, R. M.; VAN DER GOOT, A. J. Wheat dough rheology at low water contents and the influence of xylanases. **Food Research International**, v. 66, p. 478–484, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.011>>.

HERRERA, M. L. **Analytical techniques for studying the physical properties of lipid emulsions**. Boston, MA: Springer US, 2012. v. 3

HETTIARACHCHY, N. S.; SATO, K.; MARSHALL, M. R.; KANNAN, A. **Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions, and commercialization**. First ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

HOU, L.; ZHU, Y.; LI, Q. Characterization and Preparation of Broken Rice Proteins Modified by Proteases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 9862, n. 1, p. 50–55, 2010.

HOUBEN, A.; HÖCHSTÖTTER, A.; BECKER, T. Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 2, p. 195–208, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-012-1720-0>>.

IZZAH, N.; RAHIM, A.; MORAD, N. A.; LONG, K. Rice Bran Water Extraction through Autoclaving and Sonication : Protein Content and Amino Acid Profile. **JOURNAL OF APPLIED SCIENCE AND AGRICULTURE**, v. 10, n. 5, p. 97–103, 2015.

JAMBRAK, A. R.; MASON, T. J.; LELAS, V.; HERCEG, Z.; HERCEG, I. L. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 2, p. 281–287, maio 2008. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877407005195>>.

JIN, H. L.; WANG, J. S.; BIAN, K. Characteristics of Enzymatic Hydrolysis of the Wheat Gluten Proteins Treated by Ultrasound Wave. **Advanced Materials Research**, v. 343–344, p. 1015–1022, 2011. Disponível em: <<http://www.scientific.net/AMR.343-344.1015>>.

JU, Z. Y.; HETTIARACHCHY, N. S.; RATH, N. Extraction, denaturation and hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 2, p. 229–232, mar. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2001.tb11322.x>>.

JULIANO, B. O.; BOULTER, D. Extraction and composition of rice endosperm glutelin. **Phytochemistry**, v. 15, n. 11, p. 1601–1606, jan. 1976. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942200974363>>.

JULIANO, B. O.; INSTITUTE, P. R. R. **Rice chemistry and quality**. [s.l.] Philippine Rice Research Institute, 2003.

KADAN, R. S.; BRYANT, R. J.; MILLER, J. a. Effects of milling on functional properties of rice flour. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. E151–E154, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460123>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

KADAN, R. S.; ROBINSON, M. G.; THIBODEAUX, D. P.; PEPPERMAN, a B. Texture and other Physicochemical Properties of Whole Rice Bread. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 7, p. 940–944, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb08216.x>>.

KATSUBE, T.; KURISAKA, N.; OGAWA, M.; MARUYAMA, N.; OHTSUKA, R.; UTSUMI, S.; TAKAIWA, F. Accumulation of Soybean Glycinin and Its Assembly with the Glutelins in Rice1. **Plant physiology**, v. 120, n. 4, p. 1063–1074, 1999.

KATSUBE-TANAKA, T.; DULDULAO, J. B. a; KIMURA, Y.; IIDA, S.; YAMAGUCHI, T.; NAKANO, J.; UTSUMI, S. The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1699, n. 1–2, p. 95–102, 1 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B73DJ-4BS4C72-1/2/92976dda541ff8ef83c360dd3137c671>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

KAWAMURA-KONISHI, Y.; SHODA, K.; KOGA, H.; HONDA, Y. Improvement in gluten-free rice bread quality by protease treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 1, p. 45–50, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2013.02.010>>.

KENT, N. L.; EVERS, A. D. Flour Quality. **Technology of Cereals (4th Edition)**, p. 170–190, 1994.

KHAN, S. H.; BUTT, M. S.; SHARIF, M. K.; SAMEEN, A.; MUMTAZ, S.; SULTAN, M. T. Functional Properties of Protein Isolates Extracted from Stabilized Rice Bran by Microwave, Dry Heat, and Parboiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2416–2420, 23 mar. 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf104177x>>.

KUMAGAI, T.; KAWAMURA, H.; FUSE, T.; WATANABE, T.; SAITO, Y.; MASUMURA, T.; WATANABE, R.; KADOWAKI, M. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 52, n. 6, p. 467–472, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>>.

