

ISABELA CAMPELO DE QUEIROZ

**EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO
DE FOLHAS DE TRIGO: AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E
EFEITOS NA QUALIDADE TECNOLÓGICA E NUTRICIONAL DE
PÃO FRANCÊS**

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
2015**

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

T

Q3e
2015

Queiroz, Isabela Campelo de, 1979-

Extrato de proteínas estruturadoras de gelo de folhas de trigo : avaliação da inocuidade e efeitos na qualidade tecnológica e nutricional de pão francês / Isabela Campelo de Queiroz. – Viçosa, MG, 2015.

xvii, 83f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Mônica Ribeiro Pirozi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.77-83.

1. Pão - Processamento. 2. Proteínas anticongelantes. 3. Pão - Aspectos nutricionais. 4. Toxicidade. 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. 664.7523

ISABELA CAMPELO DE QUEIROZ

**EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE
GELO DE FOLHAS DE TRIGO: AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE
E EFEITOS NA QUALIDADE TECNOLÓGICA E NUTRICIONAL
DE PÃO FRANCÊS**

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: 11 de Agosto de 2015.

Claudia Regina Vieira

Sirlene Souza Rodrigues Satori

José Benício Paes Chaves
(Coorientador)

Hércia Stampini Duarte Martin
(Coorientadora)

Mônica Ribeiro Pirozi
(Orientadora)

Dedico esta tese

Á Deus,
Que sempre me deu força nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais Ionê e Sebastião,
Por seus ensinamentos e apoio incondicional.

Ao meu marido Esley,
Por todo amor, incentivo e paciência ao longo desses anos.

A minha princesa Julia,
Fonte de toda minha alegria e força de vontade a cada amanhecer.

“A persistência é o menor caminho do êxito” (Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS:

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, *Campus* Rio Pomba, pelo auxílio e incentivo na minha qualificação profissional.

À minha orientadora, professora Mônica Ribeiro Pirozi, pela orientação, ensinamentos, amizade e carinho demonstrados durante o nosso convívio acadêmico. Com admiração agradeço por me ajudar a alcançar este importante degrau da minha vida pessoal e profissional.

À professora Hércia Stampini Duarte Martino, por sua dedicação e sua capacidade de transmitir seus conhecimentos de forma carinhosa e responsável. Por ter disponibilizado o Laboratório de Nutrição Experimental para realização deste trabalho. Obrigada pela confiança!

Ao professor José Benício, professora Sirlene e professora Claudia, pela disponibilidade e valiosas contribuições durante a realização deste trabalho.

Ao LAFA e aos companheiros: Natanielli, Ana Paula, Tatiana, Antônio Maradini, Michele, Eduardo, Genilson, Thalles, Cristiano, Caroline e Barbara, pela convivência diária e auxílio no laboratório, mas principalmente, minha prima e companheira Flávia Campelo, que me auxiliou muito na realização do curso e na conclusão desse trabalho.

Ao Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV), aqui representado pela Renata, Eliza, Núbia, Dessiré e Bárbara que auxiliaram no cuidado com os ratos, tornando nosso trabalho mais agradável.

À todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, de modo especial a Juliana, pela agradável convivência.

Aos professores e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do *Câmpus* Rio Pomba do IF Sudeste MG pelo apoio e compreensão ao longo do curso.

Aos meus amados pais, Sebastião e Ionê, razões de minha vida, pelo apoio, amor e dedicação incondicionais. Aos meus tão queridos irmãos, cunhadas (os) e sobrinhos, pelo carinho e que mesmo a distancia são essenciais na minha vida.

Ao meu esposo Esley, pelo incentivo, companheirismo e amor que aliviaram os momentos difíceis, me alimentando de certezas, forças e alegria.

À minha filha Julia, amor infinito, que representa a maior de todas as minhas conquistas.

À Daiana que, na minha ausência, cuidou sempre para manter tudo em ordem.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Deus por último, mas acima de tudo e de todos, agradeço por possibilitar a realização de meus planos e sonhos. A Ele, toda a gratidão por ser meu Pai nos momentos de alegria, por ser o caminho nos momentos de incertezas e por ser o refúgio nos momentos necessários.

BIOGRAFIA

Isabela Campelo de Queiroz, filha de Sebastião Peluso de Queiroz e Ionê Antônia Campelo de Queiroz, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais no dia 02 de fevereiro de 1979.

Em setembro de 2002, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. Em agosto de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Ciência da Nutrição na Universidade Federal de Viçosa onde concentrou seus estudos na área de Valor nutricional de alimentos e dietas concluindo o mesmo em 2005.

No período de 2005 a 2008 atuou como professora da rede privada em cursos superiores de Nutrição. Em 2008 foi professora assistente do departamento de Nutrição da Universidade Federal do Mato Grosso. Desde 2009, atua como professora no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas, IF Sudeste MG, *Câmpus* Rio Pomba, onde ministra disciplinas e desenvolve pesquisas nas áreas de panificação.

Em 2011, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa concentrando seus estudos na avaliação de inocuidade e adição de proteínas estruturadoras de gelo em massas de pão francês.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Mercado de pão francês	4
3.2. Efeito do congelamento da massa na qualidade de pães	5
3.3. Tratamentos que minimizam os efeitos do congelamento	7
3.4. Proteínas estruturadoras de gelo: mecanismos de ação	9
3.5. Proteínas estruturadoras de gelo em cereais	11
3.6. Uso de proteínas estruturadoras de gelo em alimentos	12
3.7. Segurança toxicológica	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Delineamento experimental	16
4.2. Material experimental	16
4.3. Esquema do trabalho	17
4.4. Preparação dos extratos de proteínas estruturadoras de gelo	18
4.5. Identificação das proteínas estruturadoras de gelo	19
4.6. Análise da composição físico-química dos extratos	19
4.6.1. Análise do conteúdo de sólidos totais	19
4.6.2. Análise do conteúdo de proteínas brutas totais	20
4.6.3. Análise do conteúdo de cinzas totais	20

4.7. Avaliação do uso agudo e sub-crônico dos extratos de proteínas estruturadoras de gelo _____	21
4.7.1. Local de realização do experimento _____	21
4.7.2. Animais e procedimentos experimentais _____	21
4.7.3. Componentes séricos _____	23
4.7.4. Peso absoluto e relativo dos órgãos _____	24
4.7.5. Análise histológica e morfometria _____	24
4.8. Preparação da massa congelada _____	25
4.9. Avaliação física dos pães _____	27
4.9.1. Volume específico _____	27
4.9.2. Análise de cor _____	27
4.9.3. Análise de perfil de textura _____	27
4.10. Composição centesimal _____	27
4.10.1. Umidade _____	27
4.10.2. Proteína bruta _____	28
4.10.3. Lipídios _____	28
4.10.4. Cinzas _____	28
4.10.5. Fibra alimentar total _____	28
4.10.6. Carboidratos disponíveis _____	31
4.11. Estudo da qualidade protéica dos pães elaborados com extratos de proteínas estruturadoras de gelo _____	31
4.11.1. Animais e dietas experimentais _____	31
4.11.2. Coeficiente de eficiência alimentar _____	32
4.11.3. Coeficiente de eficiência protéica e razão protéica líquida _____	33
4.11.4. Digestibilidade verdadeira _____	33
4.12. Aspectos éticos _____	33
5. ARTIGO I: INOCUIDADE AGUDA E SUB-CRÔNICA DO EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO DE FOLHAS DE TRIGO. _	35
Resumo _____	35
Abstract _____	36
5.1. Introdução _____	37

5.2. Material e métodos _____	38
5.2.1. Obtenção e caracterização dos extratos _____	38
5.2.2. Animais _____	39
5.2.3. Procedimentos experimentais _____	39
5.2.4. Análise histológica e morfométrica _____	40
5.2.5. Análise estatística _____	41
5.3. Resultados _____	41
5.3.1. Caracterização do extrato _____	42
5.3.2. Avaliação da inocuidade aguda _____	42
5.3.3. Avaliação da inocuidade sub-crônica _____	47
5.4. Discussão _____	52
5.5. Conclusão _____	56
6. ARTIGO II: EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO DE FOLHAS DE TRIGO MELHORA AS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DO PÃO FRANCÊS E NÃO ALTERA AS PROPRIEDADES QUÍMICAS E NUTRICIONAIS _____	57
Resumo _____	57
Abstract _____	58
6.1. Introdução _____	59
6.2. Material e Métodos _____	60
6.2.1. Extrato de proteínas estruturadoras de gelo _____	61
6.2.2. Preparo da massa _____	61
6.2.3. Avaliação físico-química de pão francês elaborados com extrato de proteínas estruturadoras de gelo _____	62
6.2.4. Análise de perfil de textura do miolo _____	63
6.2.5. Estudo da qualidade protéica de pão francês elaborado com extrato de proteínas estruturadoras de gelo _____	63
6.2.6. Análise estatística _____	65
6.3. Resultados _____	66
6.3.1. Análise físico-química dos pães _____	66
6.3.2. Análise do perfil de textura do miolo _____	67

6.3.3. Qualidade protéica _____	68
6.4. Discussão _____	70
6.5. Conclusão _____	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS _____	74
8. ANEXO I _____	76
9. REFERÊNCIAS _____	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formulação da massa de pão francês _____	26
Tabela 2: Composição das dietas experimentais (g / 100 g). _____	32
Tabela 3: Valores de médias e desvio padrão do conteúdo de sólidos totais (mg / 100 g), proteína bruta (mg / 100 g) e cinzas (%) dos extratos de ISP utilizados no experimento biológico. _____	42
Tabela 4: Valores de médias e desvio padrão do consumo total de dieta (g), ganho de peso total (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais durante 14 dias (n=6). _____	44
Tabela 5: Valores de médias e desvio padrão do peso absoluto (g) e relativo (g / 100 g corporais) dos órgãos dos animais controle e dos tratados com ISP Endurance e Ok Bullet, concentrações de 40 e 80 mg.kg ⁻¹ , após 14 dias (n= 6). _____	44
Tabela 6: Valores de médias e desvio padrão referente ao volume (µm ³) dos hepatócitos, núcleo e citoplasma no tecido hepático dos animais experimentais após 14 dias de administração _____	46
Tabela 7: Valores de médias e desvio padrão do consumo total de dieta (g), ganho de peso total (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais dos grupos experimentais durante 13 semanas. ____	48
Tabela 8: Valores de médias e desvio padrão do peso absoluto e relativo (g / 100 g corporais) dos órgãos dos animais dos grupos experimentais após 13 semanas de experimento. _____	48
Tabela 9: Valores de médias e desvio padrão das variáveis bioquímicas do sangue dos animais experimentais após 13 semanas de tratamento. _____	49
Tabela 10: Valores de médias e desvio padrão referente ao volume (µm ³) dos hepatócitos, núcleo e citoplasma no tecido hepático dos animais experimentais tratados por 13 semanas. _____	51
Tabela 11: Composição centesimal (base úmida) dos pães controle e elaborados com extrato de ISP obtido da folha de duas cultivares de trigo, na concentração de 8 mg / 100 g de massa. Valores apresentados em média ± desvio padrão. (n=3) _____	66

- Tabela 12: Valores de médias e desvio padrão de volume (mL), volume específico (mL / g) e análise de cor dos pães controle e pães contendo 8 mg / 100 g de massa de ISP obtido de folhas de trigo de duas cultivares (n=3). _____ 67
- Tabela 13: Valores de médias e desvio padrão do consumo total de dieta (g), ganho de peso total (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais durante 14 dias (n=6). _____ 69
- Tabela 14: Valores de médias e desvio padrão do consumo de proteína (g), coeficiente de eficiência protéica (PER), razão protéica líquida (NPR), digestibilidade verdadeira (DV) das dietas experimentais contendo caseína e pão francês, com e sem adição de ISP e o peso das fezes secas (g) dos animais experimentais. _____ 70
- Tabela 15: Valores de médias e desvio padrão dos pesos absoluto e relativo (g / 100 g corporais) dos órgãos dos animais experimentais após 14 dias (n= 6). _____ 70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Formação dos cristais de gelo em presença das ISP. Fonte: Hoshino et al., 1999. _____ 10
- Figura 2: Esquema do trabalho e distribuição do conteúdo dos artigos____ 18
- Figura 3: Esquema experimental do estudo de inocuidade do extrato de ISP de folhas de trigo das cultivares Endurance e Ok Bullet. _____ 22
- Figura 4: Esquema experimental do estudo de qualidade protéica de pão francês com e sem adição de extrato de ISP. _____ 31
- Figura 5: Perfis protéicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos pelas cultivares de trigo (Ok Bullet e Endurance). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos. _____ 42
- Figura 6: Efeito do extrato de ISP Endurance e Ok Bullet, concentrações de 40 e 80 mg.kg⁻¹, no peso corpóreo dos animais experimentais durante 14 dias (n= 6). _____ 43
- Figura 7: Avaliação histológica do rim direito dos animais experimentais após 14 dias da administração dos extratos. A- Fotomicrografia de plano transversal demonstrando os glomérulos renais, seus corpúsculos de Malpighi (CM) e emaranhado capilar glomerular (ECG) (HE 200X). B- Média e desvio padrão do número de glomérulos por campo e dos diâmetros das estruturas renais. _____ 45
- Figura 8: A- Fotomicrografia do tecido hepático indicando a proporção de capilares sinusóides, núcleo e citoplasma dos hepatócitos. (HE 200X). B- Efeito da administração aguda de ISP Endurance e Ok Bullet, nas concentrações de 40 e 80 mg.kg⁻¹, após 14 dias, nas proporções das estruturas hepáticas dos animais experimentais.46
- Figura 9: Efeito do extrato de ISP Endurance e Ok Bullet no peso corpóreo dos animais experimentais durante 13 semanas (n= 8). _____ 47
- Figura 10: Avaliação histológica do rim direito dos animais experimentais tratados com extrato de ISP por 13 semanas. A- Fotomicrografia

de plano transversal demonstrando os glomérulos renais e seus corpúsculos de Malpighi (CM) e emaranhado capilar glomerular (ECG) (HE 200X). B- Média e desvio padrão dos diâmetros das estruturas renais e do número de glomérulos por campo. _____ 50

Figura 11: A- Fotomicrografia do tecido hepático indicando a proporção de capilares sinusóides, núcleo e citoplasma dos hepatócitos dos animais experimentais após 13 semanas de tratamento (HE 200X). B- Efeito da administração sub-crônica de ISP Endurance e Ok Bullet por 13 semanas, nas proporções das estruturas hepáticas dos animais experimentais. _____ 51

Figura 12: Avaliação histológica do baço dos animais experimentais tratados com extrato de ISP por 13 semanas. A- Fotomicrografia de baço demonstrando os centros germinativos. (HE 200x). B- Média e desvio padrão do perímetro e área dos centros germinativos. _ 52

Figura 13: Perfis protéicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos pelas cultivares de trigo Ok Bullet e Endurance. Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). _____ 61

Figura 14: Análise de perfil de textura do miolo de pães elaborados com e sem extrato de ISP da folha do trigo de duas cultivares, elaborados com massa congelada por 30 dias. Valores de média e desvio padrão. _____ 68

Figura 15: Efeito do consumo de pão com extrato de ISP no peso corpóreo dos animais experimentais durante 14 dias (n= 6). _____ 69

RESUMO

QUEIROZ, Isabela Campelo de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2015. **Extrato de proteínas estruturadoras de gelo de folhas de trigo: avaliação da inocuidade e efeitos nas propriedades tecnológicas e nutricionais de pão francês.** Orientadora: Mônica Ribeiro Pirozi. Coorientadores: José Benício Paes Chaves e Hércia Stampini Duarte Martino.

As proteínas estruturadoras de gelo (ISP) são reconhecidas por sua capacidade de baixar o ponto de congelamento de soluções e de interferir no formato de cristais de gelo durante o congelamento, prevenindo alterações físicas em alimentos. Tais proteínas têm sido testadas em massas com resultados satisfatórios. Porém, pouco se sabe sobre a sua segurança e sua atuação em pães elaborados com massa congelada. O extrato de proteína estruturadora de gelo obtida de folhas de duas cultivares de trigo (Endurance e Ok Bullet) foi testado quanto a sua inocuidade em ratos Wistar machos de forma aguda, na dosagem de 40 ou 80 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de peso corporal (14 dias) e de forma sub-crônica na dosagem de 114 µg.kg⁻¹.dia⁻¹ (90 dias), e quanto ao seu efeito (8 mg / 100 g de massa) crioprotetor nas propriedades físico-químicas, textura e na qualidade protéica do pão francês elaborado com massa congelada, a -18 °C por 30 dias, em comparação ao pão controle (sem adição de extrato). A administração de doses agudas, 350 a 700 vezes maior que a quantidade utilizada no preparo de 100 g de pão francês, dos extratos de ISP não causou letalidade. O uso agudo e sub-crônico do extrato de ISP das cultivares Endurance e Ok Bullet não comprometeu o peso corporal, o consumo alimentar e o coeficiente de eficiência alimentar ($p > 0,05$). No teste agudo os pesos relativos dos órgãos dos animais dos grupos teste não diferiram do controle, mas o grupo que recebeu ISP Ok Bullet na dose 80 mg / kg aumentou a proporção do núcleo dos hepatócitos. No teste sub-crônico, o rim dos animais dos grupos Endurance e Ok Bullet apresentaram menor peso corporal ($p < 0,05$) que os animais do grupo controle. Na dosagem sub-crônica, foi verificada uma redução nos níveis de uréia, magnésio e fósforo, redução do volume dos hepatócitos, sem alterações na morfometria renal e nas transaminases

séricas em ambas as cultivares do trigo. No entanto, houve redução na albumina do grupo Endurance e de bilirrubina no grupo Ok Bullet. Houve hiperplasia dos centros germinativos do baço no grupo ISP Ok Bullet. A adição de ISP, independente da cultivar do trigo, melhorou o volume específico e as variáveis de textura ($p < 0,05$), resiliência e adesividade, dos pães após o congelamento e não interferiu na composição centesimal, coloração, nem nos índices de qualidade das proteínas do pão francês, em comparação aos pães controle ($p > 0,05$). A adição das proteínas estruturadoras de gelo da cultivar Ok Bullet e Endurance também não alterou o peso do fígado e do rim dos animais. Portanto, as ISP de ambas as cultivares, administrada de forma aguda se mostraram inócuas em ratos Wistar, na dose de $40 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, enquanto o uso sub-crônico revelou algumas alterações celulares e séricas, porém não indicativas de toxicidade. Enquanto a utilização de $8 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ de massa, de ambas as cultivares, foi eficiente na melhora das propriedades físicas dos pães elaborados com massa congelada, sem alterar as propriedades químicas e a qualidade protéica.

ABSTRACT

QUEIROZ, Isabela Campelo de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2015. **Evaluation of acute and chronic toxicological harmlessness of ice structuring proteins obtained from wheat leaves.** Adviser: Mônica Ribeiro Pirozi. Co-Advisers: José Benicio Paes Chaves and Hércia Stampini Duarte Martino.

Ice structuring proteins are recognized for their ability to lower the freezing point of solutions and to affect ice crystals size formed during freezing, preventing physical changes in food. Such proteins have been tested on dough with satisfactory results. However, little is known about their safety and how they affect bread made from frozen dough. Ice structuring protein (ISP) obtained from leaves of two wheat cultivars (Endurance and OK Bullet) was tested for its harmlessness in male Wistar rats, acutely at a dose of 40 or 80 mg.kg⁻¹.day⁻¹ of body weight (14 days) and sub-chronically at a dose of 114 µg.kg⁻¹.day⁻¹ (90 days), and was tested for its cryoprotectant effect (8 mg / 100 g of dough) on the physicochemical properties, the texture and the protein quality of French bread made from frozen dough, kept at -18 °C for 30 days, compared to a control bread (no added extract). Administration of acute doses of ISP extracts, 350 - 700 times greater than the amount used in the preparation of 100 g of French bread, did not cause lethality. Acute and sub-chronic use of ISP from the Endurance and Ok Bullet cultivars did not affect body weight, food consumption or the food efficiency coefficient ($p > 0.05$). In the acute test, the relative weights of the organs of the animals from the test groups did not differ from those of the control group, but the nucleus proportion of the hepatocytes increased in the group that received Ok Bullet ISP at a dose of 80 mg / kg. In the sub-chronic test, the kidneys of the animals in the Endurance and Ok Bullet groups presented a lower weight ($p < 0.05$) than those in the control group. At the sub-chronic dose, a reduction in levels of urea, magnesium and phosphorus was observed in both wheat cultivars, as well as a reduction in the volume of the hepatocytes, without changes to the renal morphology or transaminases serum. However, there was a reduction in albumin in the Endurance group and bilirubin in the Ok Bullet group. There was hyperplasia in the germinal centers of the spleen in

the Ok Bullet ISP group. The addition of ISP, regardless of the wheat cultivar, improved the specific volume and the texture variables ($p < 0.05$), and the resilience and adhesiveness of the bread after freezing, and did not interfere with the proximate composition, color, or protein quality indices of the French bread, compared to the control bread ($p > 0.05$). The addition of the ice structuring proteins from the Ok Bullet and Endurance cultivars also did not change the weight of the liver or kidneys of the animals. Therefore, the ISP of both cultivars, administered acutely, proved harmless in Wistar rats at a dose of $40 \text{ mg.kg}^{-1}\text{day}^{-1}$, while sub-chronic use revealed some cell and serum changes, although not indicative of toxicity. The use of $8 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ of dough, from both cultivars, was effective in improving the physical properties of the bread made from frozen dough, without changing the chemical properties or the protein quality.

1. INTRODUÇÃO

Com o crescente número de padarias instaladas nas redes de supermercados, com espaço físico limitado e a dificuldade de produção de pão fresco a toda momento, o uso de massa congelada é uma tendência para o mercado de panificação. O uso da massa congelada facilita o funcionamento das padarias, pois não exige maquinário completo, nem funcionamento noturno e garante o pão fresco, independente do trabalho do padeiro.

A produção de pães elaborados com massas congeladas pode resultar em sérios problemas para a qualidade, dentre eles: redução na força da massa, alteração na estrutura da massa e do miolo e morte antecipada de leveduras, com conseqüente redução do poder fermentativo. A perda da qualidade desses pães envolve mudanças reológicas na massa como resultado do transporte de água e do tamanho dos cristais de gelo formados durante o congelamento.

Para preservar a integridade do glúten e também compensar a alta mortalidade de leveduras, pesquisas focam no desenvolvimento e aplicação de diferentes aditivos, visando melhorar a qualidade e aumentar a vida de prateleira do pão produzido com massa congelada. Reforçadores de massa, emulsificantes e hidrocoloides são muito usados para diminuir os efeitos deletérios na estrutura da massa, enquanto sais nutrientes e maior quantidade de fermento são indispensáveis para garantir fermentação adequada.

Um aditivo potencial que vem sendo estudado são as proteínas estruturadoras de gelo, reconhecidas pela propriedade de baixar o ponto de congelamento da massa, retardando a cristalização da água, e interferindo no formato dos cristais de gelo, preservando as características físicas e melhorando os aspectos de textura. Tais proteínas têm sido testadas em massas com resultados satisfatórios.

Porém, pouco se sabe sobre a segurança na utilização dessas proteínas, bem como seu potencial toxicológico. A hipótese do estudo baseia-se no uso do extrato de proteínas estruturadoras de gelo obtido de

folhas de trigo na melhora das propriedades físicas do pão francês sem alterar a composição química, o aspecto e a segurança do mesmo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a inocuidade aguda e sub-crônica de proteínas estruturadoras de gelo, obtidas de folhas de duas cultivares de trigo, e seu efeito crioprotetor na produção de pão francês com massa congelada.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair as proteínas estruturadoras de gelo de folhas de trigo;
- Identificá-las por eletroforese em SDS-PAGE;
- Analisar a composição físico-química dos extratos de proteínas estruturadoras de gelo;
- Investigar a inocuidade, de forma aguda e sub-crônica, do extrato de proteínas estruturadoras de gelo em ratos Wistar;
- Elaborar massas de pão francês contendo extrato de proteínas estruturadoras de gelo para armazenamento sob congelamento;
- Avaliar a composição centesimal e as características tecnológicas do pão francês contendo proteínas estruturadoras de gelo a partir de massas congeladas;
- Avaliar a qualidade protéica do pão francês contendo proteínas estruturadoras de gelo em ratos Wistar.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Mercado de pão francês

Um levantamento do Instituto Tecnológico de Panificação e Confeitaria (ITPC) em parceria com a Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (Abip), por meio de pesquisa em mais de 1.200 empresas de todo o país, abrangendo representantes do setor de todos os portes, revelou o desempenho do setor de panificação em 2014. O índice de crescimento das empresas de Panificação e Confeitaria em 2014 foi de 8,02% com o faturamento atingindo R\$ 82,5 bilhões (PROPAN, 2015).

Entre 2010 e 2014, o faturamento das empresas de Panificação e Confeitaria cresceu 46,5 %. Por outro lado, os custos aumentaram 48,5 % no mesmo período. O setor passa ainda por um momento de formalização de várias empresas e isso trouxe maior impacto dos impostos sobre o faturamento. O gasto com pessoal também subiu de 2010 a 2014, 50,2 %. Os gastos com energia aumentaram 18,5 % e com embalagens, 16,3 %, nesse intervalo. De 2012 a 2014, o custo total aumentou 19,5 % no setor (PROPAN, 2015).