LAWTON, J. W. **Viscoelasticity of Zein-Starch Doughs** *Cereal Chemistry*, 1992. .

LAZARIDOU, A.; DUTA, D.; PAPAGEORGIOU, M.; BELC, N.; BILIADERIS, C. G. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 3, p. 1033–1047, abr. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877406003025>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

LEBWOHL, B.; LUDVIGSSON, J. F.; GREEN, P. H. R. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 351, p. h4347, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4596973&tool=mcentrez&rendertype=abstract>>.

LÉTANG, C.; PIAU, M.; VERDIER, C. Characterization of wheat flour–water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 2, p. 121–132, ago. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877499000825>>.

LIU, Y.; LI, X.; ZHOU, X.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Effects of glutaminase deamidation on the structure and solubility of rice glutelin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2205–2210, dez. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643811001599>>. Acesso em: 27 fev. 2013.

LORENZ, K. J.; KULP, K. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1991.

LUDVIGSSON, J. F.; LEFFLER, D. a; BAI, J. C.; BIAGI, F.; FASANO, A.; GREEN, P. H. R.; HADJIVASSILIOU, M.; KAUKINEN, K.; KELLY, C. P.; LEONARD, J. N.; LUNDIN, K. E. A.; MURRAY, J. a; SANDERS, D. S.; WALKER, M. M.; ZINGONE, F.; CIACCI, C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**, v. 62, n. 1, p. 43–52, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3440559&tool=mcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

LUH, B. S. 5 - Rice production. In: OWENS, G. (Ed.). **Cereals Processing Technology**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2001. p. 79–108.

MACHADO, A. P. O. **Propriedades viscoelásticas de massa de farinha de arroz e do concentrado proteico de orizenina**. 2012. 392 Universidade Federal de Viçosa, 2012.

MACRITCHIE, F. The liquid phase of dough and its role in baking. **Cereal Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 318–326, 1976. Disponível em: <http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1976/Documents/chem53_318.pdf>.

MACRITCHIE, F. **Concepts in cereal chemistry**. [s.l.] Taylor & Francis, 2010.

MACRITCHIE, F. Seventy years of research into breadmaking quality. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 123–131, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521016300820>>.

MARCO, C.; ROSELL, C. M. Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 132–139, jan. 2008a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877407002804>>.

MARCO, C.; ROSELL, C. M. Functional and rheological properties of protein enriched gluten free composite flours. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 1, p. 94–103, set. 2008b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877408000502>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

MARTIN, M.; FITZGERALD, M. Proteins in Rice Grains Influence Cooking Properties. **Journal of Cereal Science**, v. 36, n. 3, p. 285–294, nov. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521001904655>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

MARTIN, S. Celiac disease and the gluten-free diet. **Pediatric Health**, v. 4, n. 3, p. 321–328, 2010.

MASURE, H. G.; FIERENS, E.; DELCOUR, J. A. Current and Forward Looking Experimental Approaches in Gluten-Free Bread Making Research. **Journal of Cereal Science**, v. 67, p. 92–111, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521015300655>>.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practice and techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1999.

MCLEAN, J.; HARDY, B.; HETTEL, G. **Rice almanac, 4th edition**. [s.l: s.n.]

MOORE, M. M.; HEINBOCKEL, M.; DOCKERY, P.; ULMER, H. M.; ARENDT, E. K. Network Formation in Gluten-Free Bread with Application of Transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 28–36, 2006. Disponível em: <<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CC-83-0028>>.

MOREIRA, R.; CHENLO, F.; ARUFE, S. Starch transitions of different gluten free flour doughs determined by dynamic thermal mechanical analysis and differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 160–167, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.062>>.

MOTOKI, M.; KUMAZAWA, Y. Recent Research Trends in Transglutaminase Technology for Food Processing. **Food Science and Technology Research**, v. 6, n. 3, p. 151–160, 2000.

NARSIMHAN, G. Foam Fractionation. p. 1513–1521, 2000.

NISHITA, K. D.; BEAN, M. M. Grinding Methods: Their impact on Rice Flour Properties. **Cereal Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 46–49, 1982.

NOZAWA, M.; ITO, S.; ARAI, E. Effect of ovalbumin on the quality of gluten-free rice flour bread made with soymilk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 598–605, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.010>>.

OSZVALD, M.; TÖMÖSKÖZI, S.; LARROQUE, O.; KERESZTÉNYI, E.; TAMÁS, L.; BÉKÉS, F. Characterization of rice storage proteins by SE-HPLC and micro z-arm mixer. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 68–76, jul. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521007001531>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

PACIULLI, M.; RINALDI, M.; CIRLINI, M.; SCAZZINA, F.; CHIAVARO, E. Chestnut flour addition in commercial gluten-free bread: A shelf-life study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 88–95, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.034>>.

PARAMAN, I.; HETTIARACHCHY, N. S.; SCHAEFER, C.; BECK, M. I. Physicochemical Properties of Rice Endosperm Proteins Extracted by Chemical and Enzymatic Methods. **Cereal Chemistry**, v. 83, n. 6, p. 663–667,

nov. 2006. Disponível em: <<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CC-83-0663>>.

PELLEGRINI, N.; AGOSTONI, C. Nutritional aspects of gluten-free products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. November 2014, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.7101>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25615408>>.

PHONGTHAI, S.; LIM, S.-T.; RAWDKUEN, S. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 146–154, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.001>>.

PINCIROLI, M.; VIDAL, A. A.; AÑÓN, M. C.; MARTÍNEZ, E. N. Comparison between protein functional properties of two rice cultivars. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1605–1610, dez. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643809001649>>.

POMERANZ, Y. CHAPTER 5 - PROTEINS: GENERAL. In: POMERANZ, Y. (Ed.). **Functional Properties of Food Components (SECOND EDITION)**. Food Science and Technology. Second ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 147–192.

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**, v. 36, p. 143–150, maio 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X13002920>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

PROTONOTARIOU, S.; DRAKOS, A.; EVAGELIOU, V.; RITZOULIS, C.; MANDALA, I. Sieving fractionation and jet mill micronization affect the functional properties of wheat flour. **Journal of Food Engineering**, v. 134, p. 24–29, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.02.008>>.

PRUSKA-KĘDZIOR, A.; KĘDZIOR, Z.; GORAŃCY, M.; PIETROWSKA, K.; PRZYBYLSKA, A.; SPYCHALSKA, K. Comparison of rheological, fermentative and baking properties of gluten-free dough formulations. **European Food Research And Technology**, v. 227, n. 5, p. 1523–1536, 29 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00217-008-0875-1>>. Acesso em: 3 abr. 2013.

PTASZEK, P.; KABZIŃSKI, M.; KRUK, J.; KACZMARCZYK, K.; ZMUDZIŃSKI, D.; LISZKA-SKOCZYLAŚ, M.; MICKOWSKA, B.; ŁUKASIEWICZ, M.; BANAŚ, J. The effect of pectins and xanthan gum on physicochemical properties of egg white protein foams. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 129–137, 2015.

PYLER, E. J.; GORTON, L. A. **Baking science and technology**,. Fourth ed. Kansas City: SOSLAND PUBLISHING COMPANY, 2009. v. II

RAMPERTAB, S. D.; MULLIN, G. E. **Celiac disease**. New York: Humana Press, 2014.

RENZETTI, S.; ARENDT, E. K. Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 22–28, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.02.002>>.

RIBOTTA, P. D.; LEÓN, A. E.; AÑÓN, M. C. Effect of freezing and frozen

storage on the gelatinization and retrogradation of amylopectin in dough baked in a differential scanning calorimeter. **Food Research International**, v. 36, n. 4, p. 357–363, jan. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996902002272>>.

ROMERO, A.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; CORDOBES, F.; GUERRERO, A.; ANTON, M. Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.013>>.

ROMERO, A.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; CORDOBÉS, F.; GUERRERO, A.; ANTON, M. Interfacial and oil/water emulsions characterization of potato protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9466–9474, 2011.

ROMERO, M. V. Rice Proteins. In: **Applied Food Protein Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 305–321.

RONDA, F.; PÉREZ-QUIRCE, S.; ANGIOLONI, A.; COLLAR, C. Impact of viscous dietary fibres on the viscoelastic behaviour of gluten-free formulated rice doughs: A fundamental and empirical rheological approach. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 252–262, ago. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X13000295>>. Acesso em: 25 jul. 2014.