O uso de massa congelada de pão permite maior controle dos gastos e menor custo de produção, facilitando o funcionamento das padarias. Não exige um funcionamento noturno, reduzindo, portanto, as despesas com adicional noturno e energia, garantindo o pão fresco, que é uma exigência dos consumidores, a todo o momento independente do trabalho do padeiro e do horário da compra (RASANEN et al., 1995). Além disso a massa congelada garante melhor padronização do produto.

O congelamento é um método de preservação muito utilizado e é empregado para retardar alterações na qualidade dos alimentos. Este processo garante, ainda, uma larga produção de pães em locais centrais para posterior distribuição aos consumidores, envolvendo grandes benefícios econômicos (CHEN et al., 2013). Por estas razões, o mercado para produtos de panificação congelados tem crescido rapidamente e sendo pesquisado e ampliado em diversos países.

Apesar do pão produzido de massa congelada ter sido aprimorado pelos avanços tecnológicos e diferentes formulações ainda apresentam problemas como fermentação prolongada, baixo volume, sabor e aroma prejudicados (MATUDA et al., 2004). O congelamento provoca o enfraquecimento da estrutura da massa causado pela ruptura da matriz protéica que reduz a retenção de gás, e diminui o número de leveduras viáveis para fermentação (MEZIANI et al., 2012).

3.2. Efeito do congelamento da massa na qualidade de pães

A perda da qualidade de pães elaborados com massa congelada envolve mudanças reológicas na massa. Isto é atribuído à formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento e ao fenômeno de recristalização do gelo que altera o número, tamanho e formato destes cristais, causando danos na matriz alimentícia (BARCENAS e ROSEL, 2006).

Vários problemas decorrentes da produção de pão com massa congelada têm sido descritos. Esses incluem uma perda gradual da força da massa; mudanças na sua estrutura, causando diminuída capacidade de retenção de CO₂; redução da atividade fermentativa; menor volume e deterioração na textura do produto final (SELOMULYO e ZHOU, 2007).

A perda da força da massa tem sido atribuída a vários fatores, tais como a redução da ligação cruzada da rede de glúten causada pela recristalização do gelo e a redistribuição de água provocada pela modificação na sua capacidade de ligação com os componentes da massa (SELOMULYO e ZHOU, 2007). Wang e colaboradores (2014) avaliaram a estrutura secundária, propriedade microscópica do glúten, dentre outros fatores, em massa de pão congelada e verificaram que a conformação e as propriedades microscópicas do glúten foram significativamente afetadas durante o congelamento.

Essa modificação na estrutura da massa é devida formação de cristais de gelo que causam uma interrupção na matriz do glúten resultando em uma rede menos contínua, mais separada dos grânulos de amido. A heterogeneidade da matriz do glúten diminui sua capacidade de reter gás

carbônico e essas características estruturais ajudam a explicar o menor volume do pão quando elaborado com massa congelada. Os grânulos de amido também são danificados por meio da formação de grandes cristais na massa durante a recristalização, novamente contribuindo para a diminuição da habilidade do glúten de reter gás durante a fermentação (BERGLUND et al., 1991). E com mais amido danificado na massa é possível que a água seja atraída do glúten para os grânulos de amido (SELOMULYO e ZHOU, 2007), uma vez que o amido danificado apresenta uma alta capacidade de absorção de água.

Nesse caso, a formação de grandes cristais de gelo é que será a responsável pelas modificações na estrutura. Grandes cristais preenchem os espaços celulares causando dano à parede celular (MUTHUKUMARAPPAN e MARELLA, 2007). O crescimento destes cristais é um dos fatores que poderão afetar a vida de prateleira e armazenamento sob congelamento do pão, uma vez que esse crescimento dos cristais durante o estoque causa perda da estrutura do miolo por meio do dano nas paredes celulares e desorganização da estrutura interna (CAUVIN e YOUNG, 1998).

Na revisão feita em 2007, Selomulyo e Zhou, discutem as possíveis causas do longo tempo de fermentação e do reduzido número de células viáveis em massas congeladas. O congelamento e o estoque congelado da massa podem reduzir pela metade o número original de células em poucos meses. O dano causado às células de leveduras, durante o congelamento das massas, pode ser devido ao aumento da concentração de compostos orgânicos na fase aquosa possibilitando uma autólise das leveduras. O poder de produção de gás também é afetado por meio do congelamento.

Mais uma vez, o responsável por essas alterações são os grandes cristais de gelos, formados durante o congelamento lento. A velocidade de resfriamento propicia a formação de poucos núcleos de gelo que podem crescer posteriormente, formando cristais grandes. À medida que estes cristais são formados fora das células de leveduras, o fluido no qual elas se encontram torna-se mais concentrado, criando-se um gradiente de concentração que provoca a saída de água do interior da levedura para o meio, através da membrana celular. Em consequência, o volume das células é reduzido, como resultado da morte de um número significativo de

leveduras. Por outro lado, quando a suspensão de células é resfriada muito rapidamente, não há tempo para a água do interior da levedura fluir para o meio circundante, formando cristais de gelo dentro das células (CAETANO, 2000).

Phimolsiripot et al. (2008) estudaram o efeito do congelamento e da flutuação de temperatura durante a estocagem de massa congelada na qualidade do pão. Eles verificaram que o congelamento e a flutuação de temperatura levam uma perda de qualidade do pão devido a uma baixa produção de CO₂, uma redução da viabilidade das leveduras e menor volume específico, além do aumento da firmeza da casca e perda de peso. Meziani et al., em 2012, avaliaram o efeito do congelamento a - 20, - 30 e - 40 °C em massa de pão doce e verificaram que a viabilidade das leveduras foi reduzida significativamente, causando uma redução de 70 % da população de leveduras.

3.3. Tratamentos que minimizam os efeitos do congelamento

Ainda em sua revisão, Selomulyo e Zhou (2007) apresentaram pesquisas que focam no desenvolvimento e aplicação de diferentes aditivos para melhorar a qualidade do pão e aumentar a vida de prateleira do pão produzido com massa congelada. Quando melhoradores ou agentes de reforço da massa são usados, a matriz de massa de pão é reforçada e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de reter o gás, havendo, portanto, um incremento no volume do pão.

Dentre os métodos de conservação utilizados no setor de panificação, os mais usados são a adição de conservantes químicos à massa e a preservação dos produtos a baixas temperaturas. Os principais aditivos utilizados na panificação, e que também podem ser chamados de melhoradores, são os emulsificantes, hidrocolóides, as enzimas e os reforçadores de massa (CONTADO et al., 2009).

Os emulsificantes são moléculas ativas que aderem à superfície das gotículas formadas durante a homogeneização e constituem, assim, uma membrana protetora que impede que as gotículas se aproximem o suficiente, evitando a agregação. Por sua natureza anfifílica, reduzem a

tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão (ARAUJO, 2004). São usados na panificação para minimizar o envelhecimento dos pães, melhorar o manuseio e a força da massa, aumentar a tolerância ao tempo de descanso e de fermentação, entre outras características (MATUDA, 2008).

Selomulyo e Zhou (2007) relacionam o efeito dos emulsificantes em retardar o envelhecimento com a interação do mesmo com o amido, retardando o processo de retrogradação. Os emulsificantes interagem, também, com as proteínas, fortalecendo a massa e aumentando a habilidade do glúten de formar um filme que auxilia na retenção de gás (MATUDA, 2008). Eles, ainda, podem interagir com os lipídeos adicionados para reduzir a tensão superficial de bolhas de gases resultando em um maior número de bolhas pequenas (SELOMULYO e ZHOU, 2007). Dois emulsificantes muito utilizados são os ésteres de ácido diacetil tartárico de mono e diglicerídios (DATEM) e o Estearoil-2-lactilato.

Outro grupo de aditivos muito usados na indústria de alimentos são os hidrocolóides. São um importante grupo de polissacarídeos não estruturados, hidrofílicos, em geral ramificados, de alta massa molecular, sendo úteis para estabilizar emulsão do tipo óleo/água (RUPEREZ e BRAVO, 2001; ARAUJO, 2004). Estes compostos são capazes de controlar ambos a reologia e a textura de sistemas aquosos através da estabilização de emulsões, suspensões e espumas, pela modificação das propriedades reológicas da fase aquosa contínua (ARAUJO, 2004; SELOMULYO e ZHOU, 2007).

Na panificação, os hidrocolóides são de crescente importância como melhoradores de pão. Eles afetam a performance da massa e também aumentam a vida de prateleira. Influenciam nos processos de gelatinização, fragmentação e retrogradação do amido. O sinergismo entre hidrocolóides e amido pode ser devido à formação de complexos entre os polímeros de amido (amilose e amilopectina) e o hidrocolóide durante a formação da pasta de amido. Quando usados em pequenas quantidades (< 1 % p/p na farinha) na massa, eles aumentam a retenção de água e o volume do pão, bem como diminuem a retrogradação do amido e a firmeza do pão (SELOMULYO

e ZHOU, 2007). Alguns tipos de hidrocolóides utilizados são a goma xantana e goma guar.

Os agentes oxidantes e reforçadores de massas, tais como ácido ascórbico, visam o fortalecimento das cadeias de glúten, tornando-o mais forte e mais resistente aos efeitos da fermentação, melhorando a estrutura e o volume final do pão, e aumentando a força da massa (SELOMULYO e ZHOU, 2007; BONA, 2002). Agem como antioxidantes, pois são compostos que atuam diretamente sobre a estrutura das proteínas do glúten, oxidando os grupos sulfidril (-S-H-) e formando ligações dissulfídicas (-S-S-) entre as cadeias de proteína, reforçando a rede de glúten. Estas ligações formadas afetam a reologia da massa diminuindo a sua extensibilidade. Como consequência direta da ação dos agentes oxidantes sobre o glúten, observa-se o aumento da capacidade de retenção de CO₂, o que resulta em pães com maior volume e com alvéolos melhor distribuídos no miolo (SOUSA, 2012).

Um novo aditivo potencial que vem sendo estudado são as proteínas estruturadoras de gelo, que são reconhecidas pela habilidade de inibir a formação de cristais de gelo em organismos resistentes ao congelamento (DAVIES, 2013).

3.4. Proteínas estruturadoras de gelo: mecanismos de ação

Organismos que vivem sob condições climáticas extremas, em temperaturas abaixo de 0 °C, desenvolvem diferentes mecanismos de adaptação ao frio, dentre elas o desenvolvimento de proteínas específicas (JORGENSEN et al., 2008). Conhecidas anteriormente como proteínas anticongelantes, as proteínas estruturadoras de gelo (*ice structuring proteins* - ISP) pertencem a uma família de proteínas com capacidade de controlar o crescimento de cristais de gelo com grande potencial de aplicação em indústrias de alimentos (BRASLAVSKS et al., 2013).

Durante o crescimento dos cristais as ISP se ligam na face prisma do cristal, deixando a face basal liberada para o crescimento. Em soluções ausentes de ISP, o crescimento dos cristais de gelo acontece ao longo do eixo a, originando cristais mais arredondados; já na presença das ISP, o

crescimento ocorre ao longo do eixo c, resultando assim em cristais na forma piramidal (Figura 1) (HOSHINO et al., 1999). Ao longo dos estudos, tem se observado que o formato e o tamanho dos cristais de gelo estão relacionados com a acomodação dos líquidos ao redor da interação cristais de gelo e ISP (HASSAS-ROUDASARI, 2011).

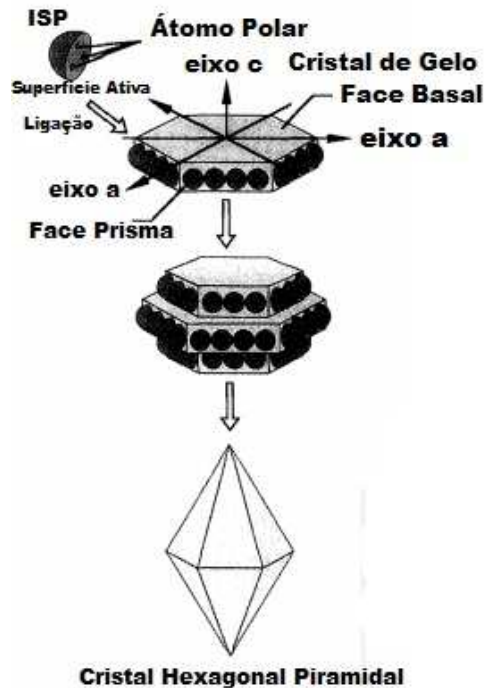


Figura 1: Formação dos Cristais de Gelo em presença das ISP. Fonte: Hoshino et al., 1999.