ROUILLÉ, J.; CHIRON, H.; COLONNA, P.; DELLA VALLE, G.; LOURDIN, D. Dough/crumb transition during French bread baking. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 161–169, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2010.04.008>>.

RÓŻYŁO, R.; RUDY, S.; KRZYKOWSKI, A.; DZIKI, D. Novel Application of Freeze-Dried Amaranth Sourdough in Gluten-Free Bread Production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 2, p. 135–143, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jfpe.12152>>.

SANZ, T.; SALVADOR, a.; FISZMAN, S. M. Evaluation of four types of resistant starch in muffin baking performance and relationship with batter rheology. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 3, p. 813–819, 23 nov. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0791-9>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

SAPONE, A.; BAI, J. C.; CIACCI, C.; DOLINSEK, J.; GREEN, P. H. R.; HADJIVASSILIOU, M.; KAUKINEN, K.; ROSTAMI, K.; SANDERS, D. S.; SCHUMANN, M.; ULLRICH, R.; VILLALTA, D.; VOLTA, U.; CATASSI, C.; FASANO, A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC medicine**, v. 10, n. 1, p. 13, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3292448&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SCHOENLECHNER, R.; DRAUSINGER, J.; OTTENSCHLAEGER, V.; JURACKOVA, K.; BERGHOFER, E. Functional properties of gluten-free pasta produced from amaranth, quinoa and buckwheat. **Plant foods for human nutrition Dordrecht Netherlands**, v. 65, n. 4, p. 339–349, dez. 2010a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20972627>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

SCHOENLECHNER, R.; MANDALA, I.; KISKINI, a; KOSTAROPOULOS, a; BERGHOFER, E. Effect of water, albumen and fat on the quality of gluten free bread containing amaranth. **International Journal of Food Science**

Technology, v. 45, n. 4, p. 661–669, 23 mar. 2010b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2009.02154.x>>. Acesso em: 21 mar. 2013.

SCHOENLECHNER, R.; SIEBENHANDL, S.; BERGHO, E. Pseudocereals. In: **Gluten-Free Cereal Products and Beverages**. [s.l: s.n.]

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**, v. 111, n. 4, p. 590–597, ago. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877412001434>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

Science Report: Wild weed may help millions of children. **The Times (London, England)**, 5 jul. 1987. Disponível em: <<http://galegroup.ez35.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?id=GALE%7CA117557220&v=2.1&u=capes&it=r&p=AONE&sw=w&asid=009636e15049af662674f6204b863bfd>>.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. **Wheat gluten**. Special ed. Cambri: The Royal Society of Chemistry, 2000.

SHIH, F. F. An update on the processing of high-protein rice products. **Nahrung/Food**, v. 47, n. 6, p. 420–424, 1 dez. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/food.200390093>>.

SHIN, M.; GANG, D. O.; SONG, J. Y. Effects of protein and transglutaminase on the preparation of Gluten-free rice bread. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 951–956, 2010.

SINGH, V.; OKADOME, H.; TOYOSHIMA, H.; ISOBE, S.; OHTSUBO, K. Thermal and physicochemical properties of rice grain, flour and starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2639–47, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898601>>.

SIVARAMAKRISHNAN, H. P.; SENGE, B.; CHATTOPADHYAY, P. K. Rheological properties of rice dough for making rice bread. **Journal of Food Engineering**, v. 62, n. 1, p. 37–45, mar. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877403001699>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

SKENDI, A.; PAPAGEORGIOU, M.; BILIADERIS, C. G. Influence of water and barley ??-glucan addition on wheat dough viscoelasticity. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 57–65, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.012>>.

SOUZA, D. De; FRANCISCO, A.; RIGHETTO, D.; DAMASCENO, L.; MARCZAK, F.; CRISTINA, I. Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. **Food Chemistry**, v. 191, p. 36–44, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.032>>.

SOZER, N.; DALGIÇ, A. C.; KAYA, A. Thermal, textural and cooking properties of spaghetti enriched with resistant starch. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 2, p. 476–484, 2007.