Para a maioria das ISP, o mecanismo de ação principal da recristalização é o mecanismo migratório (ZACHARIASSEN e KRISTIANSEN, 2000; ATICI e NALBANTOGLU, 2003), no entanto, vários mecanismos podem ocorrer ao mesmo tempo. Portanto, alguns estudiosos sugerem que o conceito de recristalização deva ser reformulado, como um processo que gera o crescimento de cristais de gelo maiores ao custo da reestruturação dos cristais menores (HASSAS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

Diversas pesquisas têm mostrado que as ISP diminuem a temperatura de expansão macroscópica do gelo abaixo da temperatura de congelamento, sem afetar o ponto de fusão e a pressão osmótica. A elucidação deste mecanismo de inibição tem envolvido estudos sobre a massa molecular, a sequência de aminoácidos e as estruturas de conformação (BARRETT, 2001).

Segundo Pirozi e MacRitchie (2002), as ISP são principalmente reconhecidas por sua capacidade em reduzir o ponto de congelamento da água sem alterar o equilíbrio com o ponto de fusão; esse mecanismo acontece de uma forma não coligativa. Outra propriedade dessas proteínas é o retardamento da recristalização durante o armazenamento em temperaturas de congelamento. A recristalização já discutida anteriormente promove o aparecimento de cristais maiores à custa de cristais menores que tendem a desaparecer ao longo desse processo (HASSAS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

3.5. Proteínas estruturadoras de gelo em cereais

Ao estudar os cereais em relação à presença das ISP, o centeio, o trigo e a cevada tem sido os mais explorados, tanto o grão quanto as folhas, uma vez que as ISP são sintetizadas nesses organismos para auxiliar a tolerância ao frio. A proteína extraída dessas fontes apresenta massa molecular em torno de 11 e 36 kDa, e sem predominância de aminoácido específico (CREVEL, FEDYK e SPEURGEON; 2002).

Hon et al. (1994), visando estudar as ISP, extraíram, isolaram, identificaram e caracterizaram as proteínas individuais presentes no extrato apoplástico obtido das folhas de centeio de inverno. Tais pesquisadores observaram que uma maior concentração e maior atividade anticongelante foram obtidas quando o processo de extração foi realizado com ácido ascórbico acrescido de cloreto de cálcio ou sulfato de magnésio. Eles concluíram, ainda, que a aclimação das folhas ao frio proporcionou a produção de múltiplos polipeptídeos com atividade anticongelante com características distintas daqueles obtidos de peixes e insetos.

Antikainem e Griffith (1997) examinaram o acúmulo de proteínas no apoplasto de plantas durante a aclimação ao frio por sete semanas, por meio de eletroforese em SDS-PAGE. Analisaram também a tolerância ao frio destas plantas, assim como a relação entre a atividade anticongelante e a tolerância ao frio. Após aclimação ao frio, o centeio e o trigo de inverno demonstraram serem as plantas mais tolerantes ao frio, e suas folhas foram capazes de sobreviver a temperaturas de - 27 °C e - 20 °C, respectivamente.

Além disso, as folhas de todos os cereais, tanto de primavera quanto de inverno, foram tolerantes ao frio nas faixas de – 10 °C até – 27 °C, e seus extratos exibiram atividade anticongelante. Concluiu-se que a acumulação das proteínas obtidas do apoplasto está relacionada com a tolerância ao frio pelos cereais.

Atici e Nalbantoglu (2003) investigaram o efeito das proteínas produzidas no apoplasto de trigo de inverno e repolho e a relação destas na tolerância das folhas ao congelamento durante a aclimação ao frio. Lesões provocadas devido ao congelamento e à atividade de nucleação do gelo também foram determinadas durante as condições de aclimação. As proteínas do apoplasto foram precipitadas e utilizadas na investigação da atividade de nucleação de gelo. O resultado desse estudo demonstrou que a atividade de nucleação de gelo é menor quando as proteínas utilizadas são extraídas das folhas que passaram por aclimação ao frio. Concluiu-se que as folhas de ambas as plantas são capazes de acumular proteínas estruturadoras de gelo.

3.6. Uso de proteínas estruturadoras de gelo em alimentos

A aplicação das ISP como agente de preservação de alimentos tem demonstrado um potencial aumento na qualidade de alimentos congelados, pois uma das vantagens para a indústria de alimentos é o fato dessas proteínas serem ativas em quantidades muito pequenas (HASS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

As ISP podem diminuir o ponto de fusão dos alimentos e inibir o crescimento e recristalização da água durante o congelamento (XU et al., 2009). Elas modificam o formato dos cristais de gelo durante a estocagem e transporte sob congelamento e ciclos de congelamento e descongelamento, prevenindo a perda na textura dos alimentos, ou seja, são capazes de reduzir os danos celulares e também a perda de nutrientes pela saída de água dos alimentos (KIANI e SUN, 2011). E apresentam efeito protetor contra morte de leveduras, uma vez que reduzem o congelamento intracelular.

Regand e Goff (2006) adicionaram a uma mistura de sorvete um extrato obtido das folhas do trigo de inverno que continha proteínas estruturadoras de gelo e compararam essa mistura com um padrão que não continha as proteínas. Constataram que as misturas com o extrato reduziram o crescimento dos cristais de gelo quando comparados com o controle, evidenciando a inibição da recristalização do gelo em produtos congelados.

Estudos (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008) foram desenvolvidos utilizando proteínas estruturadoras de gelo na melhora das propriedades de textura e sabor de pães de massa congelada. Nesses estudos, a suplementação com proteína estruturadora de gelo obtida do extrato protéico da cenoura diminuiu o conteúdo de água congelada na massa, resultando em efeitos benéficos tais como estabilidade do volume do pão, massa mais macia e melhora na capacidade fermentativa da massa sem influenciar negativamente no sabor do pão produzido. Estes efeitos foram associados à capacidade das proteínas estruturadoras de gelo de diminuir o ponto de congelamento e retardar fortemente a recristalização.

Em 2008, Kontogiorgos, Goff e Kasapis, investigaram o efeito das ISP extraídas do grão do trigo, em pequenos níveis (0,1 % m/m) na propriedade física da mistura de farinha e água congelada e verificaram que a estrutura da mistura continuou inalterada durante o envelhecimento quando a ISP foi utilizada. No ano seguinte (2009a), Xu e colaboradores verificaram que a adição de 0,6 % de ISP retiradas de grão de trigo de inverno em massas de pão induziu a redução do ponto de congelamento da massa.

Em 2009, Xu *et al.* investigaram as propriedades de massa em pães elaborados com 0,3 % e 0,6 % de ISP de trigo de inverno. Os resultados demonstraram que a utilização de ISP garantiu um efeito protetor na massa contra os danos causados pelo congelamento, não havendo diferença significativa no volume específico quando aumentou a concentração da ISP de 0,3 % para 0,6 %.

Vieira (2011) investigou o efeito das proteínas estruturadoras de gelo na estabilidade da massa de pão tipo francês frente ao estresse de congelamento e descongelamento. Ao longo desse estudo, foi obtido um extrato das folhas de trigo que foi adicionado às massas, que posteriormente sofreram ciclos de congelamento e descongelamento. Nessa pesquisa foi

verificada uma tendência à diminuição da sinerese quando os extratos foram adicionados nas massas, sugerindo assim um menor dano físico na estrutura da massa devido a uma possível modificação dos cristais de gelo formados durante a estocagem em baixas temperaturas e os repetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

Em 2015, Ding et al. examinaram o efeito de ISP extraída de cevada nas propriedades térmicas e estado da água nas massas durante congelamento e ciclos de congelamento-descongelamento. Eles verificaram que a adição de ISP aumentou o calor específico aparente das massas após congelamento e influenciou nas propriedades de gelatinização da massa congelada após os ciclos de congelamento-descongelamento.

3.7. Segurança toxicológica

A introdução de novas proteínas na alimentação humana pode acarretar riscos à saúde, provocando reações alérgicas em indivíduos susceptíveis (BINDSLEV-JENSEN, 2003). Portanto, antes de uma nova proteína ser incorporada em alimentos, a sua segurança deve ser avaliada. De acordo com as normas internacionais reconhecidas para produtos de biotecnologia (*Codex Alimentarius Commission, 2002*), a análise da segurança deve incluir uma avaliação do potencial de alergenicidade. Esta avaliação consiste em examinar o potencial da proteína em provocar reações no organismo e induzir uma nova resposta imune em indivíduos susceptíveis (CREVEL et al., 2007).

Uma das principais fontes de ISP na alimentação humana são peixes de água fria. Crevel et al. (2002) revisaram a exposição aguda e prolongada de ISP usando como exemplo os Estados Unidos da América, um país com moderado consumo de peixe e a Islândia, um país onde o consumo de peixe é alto. Para consumo de ISP de plantas, poucos estudos existem que possam estimar a quantidade de ingestão desta proteína. Mas, baseado na história dos consumidores, os autores concluíram que as ISP de peixes e plantas não são tóxicas. Suas características funcionais não causam nenhum efeito toxicológico adverso.

Bindslev-Jensen e colaboradores (2003) avaliaram o potencial alergênico de ISP tipo III HPLC 12, originada de peixes árticos, e demonstraram a segurança dessa proteína para pacientes com histórico de alergia a peixes, bem como para pacientes potencialmente susceptíveis a produção de IgE em resposta a essa proteína.

Essa mesma ISP foi avaliada em 2004 por Hall-Mannung et al., em estudo de toxicidade sub-crônica em ratos. Grupos de 20 ratos machos e 20 fêmeas receberam doses de 58, 290 e 580 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por gavagem por três meses e nenhum sinal de toxicidade foi notado.

De acordo com pesquisas bibliográficas, ainda não estão disponíveis estudos específicos que avaliam a toxicidade de ISP extraídas de folha de trigo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Todo o experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Para as análises de composição química dos extratos foram utilizadas três repetições e para as avaliações de sua inocuidade, foram 6 repetições no teste agudo e 8 no teste sub-crônico. As análises físico-químicas do pão francês com e sem adição de extrato de proteína estruturadora de gelo foram conduzidas com 3 repetições e os testes *in vivo* com 6 repetições. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicadas.

As análises estatísticas de todas as etapas foram realizadas no software SAS System v 9.3, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014. Os resultados encontrados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo realizado o teste “t”, a 5 % de probabilidade, quando os conteúdos de proteínas totais, sólida total e cinzas nos extratos foram significativamente diferentes; o teste de Dunnett, em nível de significância de 5 %, quando as variáveis respostas dos testes de inocuidade, composição físico-química e qualidade protéica dos pães foram diferentes ($p < 0,05$), sendo comparados os pães contendo extratos de ISP com o pão controle.

4.2. Material experimental

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de trigo: Ok Bullet e Endurance. A cultivar Endurance é uma cultivar de trigo vermelho (*Triticum aestivum* L.) classificado como duro e de inverno. Possui a capacidade de resistir a pH baixos do solo e de ser tolerante ao frio. A cultivar Ok Bullet é um trigo vermelho duro de inverno, mas ao contrário da Endurance, não é tolerante ao frio. As sementes foram fornecidas pelo USDA (*United States Department of Agriculture*).

As sementes selecionadas foram semeadas em vasos plásticos de aproximadamente 3 L, contendo de 8 a 10 sementes. O solo utilizado composto de uma mistura denominada Osmocote Plus 15-9-12 (Scotts Fertilizer). Essa mistura possuía fertilizantes encapsulados que eram liberados vagarosamente no solo, dispensando irrigação com fertilizantes. Ao longo de 2 a 3 dias as plantas foram irrigadas apenas com água, isso independentemente do regime de luz e temperatura.

As plantas cresceram sob condições aclimatadas em regime de luz (200 PAR)(PAR - Photosynthetically Active Radiation) de 10/14 h (dia/noite) em câmara de crescimento com sistema de refrigeração (4 – 7 °C, UR ± 80 %) e em condições normais de temperatura e umidade. As folhas foram colhidas com 21 dias de aclimação. Posteriormente, encaminhadas para liofilização, colocadas em tubos Falcon com tampa perfurada. Estes foram colocados em jarros de vidro (máximo de 10 tubos/jarra) no liofilizador (Marca LabConco, modelo Freezone 6 Plus 7934022 – Kansas City, MO) em temperatura de - 89 °C e vácuo de 0,014 mBar por 24 horas. Após esse tempo, os tubos foram removidos e a tampa perfurada substituída pela tampa convencional. O experimento foi conduzido no USDA e após desidratação o material foi estocado a -18 °C e enviado para o Brasil.

4.3. Esquema do trabalho

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Pesquisa de Cereais, de Amido e Farinha, de Panificação Experimental do Departamento de Tecnologia de Alimentos, e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, todos da Universidade Federal de Viçosa. Sendo estruturado em dois artigos, um em relação ao extrato de ISP de ambas as cultivares e o segundo em relação à qualidade físico-química e nutricional do pão francês elaborado com os extratos de ISP e congelado (Figura 2).