STAUFFER, C. E. Principles of Dough Formation. In: **Technology of Breadmaking**. Boston, MA: Springer US, 2007. p. 299–332.

STORCK, C. R.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; GULARTE, M. A.; ELIAS, M. C.; ROSELL, C. M.; GUERRA DIAS, A. R. Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v.

53, n. 1, p. 346–354, set. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813000509>>. Acesso em: 19 mar. 2014.

TADROS, T. F. **Emulsion formation and stability**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.

THOMAS, S.; ZAIKOV, G. **Recent advances in polymer nanocomposites: synthesis and characterisation**. [s.l.] CRC Press, 2010.

TORBICA, A.; HADNADEV, M.; DAPČEVIĆ, T. Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 6–7, p. 626–632, ago. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X10000494>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

TURKUT, G. M.; CAKMAK, H.; KUMCUOGLU, S.; TAVMAN, S. Effect of quinoa flour on gluten-free bread batter rheology and bread quality. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 174–181, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.03.005>>.

UNICAMP, N. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2011.

USTUNOL, Z. **Applied food protein chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

VIJAYKRISHNARAJ, M.; ROOPA, B. S.; PRABHASANKAR, P. Preparation of gluten free bread enriched with green mussel (*Perna canaliculus*) protein hydrolysates and characterization of peptides responsible for mussel flavour. **Food Chemistry**, v. 211, p. 715–725, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.094>>.

WANG, C.; XU, F.; LI, D.; ZHANG, M. Physico-chemical and structural properties of four rice bran protein fractions based on the multiple solvent extraction method. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 33, n. 3, p. 283–291, 2015a. Disponível em: <<http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=33&firstPage=283&type=publishedArticle>>.

WANG, J.-M.; XIA, N.; YANG, X.-Q.; YIN, S.-W.; QI, J.-R.; HE, X.-T.; YUAN, D.-B.; WANG, L.-J. Adsorption and Dilatational Rheology of Heat-Treated Soy Protein at the Oil–Water Interface: Relationship to Structural Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3302–3310, 28 mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf205128v>>.

WANG, L.; WANG, Y. J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 291–296, 2004.

WANG, T.; ZHANG, H.; WANG, L.; WANG, R.; CHEN, Z. Mechanistic insights into solubilization of rice protein isolates by freeze – milling combined with alkali pretreatment. **Food Chemistry**, v. 178, p. 82–88, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.057>>.

WIESER, H. Detection of gluten. In: **Gluten-Free Cereal Products and Beverages**. [s.l.] Elsevier Inc., 2008. p. 47–80.

WILDE, P. Foam formation in dough and bread quality. **Bread Making: Improving Quality**, p. 321–351, 2003.

WOLTER, A.; HAGER, A.-S.; ZANNINI, E.; CZERNY, M.; ARENDT, E. K. Impact of sourdough fermented with *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 on baking and sensory properties of gluten-free breads. **European Food**

Research and Technology, v. 239, n. 1, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-014-2184-1>>.

XIA, N.; WANG, J.; GONG, Q.; YANG, X.; YIN, S.; QI, J. Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted micro fluidization : Comparison to alkaline extraction. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 482–489, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.06.008>>.

XIA, N.; WANG, J.; YANG, X.; YIN, S.; QI, J.; HU, L.; ZHOU, X. Preparation and characterization of protein from heat-stabilized rice bran using hydrothermal cooking combined with amylase pretreatment. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 1, p. 95–101, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.004>>.

YADAV, R. B.; YADAV, B. S.; CHAUDHARY, D. Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making. **British Food Journal**, v. 113, n. 9, p. 1173–1182, 6 set. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1108/00070701111174596>>.

ZANNINI, E.; JONES, J. M.; RENZETTI, S.; ARENDT, E. K. Functional Replacements for Gluten. **Annual Review of Food Science and Technology**, n. 3, p. 227–247, 2012.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 849–868, dez. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2621.2002.00625.x>>.

ZIOBRO, R.; WITCZAK, T.; JUSZCZAK, L.; KORUS, J. Supplementation of gluten-free bread with non-gluten proteins. Effect on dough rheological properties and bread characteristic. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 213–220, ago. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X13000210>>. Acesso em: 19 mar. 2014.