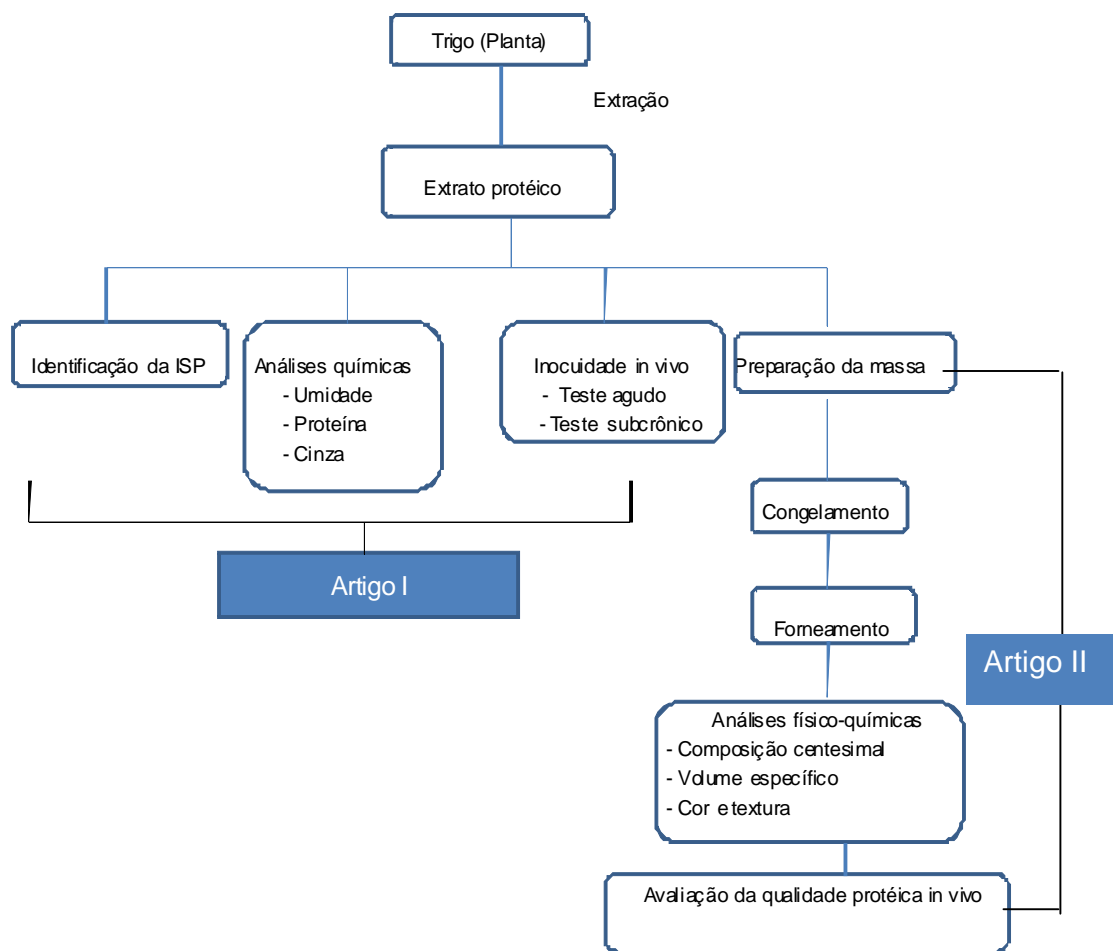


Figura 2: Esquema do trabalho e distribuição do conteúdo dos artigos

4.4. Preparação dos extratos de proteínas estruturadoras de gelo

A extração das ISP foi baseada no método de impregnação à vácuo descrito por Roudsari (2011) adaptado por Campelo (2014). As folhas colhidas foram lavadas com água destilada, cortadas com tesoura em seções de 3 cm de tamanho e impregnadas a vácuo por 30 minutos com uma solução tampão de 20 mM de ácido ascórbico (pH 3) e 20 mM de CaCl_2 , na proporção de 1:5 (amostra g: tampão g/mL). Posteriormente foram trituradas em processador de alimentos (Mixer Philips Walita), velocidade 1 por aproximadamente 2 minutos. A mistura foi centrifugada a $2000 \times g$ por 20 minutos a 4°C , o sobrenadante removido por filtração em papel filtro

Whatman nº40. O filtrado foi pasteurizado a 75 °C por 20 minutos, centrifugado a 4000 x g por 20 minutos e novamente filtrado. Os extratos assim obtidos foram acondicionados em tubos de centrifuga tipo Falcon, identificados e mantidos sob-refrigeração até realização das análises.

4.5. Identificação das proteínas estruturadoras de gelo

A distribuição das ISP nos extratos foi estudada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando o método em placa vertical, com placas 10 x 10 cm, descontínuo de baixa resolução em SDS-PAGE, descrito por Vieira (2011). Foi utilizado gel de empilhamento (“stacking gel”) de poliacrilamida a 4 % (p/v) e gel de fracionamento (“running gel”) a 15 % (p/v). A eletroforese foi conduzida em voltagem constante de 80 V por 4 horas e 30 minutos. Os padrões de baixa massa molecular utilizados foram: fosforilase b 97,0 kDa; albumina bovina 66,0 kDa; albumina de ovo 45,0 kDa; anidrase carbônica 30,0 kDa; indicador de tripsina 20,1 kDa e lisozima purificada da clara de ovo 14,4 kDa. A coloração dos géis foi realizada com solução azul brilhante de comassie blue. Os géis foram avaliados qualitativamente, e as bandas de proteínas identificadas visualmente.

4.6. Análise da composição físico-química dos extratos

4.6.1. Análise do conteúdo de sólidos totais

Foi pesada uma quantidade de $2 \pm 0,05$ g de amostra do extrato em placas de vidro previamente taradas e pesadas. Essas foram aquecidas em estufa a 105 °C por 1 hora, resfriadas por 1 hora e novamente pesada. A operação de aquecimento, resfriamento e pesagem foi repetida até obtenção de peso constante. Os conteúdos de umidade foram determinados pela Equação 1 (método 925.09 da AOAC, 2012).

$$\% U_{105\text{ }^{\circ}\text{C}} = \frac{100 \times p}{p'} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

$\% U_{105\text{ }^{\circ}\text{C}}$ = Umidade a 105 °C

p = massa da amostra - massa da amostra após secagem

p' = massa da amostra em gramas

4.6.2. Análise do conteúdo de proteínas brutas totais

A quantificação do conteúdo de proteínas foi realizada pelo método sensível de Bradford. Em placa ELISA, foram adicionados, em cada poço, 210 μL de água, 30 μL de extrato e 200 μL de reagente de Bradford. Para o branco os volumes foram de 240 μL , 0 μL e 60 μL , respectivamente. A placa foi então movimentada por 1 minuto e deixada em repouso por 15 minutos. Após esse tempo foi realizada leitura no comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas (BRADFORD, 1976). As leituras encontradas foram utilizadas para obtenção dos teores de proteínas brutas através da curva de quantificação (Equação 2).

$$Y=0,0211X + 0,0256 \quad R^2 = 0,9987 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

Y = Leitura no leitor de microplacas

X = Teor de proteínas em $\mu\text{g/mL}$

4.6.3. Análise do conteúdo de cinzas totais

Para essa análise, cadinhos de porcelana (50 mL) foram previamente aquecidos em mufla a 600 °C, resfriados em dessecador por 1 hora e pesados. Posteriormente foi pesada uma quantidade de $2 \pm 0,05$ g de amostra nos cadinhos e esses foram incinerados em mufla a 600 °C. Os cadinhos contendo as amostras passaram por resfriamento em dessecador por 1 hora e posteriormente as amostras foram pesadas. Os conteúdos foram determinados pela Equação 3 (método 923.03 da AOAC, 2012).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{100 \times p}{p'}$$

(Eq. 3)

Sendo:

p = massa de cinzas (g) = (massa do cadinho com a amostra - massa do cadinho vazio)

p' = massa da amostra em grammas.

4.7. Avaliação do uso agudo e sub-crônico dos extratos de proteínas estruturadoras de gelo

4.7.1. Local de realização do experiment

O experimento foi conduzido no laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa.

4.7.2. Animais e procedimentos experimentais

Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados ratos albinos machos, da linhagem Wistar, recém-desmamados, com 21 dias de idade. As condições ambientais foram controladas através de fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de 23 °C ± 1 °C.

Os animais foram distribuídos, identificados em gaiolas individuais de aço inoxidável e aclimatizados por um período de cinco dias. Os animais receberam dieta padronizada (ração comercial Nuvilab CR 1- Nuvital) e água, ambos *ad libitum*. O esquema experimental do estudo está demonstrado na Figura 3.

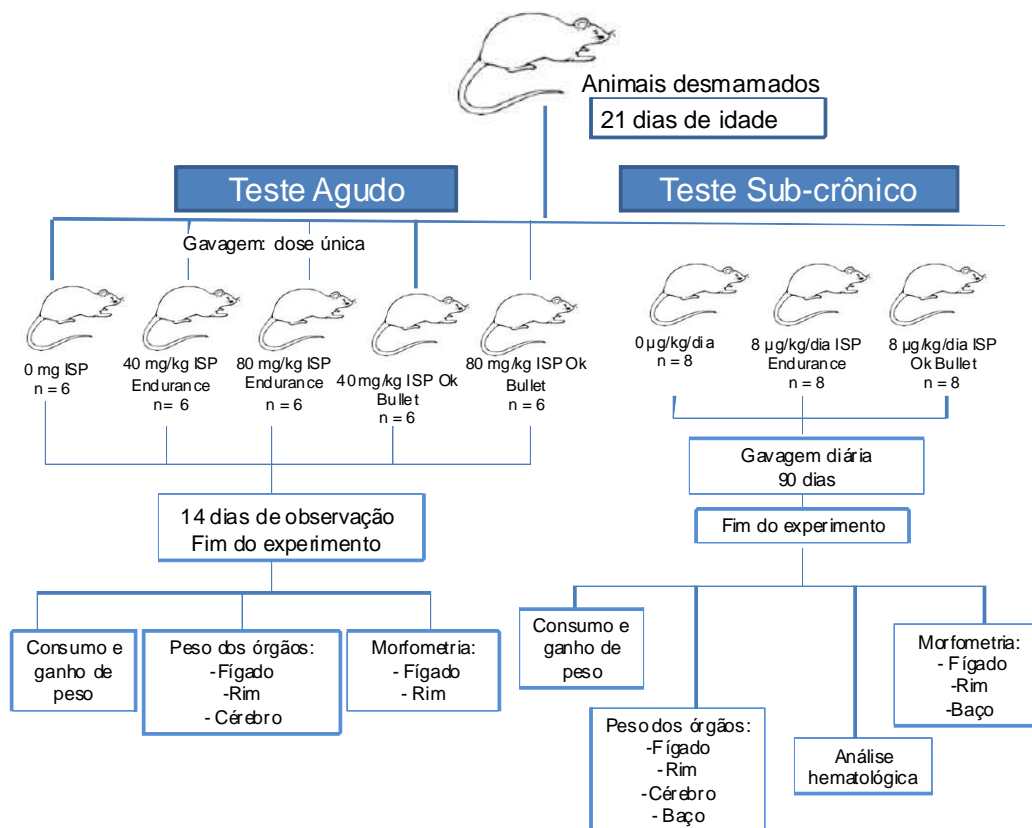


Figura 3: Esquema experimental do estudo de inocuidade do extrato de ISP de folhas de trigo das cultivares Endurance e Ok Bullet.

4.7.2.1. Teste de inocuidade aguda

Foram utilizados 30 ratos (n=6/grupo) Wistar macho, randomizados em cinco grupos, com dieta e água *ad libitum*. Para cálculo da dosagem foi utilizado o protocolo de Moreira et al. (2014). Foram administradas doses correspondentes a 350 e 700 vezes a quantidade utilizada na produção de 100 gramas de pão, correspondendo a doses de 40 e 80 mg.kg⁻¹ de ISP obtida do extrato de cada cultivar (quatro grupos teste), por meio de gavagem em dose única de 1000 µL. Um quinto grupo de animais recebeu apenas o solvente utilizado para a obtenção do extrato (grupo controle). Após a administração, os animais foram observados diariamente e individualmente, sendo que durante as primeiras 12 horas, no período de 15, 30, 60 minutos e a cada 4 horas. A observação foi focada na

mortalidade, mudança no comportamento, pele, olhos e atividade motora. A partir da 24^a hora até 14 dias foi observada a cada 2 dias a variação de peso.

Ao final do décimo quarto dia, os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine, Cristália[®]) e eutanasiados. O fígado, cérebro e rim foram coletados, pesados e analisados histologicamente.

4.7.2.2. Teste de inocuidade sub-crônica

Três grupos de oito animais receberam dieta comercial e água *ad libitum*. Dois grupos de oito animais receberam diariamente doses de 114 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ de ISP obtida do extrato de cada cultivar (grupos testes), por meio de gavagem, enquanto os animais do grupo controle (oito animais) receberam os solventes utilizados no preparo dos extratos. A dosagem estipulada foi baseada em Vieira (2011), correspondendo a ingestão de 100 g de pão francês por um ser humano adulto de aproximadamente 70 kg. Todos os animais receberam dieta comercial e água *ad libitum* por 90 dias e foi observado diariamente para anormalidade e semanalmente para a ingestão alimentar.

Ao final de treze semanas e após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados e eutanasiados com isoflurano, (Isoforine, Cristália[®]), coletando-se sangue por punção cardíaca. Amostras de sangue, 5 mL, foram coletadas para determinação de componentes séricos. Os órgãos fígado, rim, baço e cérebro foram removidos e pesados.

4.7.3. Componentes séricos

Os componentes séricos analisados foram: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia, fosfatase alcalina, bilirrubina total, creatinina, glicose, colesterol total, triglicérides, albumina, cálcio, magnésio e fósforo. Todos determinados por métodos colorimétricos conforme recomendações do fabricante (Bioclin[®]).

4.7.4. Peso absoluto e relativo dos órgãos

Os órgãos retirados foram pesados em balança digital para obtenção do peso absoluto (g). O peso relativo (g), ou seja, peso do órgão por 100 g de massa corporal, foi determinado considerando o peso corporal do animal ao final do experimento, segundo a Equação 4.

$$\text{Peso relativo (g)} = \frac{\text{Peso absoluto(g)} \times 100\text{g}}{\text{Peso corporal total (g)}} \quad (\text{Eq. 4})$$

4.7.5. Análise histológica e morfometria

Os tecidos, fixados em solução de formalina 10%, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz CX31 Olympus e as imagens foram obtidas em câmara digital CS 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus, para posterior análise. As microfotografias foram analisadas em um sistema de análise de imagens (*Image Pro Plus®*).

4.7.5.1. Fígado

As proporções volumétricas (%) dos capilares sinusóides, citoplasma e núcleo de hepatócidos foram estimadas a partir de aproximadamente 2000 pontos pré-determinados por animal, em imagens capturadas em aumento de 400x.

Para cálculo do volume dos compartimentos hepáticos, foram determinados os diâmetros maiores e menores de 20 núcleos de hepatócitos por foto, totalizando 1000 núcleos por grupo experimental. Essas medidas foram realizadas utilizando-se microscópio de luz, com a objetiva de 20x e um sistema de análise de imagens (*Image Pro Plus®*).

O volume (μm^3) de cada estrutura foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos e a fórmula de volume de um cilindro (equação 5).

$$\text{Volume} = \frac{3}{4} \pi R^3 \quad (\text{Eq. 5})$$

Sendo,

R= raio (μm)

4.7.5.2. Rim

Foi realizada a contagem das estruturas glomerulares em 10 campos por animal utilizando-se microscópio de luz com ocular objetiva de 10x. As dimensões (diâmetro) das estruturas dos glomérulos renais, corpúsculo de Malphigi e emaranhado capilar glomerular foram mensuradas em 10 campos por animal em microscópio de luz com ocular de 20x e auxílio do sistema de análise de imagens (*Image Pro Plus*®).

4.7.5.3. Baço

O perímetro e o diâmetro do baço foram mensurados em 10 campos por animal, com o microscópio de luz (ocular de 20x), em 5 animais por grupo experimental. A área foi calculada a partir da equação 6.

$$\text{Área} = \pi R^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo:

R= raio (μm)

4.8. Preparação da massa congelada

As massas de pão francês foram elaboradas segundo método 10-10B da AACCC (2000) com modificações de Vieira (2011). Para elaboração das massas foram utilizadas farinha de trigo, tipo especial (marca comercial Vilma®) com 13 % de proteína e 66 % de absorção de água, açúcar cristal

(marca comercial Caeté[®]), sal de cozinha iodado (marca comercial Cisne[®]), fermento biológico instantâneo (marca comercial Fleischmann[®]), gordura vegetal hidrogenada (marca comercial Primor[®]), glúten vital (marca comercial Rhodia[®]). Todos obtidos no Supermercado Escola da Universidade Federal de Viçosa.

Para cada amostra, aproximadamente 500 g de farinha de trigo foram utilizadas seguindo a formulação (em Baker's %) apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Formulação da massa de pão francês

Ingrediente	Formulação (Baker's %)
Farinha de trigo	100,0
Glúten vital	3,0
Açúcar cristal	6,0
Fermento biológico instantâneo	5,5
Sal de cozinha	1,5
Gordura vegetal hidrogenada	1,0
Água	q.s.p.

Fonte: Vieira, 2011.

A quantidade de água adicionada, baseada em 66% de absorção da farinha de trigo, foi determinada de acordo com conteúdo de proteína. Os extratos de ISP, de cada cultivar, foram diluídos em água e adicionados à massa em uma concentração de 8 mg de proteína / 100 g de massa. Amostras sem adição de extrato de ISP foram preparadas somente com água (amostra controle).

Os ingredientes foram misturados em masseira (marca Amadio, modelo 56-RC-6504) por, aproximadamente, 8 minutos até o desenvolvimento ótimo da massa. Posteriormente foram retiradas amostras de 150 g de cada formulação, boleadas, deixadas em descanso por 20 minutos, sendo cilindradas e modeladas manualmente, e embaladas em sacos de polietileno identificados. As amostras foram armazenadas em freezer (marca Consul, modelo CVU26) a - 18 °C. Após período de 30 dias de estocagem as massas foram retiradas do congelamento e submetidas a um descongelamento sob refrigeração (12 °C) por 12 horas, fermentadas (30 °C por 90 minutos) e finalmente assadas em forno elétrico (marca

Fischer, modelo 090102) a uma temperatura de 200 °C por 20 minutos para posterior avaliação.

4.9. Avaliação física dos pães

4.9.1. Volume específico

O volume foi medido por deslocamento de semente de painço e o volume específico (mg / g) calculado pela razão entre volume e massa de acordo com AACC (1995), método nº 72-10.

4.9.2. Análise de cor

A avaliação instrumental da cor do miolo dos pães foi feita em colorímetro triestímulo (HunterLab, ColorQuest XE, USA), trabalhando com D₆₅ (luz do dia, 6.500 K) com leitura direta de reflectância das coordenadas de cromaticidade “L” (luminosidade), “a” (tonalidades de vermelho a verde) e “b” (tonalidades de amarela a azul), empregando-se a escala Hunter-Lab.

4.9.3. Análise de perfil de textura

As análises foram feitas em texturômetro TA-XT Express, com probe cilíndrica de 25 mm de diâmetro. Os resultados incluíram dureza, elasticidade, mastigabilidade, coesividade e resiliência, como definido por Bourn (2002). Para cada análise, foi utilizado uma fatia de pão de 1 cm. O instrumento foi calibrado como se segue: velocidade pré-teste: 3 mm/s, velocidade do teste: 1 mm/s, velocidade pós-teste: 5 mm/s; distância de ruptura 1 %; distância: 50 %, e tempo: 5 s; conforme sugerido por Zhang et al. (2008).

4.10. Composição centesimal

4.10.1. Umidade

O conteúdo de água foi determinado a 105 °C, em placas de petri previamente taradas e submetidas a aquecimento em estufa com circulação forçada de ar (Marconi®, modelo MA 035, Piracicaba, Brasil) até peso constante, conforme método 925.45b da AOAC (2012). Após secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador com sílica e gel, por 1 hora, pesadas em balança analítica digital, com precisão de 0,0001 g. O conteúdo de água foi calculado pela diferença de massa entre a amostra úmida e seca.

4.10.2. Proteína bruta

A determinação de proteínas foi realizada segundo o método micro Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total, método 960.52 da AOAC, 2012; utilizando-se fator de conversão igual a 6,25.

4.10.3. Lipídios

A determinação de lipídios foi realizada por extração em aparelho Soxhlet, utilizando éter de etílico como extrator, por 8 horas, sob refluxo, de acordo com o método 920.39 da AOAC, 2012.

4.10.4. Cinzas

Para a determinação do conteúdo de cinzas, as amostras foram pesadas em cadinhos de porcelana previamente secos, pesados e submetidos à calcinação em mufla (Quimis®, modelo 318, Diadema, Brasil) à 550 °C. Posteriormente, os cadinhos com as amostras foram resfriados em dessecador com sílica e gel, novamente pesados em balança analítica digital. O conteúdo de cinzas foi determinado pela diferença de massa antes e após a calcinação, segundo método 923.03 da AOAC, 2012.

4.10.5. Fibra alimentar total

A determinação dos conteúdos de fibra alimentar total (FAT), solúvel (FAS) e insolúvel (FAI) dos pães foi realizada por meio do método enzimático gravimétrico (método 985.29 da AOAC, 2012). Utilizou-se para a hidrólise enzimática α -amilase termoresistente, protease e amiloglicosidase (Total dietary fiber assay kit, Sigma®) com modificações. Para a filtração utilizou-se cadinhos de vidro com placa de vidro sintetizado com porosidade nº2 (ASTM 40-60mesh) e celite como auxiliar de filtração.

4.10.5.1. Preparo de cadinhos

Os cadinhos foram deixados de molho com detergente neutro (Chemco®) a 20 % durante 24 horas. Foram enxaguados com água destilada sob vácuo e no sentido oposto. Foram secos em estufa (Marconi®, modelo MA-035/5, Piracicaba, Brasil) a 105 °C por 1 hora e submetidos à calcinação em mufla (Quimis®, modelo 318, Diadema, Brasil) a 525 °C por 5 horas. Em seguida foram resfriados a 105 °C em mufla. Os cadinhos foram lavados 5 vezes com 20 mL de HCl 0,5N e, posteriormente, enxaguados três vezes com 20 mL de água destilada no sentido oposto. Os cadinhos foram secos em estufa a 105 °C por 12 horas e pesados. Foi pesado 1 g de celite e adicionado aos cadinhos, que foram secos novamente a 105 °C por 12 horas e, posteriormente, pesados.

4.10.5.2. Obtenção do hidrolisado

Foi pesado, em duplicata, 1 g de amostra, com precisão de 0,1 mg, em béquer de 600 mL. Foi adicionada, em cada béquer, 50 mL de tampão fosfato pH 6,0. O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,2$, adicionando, se necessário, NaOH 0,275 ou HCl 0,325 N. Na solução foi adicionado 0,1 mL de α -amilase termoresistente. O bequer foi tampado com folha de papel alumínio e aquecido em banho-maria (Marconi®, modelo MA 093, Piracicaba, Brasil) em ebulição por 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos. As amostras foram resfriadas por 1 hora. O pH foi ajustado para $7,5 \pm 0,1$ e adicionado em torno de 10 mL de NaOH 0,275N. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de protease (5 mg.0,1mL⁻¹) na solução pré digerida e o béquer novamente tampado com

folha de alumínio e incubado à 60 °C por 30 minutos, com agitação horizontal (100 rpm). Após o hidrolizado ser resfriado por 1 hora, foi adicionado em torno de 10 mL de HCl 0,325 N com a finalidade de ajustar o pH em $4,3 \pm 0,3$. Finalmente, foi adicionado 0,1 mL de amiloglicosidase na solução e o béquer foi novamente tampado com folha de alumínio e incubado a 60 °C por 30 minutos com agitação horizontal (100 rpm), para obtenção do hidrolizado final. O mesmo procedimento foi realizado em duplicata para obtenção do branco.

4.10.5.3. Fibra alimentar insolúvel

Inicialmente com auxílio da bomba de vácuo (Marconi®, modelo MA-058, Piracicaba, Brasil), filtrou-se o hidrolizado em cadinho. Em seguida lavou-se o resíduo do cadinho com 10 ml de água destilada, repetindo o procedimento três vezes. O volume filtrado no kitasato foi transferido para um béquer de 600 mL, utilizando-se 320 mL de etanol 98 % aquecido a 60 °C para lavar o kitasato, sendo este material reservado para análise de fibra solúvel. Os cadinhos foram, em seguida, lavados duas vezes com o volume de 20 mL de etanol a 95 %, e duas vezes com 20 mL de acetona. Os cadinhos foram secos em estufa a 105 °C durante 12 horas. Posteriormente, realizou-se análise de proteína e cinzas nos resíduos do cadinho (AOAC, 2002).

4.10.5.4. Fibra alimentar solúvel

O volume reservado na etapa de filtração da fibra insolúvel foi deixado em repouso por 1 hora para precipitação. Os cadinhos foram lavados com auxílio da bomba de vácuo com 20 mL de etanol a 78 %. Em seguida, o conteúdo reservado foi filtrado no cadinho com auxílio de bomba de vácuo. Estes foram lavados consecutivamente três vezes com volume de 20 mL de etanol a 78 %, duas vezes com 20 mL de etanol a 95 % e duas vezes com 20 mL de acetona. Posteriormente, o resíduo do cadinho foi seco em estufa a 105 °C durante 12 horas e prosseguiu-se para análises de proteínas e cinzas dos resíduos, conforme descrito anteriormente.

4.10.5.5. Fibra alimentar total

A determinação de fibra alimentar total foi realizada pela soma das fibras solúvel e insolúvel.

4.10.6. Carboidratos disponíveis

O conteúdo de carboidratos foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100 %) e os teores de proteínas, lipídios, fibra alimentar total, teor de água e cinzas.

4.11. Estudo da qualidade protéica dos pães elaborados com extratos de proteínas estruturadoras de gelo

4.11.1. Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, com média de 30 dias de idade, com peso corporal variando entre 73 a 77 g, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. O desenho experimental do estudo está demonstrado na Figura 4.

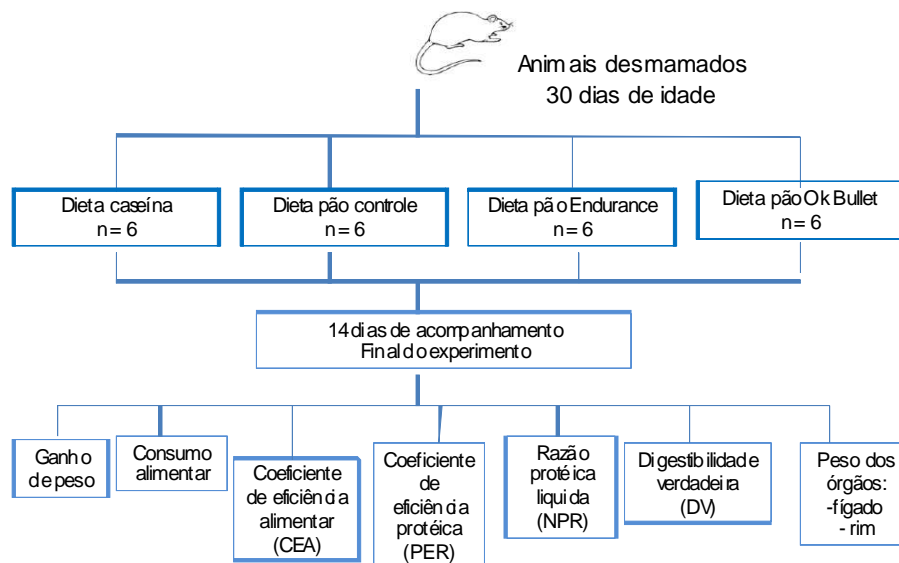


Figura 4: Esquema experimental do estudo de qualidade protéica de pão francês com e sem adição de extrato de ISP.

Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e mantidos em condições de temperatura de 22 ± 3 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Para avaliação da qualidade protéica foi incorporado os pães controle, Endurance e Ok Bullet na dieta dos animais (Tabela 2). Desta forma, a composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves, Nielsen e Fahey (1993) com o teor de proteínas alterado para 9,5 %. Durante o período de 14 dias os animais receberam as dietas experimentais e água deionizada *ad libitum*. Ao final do décimo quarto dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados com isoflurano (Isoforine, Cristália[®]). O fígado e o rim foram removidos e pesados.

Tabela 2: Composição das dietas experimentais (g / 100g).

Ingredientes	Dietas experimentais			
	Caseína	Pão Controle	Pão Endurance	Pão Ok Bullet
Caseína	7,81	0	0	0
Pão Controle	0	74,8	0	0
Pão Endurance	0	0	79,4	0
Pão Ok Bullet	0	0	0	80,85
Amido dextrinizado	13,2	0,79	0	0
Sacarose	10	10	5,2	3,86
Óleo de soja	9	6,9	6,84	6,85
Celulose	6	2,5	3,5	3,39
Mix mineral	3,5	3,5	3,5	3,52
Mix vitamínico	1	1	1	1
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	51,9	0	0	0
Proteína (g / 100 g de dieta)	9,15	9,73	9,5	9,79
Densidade calórica (Kcal / g)	3,94	3,6	3,6	3,61

4.11.2. Coeficiente de eficiência alimentar

No período experimental os animais foram pesados no 1^o, 7^o e 14^o dias e determinou-se o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) que

representa a relação entre o ganho de peso (g) e o consumo total de dieta pelos animais (g).

4.11.3. Coeficiente de eficiência protéica e razão protéica líquida

O coeficiente de eficiência protéica (*protein efficiency ratio* – PER) foi determinado por meio do método de Hegsted (1977) modificado para 14 dias de experimento (MORAES et al., 2010), relacionando o ganho de peso dos animais (g) com o consumo de proteína (g). A razão protéica líquida (*net protein ratio* – NPR) foi determinada, de acordo com Bender e Doell (1957), levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste (g), mais a perda de peso do grupo com dieta aprotéica (g), em relação ao consumo de proteína do grupo-teste (g).

4.11.4. Digestibilidade verdadeira

Para a determinação da digestibilidade verdadeira (DV) as dietas foram marcadas com corante índigo carmim na concentração de 0,2 %. Estas dietas foram oferecidas aos animais no 8º e 11º dias. As fezes marcadas foram coletadas no 9º dia, bem como a totalidade das fezes no 10º e 11º dias, e as fezes não marcadas, no 12º dia. As fezes coletadas foram armazenadas em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, as fezes foram secas em estufa (Marconi®, modelo MA-035/5, Piracicaba, Brasil) a 105 °C durante 24 h. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador (Arno®) para determinação da concentração de nitrogênio, pelo método de semimicro Kjeldahl (AOAC, 2012), com amostras em triplicata. A DV foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, excretado nas fezes e a perda metabólica nas fezes, que correspondeu ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

4.12. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA/UFV) da Universidade Federal de Viçosa, MG, processo nº107/2013, sendo o experimento conduzido de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (Anexo I).

5. ARTIGO I: INOCUIDADE AGUDA E SUB-CRÔNICA DO EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO DE FOLHAS DE TRIGO.

Resumo

O extrato de proteína estruturadora de gelo (ISP) obtido de folhas de duas cultivares de trigo (Endurance e Ok Bullet), foi testado quanto a sua inocuidade em ratos Wistar machos de forma aguda, na dosagem de 40 ou 80 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de proteína por peso corporal (14 dias) e de forma sub-crônica na dosagem de 114 µg.kg⁻¹.dia⁻¹ (90 dias). A administração de doses agudas, 350 a 700 vezes maior do que a quantidade utilizada no preparo de 100g de pão francês, dos extratos de ISP não causou letalidade. O uso agudo e sub-crônico do extrato de ISP das cultivares Endurance e Ok Bullet não comprometeu o peso corporal, o consumo alimentar e o coeficiente de eficiência alimentar ($p > 0,05$). No teste agudo, os pesos relativos dos órgãos dos animais dos grupos teste não diferiram do controle, mas o grupo que recebeu o extrato de ISP Ok Bullet na dose 80 mg / kg aumentou a proporção de núcleo dos hepatócitos. No teste sub-crônico, o rim dos animais dos grupos Endurance e Ok Bullet apresentaram menor peso ($p < 0,05$) que o dos animais do grupo controle. Na dosagem sub-crônica, observou-se redução nos níveis de uréia, magnésio e fósforo, redução do volume dos hepatócitos, sem alterações na morfometria renal e nas transaminases séricas em ambas as cultivares do trigo. No entanto houve redução na albumina do grupo Endurance e de bilirrubina no grupo Ok Bullet. Houve hiperplasia dos centros germinativos do baço no grupo ISP Ok Bullet. Os extratos de ISP, de ambas as cultivares, administrado de forma aguda, se mostraram inócuos em ratos Wistar, na dose de 40 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, enquanto o uso sub-crônico revelou algumas alterações celulares e séricas, embora não indicativas de toxicidade.

Palavra chave: ratos Wistar, histologia, toxicologia.

Abstract

Ice structuring protein obtained from the leaves of two wheat cultivars (Endurance and Ok Bullet) was tested for its toxicity in male Wistar rats, acutely at a dose of 40 or 80 mg.kg⁻¹.day⁻¹ of body weight (14 days), and sub-chronically at a dose of 114 µg.kg⁻¹.day⁻¹ (90 days). Administration of acute doses of the ISP extracts, 350-700 times greater than the amount used in the preparation of 100 g of French bread, did not cause lethality. Acute and sub-chronic use of ISP from Endurance and Ok Bullet cultivars did not affect body weight, food consumption or the food efficiency coefficient ($p > 0.05$). In the acute test, the relative weights of the organs of the animals from the test groups did not differ from those of the control group, but the nucleus proportion of the hepatocytes increased in the group that received Ok Bullet ISP at a dose of 80 mg / kg. In the sub-chronic test, the kidneys of the animals in the Endurance and Ok Bullet groups presented a lower weight ($p < 0.05$) than those control group. At the sub-chronic dose, a reduction in levels of urea, magnesium and phosphorus was observed in both wheat cultivars, as well a reduction in the volume of the hepatocytes, without changes to renal morphology or transaminases serum. However, there was a reduction in albumin in the Endurance group and bilirubin in the Ok Bullet group. There was hyperplasia in the germinal centers of the spleen in the Ok Bullet ISP group. ISP of both cultivars, administered acutely, proved harmless in Wistar rats at a dose of 40 mg.kg⁻¹.day⁻¹, while sub-chronic use revealed some cell and serum changes, although not indicative of toxicity.

Key-words: Wistar rats , histology, toxicology

5.1. Introdução

Proteínas estruturadoras de gelo (ISP) foram descobertas em peixes marinhos que necessitam de proteção contra congelamento. Estas proteínas são encontradas naturalmente em todos os reinos da biologia, e suas funções incluem tolerância ao congelamento e a adesão aos cristais de gelo (DAVIES, 2014). A tolerância ao congelamento dos cereais é devido a sua capacidade de sobreviver ao crescimento de cristais de gelo no meio intersticial em temperaturas inferiores a 0°C (GRIFFITH et al., 2005).

Dependendo da fonte, as ISP apresentam estruturas protéicas diversas, mas todas com a propriedade comum de se ligarem a cristais de gelo. Essas proteínas diminuem a temperatura em que os cristais de gelo são formados e também modificam o seu tamanho e formato. Elas são capazes de influenciar o crescimento de cristais de gelo por meio da adsorção para sua superfície. Isto resulta em três efeitos dependentes da temperatura: inibição da recristalização; modificação do formato do cristal, ou seja, proporciona um crescimento bipiramidal do cristal, e causa histerese térmica (ACTI e NALBANTOGLU, 2003).

A aplicação das ISP como agente de preservação de alimentos tem demonstrado potencial aumento na qualidade de alimentos congelados, durante a estocagem e transporte. As ISP inibem o crescimento de cristais de gelo durante a estocagem, transporte e congelamento/descongelamento, previnem a perda na textura dos alimentos, ou seja, são capazes de reduzir os danos celulares e também a perda de nutrientes pela saída de água dos alimentos. Outra vantagem para a indústria de alimentos é que essas proteínas são consideradas ativas em quantidades muito pequenas (KIANI e SUN, 2011; HASS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

Porém, uma particular preocupação com o uso de novas proteínas é a possibilidade de elas causarem reações adversas em indivíduos alérgicos a proteínas de mesma fonte, por isso, é extremamente importante determinar a segurança de tais materiais antes de qualquer aplicação extensiva em alimentos (HALL-MANNING et al., 2004; SITOHY et al., 2013). O número de diagnóstico de pessoas alérgicas a proteínas do trigo aumenta cada vez

mais, sendo que a incidência é de 1 a cada 130 - 200 pessoas em países industrializados (RONDA e ROSS, 2011).

Portanto, antes de uma nova proteína ser incorporada em alimentos, a sua segurança deve ser avaliada. De acordo com as normas internacionais reconhecidas para produtos de biotecnologia (*Codex Alimentarius Commission*), a análise da segurança deve incluir uma avaliação do potencial de alergenicidade. Esta avaliação consiste em examinar o potencial da proteína em provocar reações no organismo e induzir uma nova resposta imune em indivíduos susceptíveis (CREVEL et al., 2007).

Ainda não estão disponíveis estudos específicos que avaliam a toxicidade de ISP extraídas de folha de trigo, mas acredita-se que o extrato de proteínas estruturadoras de gelo obtido de folhas de duas cultivares de trigo, possam ser inócuos em ratos Wistar.

5.2. Material e métodos

O estudo foi realizado no laboratório de Farinha e Amido do Departamento de Tecnologia de Alimentos e de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, ambos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O experimento foi conduzido em conformidade com normas brasileiras para experimentação com animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº107 /2013).

5.2.1. Obtenção e caracterização dos extratos

Foram utilizadas folhas de duas cultivares de trigo: Endurance e Ok Bullet, colhidas após 21 dias de aclimação (regime de luz de 10/14 h, 4 – 7 °C, UR ± 80 %).

A extração das ISP foi realizada baseada no método de impregnação à vácuo descrito por Roudsari (2011) adaptado por Campelo (2014), utilizando 20 mM de ácido ascórbico (pH 3), com 20 mM de CaCl_2 e EDTA. Para caracterização do extrato e padronização do conteúdo de proteína, foi

determinado o conteúdo de proteína bruta total pelo método sensível de Bradford (1976), e a quantidade de sólidos e cinzas totais de acordo com AOAC (2012).

A presença e distribuição das ISP nos extratos obtidos foram estudadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando o método em placa vertical, com placas 10 x 10 cm, descontínuo de baixa resolução, descrito por Vieira (2011) e adaptado por Campelo (2014).

5.2.2. Animais

Utilizou-se ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albinos, classe Rodentia), da linhagem *Wistar*, recém-desmamados, com 21 dias de idade. Os animais foram distribuídos e identificados em gaiolas individuais de aço inoxidável e aclimatizados por um período de cinco dias. Os animais receberam dieta padronizada (ração comercial Nuvilab CR 1- Nuvital) e água, ambos *ad libitum*. As condições ambientais foram controladas com fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.3. Procedimentos experimentais

Teste de inocuidade aguda

Para esse experimento foram utilizados 30 ratos ($n=6/\text{grupo}$) *Wistar* machos, distribuídos de acordo com o peso corpóreo (peso inicial médio de $50\text{ g} \pm 3\text{ g}$) em cinco grupos (controle e quatro grupos experimentais) com dieta e água *ad libitum*, alojados em gaiolas individualmente. Para cálculo da dosagem do extrato foi utilizado o protocolo de Moreira et al., (2014), sendo administradas doses correspondentes a 350 e 700 vezes a quantidade utilizada na produção de 100 gramas de pão, correspondendo a doses de 40 e 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ISP obtida do extrato de cada cultivar de trigo, por meio de gavagem em dose única de 1000 μL . O grupo controle recebeu apenas o solvente (ácido ascórbico e cloreto de cálcio) utilizado para a obtenção do extrato. Após a administração, os animais foram observados

diariamente e individualmente, sendo que durante as primeiras 12 horas, no período de 15, 30, 60 minutos e a cada 4 horas. A observação foi focada na mortalidade, mudança no comportamento, aspectos da pele, olhos e atividade motora. A partir da 24^a hora até 14 dias foram observados semanalmente a variação de peso e consumo alimentar, sendo calculado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), que representa a relação entre o ganho de peso e o consumo total de dieta.

Ao final do décimo quarto dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados com isoflurano (Isoforine, Cristália[®]). O fígado, cérebro e rim foram removidos, pesados, fixados em solução de formalina 10 % histologicamente.

Teste de inocuidade sub-crônica

Três grupos de oito animais foram utilizados neste experimento. Dois grupos receberam diariamente doses de $114 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ de ISP obtida do extrato de cada cultivar de trigo (grupos testes), por meio de gavagem (volume de 1000 μL), enquanto os animais do grupo controle receberam os solventes utilizados no preparo dos extratos. A dosagem estipulada foi baseada em Vieira (2011), correspondendo à ingestão de 100 g de pão francês (duas unidade/dia) por um ser humano adulto de aproximadamente 70 kg. Todos os animais receberam dieta comercial e água *ad libitum* por 90 dias e foram observados diariamente para anormalidade e semanalmente para a ingestão alimentar e ganho de peso, sendo determinado o coeficiente de eficiência alimentar.

Ao final de treze semanas, e após 12 h de jejum, os animais foram anestesiados e eutanasiados com isoflurano, (Isoforine, Cristália[®]). Amostras de sangue, 5 mL, foram coletadas por punção cardíaca para análises hematológicas e para determinação de componentes séricos. Os órgãos fígado, rim, baço e cérebro foram removidos, pesados, fixados em solução de formalina 10 % e analisados histologicamente.

5.2.4. Análise histológica e morfométrica

Os tecidos fixados foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz CX31 Olympus e as imagens foram obtidas em câmara digital CS 020 por meio software Analysis GETIT, Olympus, para posterior análise. As microfotografias foram analisadas em um sistema de análise de imagens (*Image Pro Plus®*).

No fígado, as proporções volumétricas (%) dos capilares sinusóides, citoplasma e núcleo de hepatócidos foram estimadas a partir de aproximadamente 2000 pontos pré-determinados por animal. Para o cálculo do volume dos compartimentos hepáticos, foram determinados os diâmetros maiores e menores de 20 núcleos de hepatócitos por foto, totalizando 1000 núcleos por grupo experimental. Para morfometria renal, foi realizada a contagem das estruturas glomerulares em 10 campos por animal utilizando-se objetiva de 10x. As dimensões (diâmetro) das estruturas dos glomérulos renais, corpúsculo de Malphigi e emaranhado capilar glomerular, foram mensuradas em 10 campos por animal, com objetiva de 20X. O perímetro e o diâmetro do baço foram mensurados em 10 campos por animal, em cinco animais por grupo experimental.

5.2.5. Análise estatística

O estudo foi conduzido em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os dados foram apresentados em valores de média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada no programa Statistical Analysis System (SAS, 1996) versão 9.3, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

Para comparação de resultados foi realizada análise de variância (ANOVA) e os resultados de caracterização dos extratos diferentes significativamente ($p < 0,05$) foram analisados pelo teste “t”, com nível de significância de 5 %; enquanto os resultados dos ensaios biológicos pelo teste de Dunnett, com 5 % de probabilidade.

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterização do extrato

A composição geral dos extratos de ISP utilizados está apresentada na Tabela 3. Foram verificados maiores conteúdos de sólidos totais e de proteínas totais no extrato da cultivar Endurance. O conteúdo protéico de cada cultivar de trigo foi considerado durante a diluição dos extratos para posterior administração nos animais.

Tabela 3: Valores de médias e desvio padrão do conteúdo de sólidos totais (mg / 100 g), proteína bruta (mg / 100 g) e cinzas (%) dos extratos de ISP utilizados no experimento biológico.

Cultivar	Sólidos totais ¹	Proteínas totais ¹	Cinzas
Endurance	980,00 ± 20,00 ^a	395,33 ± 1,43 ^a	2,10 ± 0,02 ^a
Ok Bullet	920,00 ± 10,00 ^b	357,96 ± 2,87 ^b	2,07 ± 0,02 ^a

¹ Os resultados estão expressos em matéria seca. Letras diferentes numa mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias das populações pelo teste t.

Na Figura 5 está representado o gel obtido dos extratos das duas cultivares estudadas, visualizando-se que foi possível a extração das ISP. Para os dois extratos foi observada uma proteína na faixa de 20,1 – 30,0 kD.

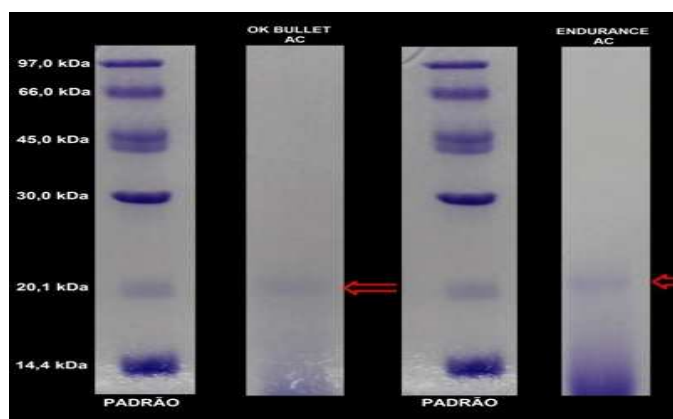


Figura 5: Perfis protéicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos pelas cultivares de trigo (Ok Bullet e Endurance). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos.

5.3.2. Avaliação da inocuidade aguda

Após 24 horas da administração, não foram observadas morte nem sinais de toxicidade nas duas dosagens (40 e 80 mg.kg⁻¹) de extrato de ISP

de ambas cultivares. Da mesma forma, não foi observado nenhum efeito adverso durante os 14 dias de experimento.

Todos os animais iniciaram o estudo com pesos semelhantes ($p > 0,05$) e ao longo do experimento os pesos não se diferenciaram entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 6).

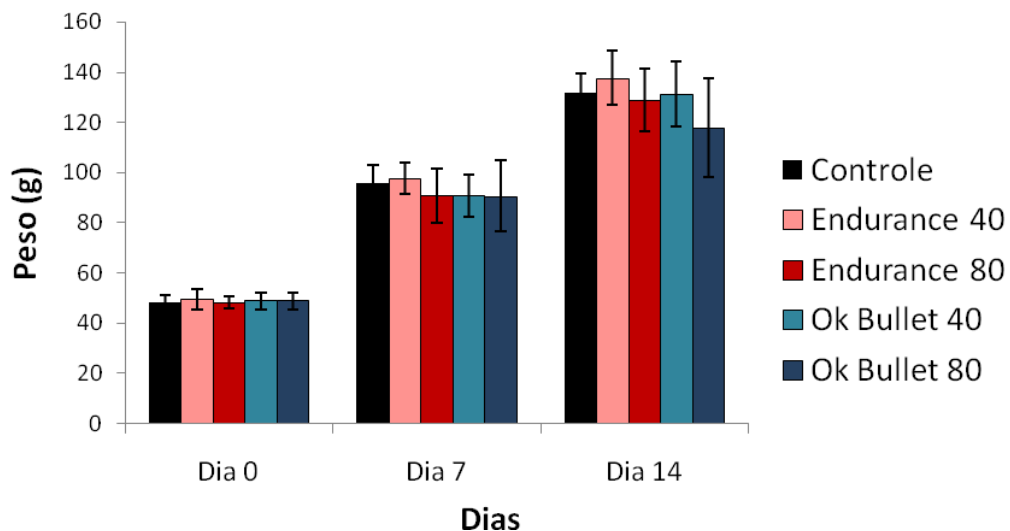


Figura 6: Efeito do extrato de ISP Endurance e Ok Bullet, concentrações de 40 e 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, no peso corpóreo dos animais experimentais durante 14 dias ($n= 6$). Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5%.

Os grupos experimentais apresentaram consumo alimentar, ganhos de peso e coeficiente de eficiência alimentar semelhantes ao grupo controle durante os 14 dias (Tabela 4). Adicionalmente, após a necropsia foram verificadas semelhanças no peso absoluto e relativo do cérebro, rim e fígado dos animais independentes do extrato de ISP ou da dose administrada (Tabela 5) e nenhum sinal de toxicidade macroscópica foi observada.

Tabela 4: Valores de médias e desvio padrão do consumo total de dieta (g), ganho de peso total (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais durante 14 dias (n=6).

	Consumo alimentar	Ganho de Peso	CEA
Controle	222,21 ± 18,05	83,2 ± 6,83	2,62 ± 0,11
Endurance 40 mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹	214,54 ± 16,93	88,2 ± 12,19	2,45 ± 0,21
Endurance 80 mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹	211,82 ± 22,51	80,60 ± 10,52	2,58 ± 0,15
Ok Bullet 40 mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹	217,36 ± 17,57	82,60 ± 15,37	2,67 ± 0,35
Ok Bullet 80 mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹	196,52 ± 42,43	69 ± 18,43	2,90 ± 0,33

Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

Tabela 5: Valores de médias e desvio padrão do peso absoluto (g) e relativo (g / 100 g corporais) dos órgãos dos animais controle e dos tratados com ISP Endurance e Ok Bullet, concentrações de 40 e 80 mg.kg⁻¹, após 14 dias (n= 6).

	Cérebro		Rim		Fígado	
	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo
Controle	1,69 ± 0,10	1,29 ± 0,10	0,81 ± 0,03	0,62 ± 0,03	6,51 ± 0,50	4,95 ± 0,24
Endurance 40	1,61 ± 0,13	1,18 ± 0,13	0,78 ± 0,09	0,57 ± 0,06	6,72 ± 0,86	4,88 ± 0,50
Endurance 80	1,61 ± 0,12	1,27 ± 0,17	0,77 ± 0,10	0,59 ± 0,04	5,87 ± 1,05	4,56 ± 0,71
Ok Bullet 40	1,62 ± 0,12	0,78 ± 0,09	0,79 ± 0,08	0,60 ± 0,05	6,23 ± 0,47	4,76 ± 0,17
Ok Bullet 80	1,63 ± 0,16	1,42 ± 0,29	0,75 ± 0,2	0,63 ± 0,08	5,38 ± 0,85	4,58 ± 0,23

Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

Os achados morfométricos renais estão apresentados na Figura 7. Foi possível observar os glomérulos renais, bem como suas estruturas, corpúsculo de Malpighi, emaranhado capilar glomerular. Não houve diferença (p > 0,05) no número de glomérulos, diâmetro dos corpúsculos e dos emaranhados entre os animais dos grupos teste e do grupo controle.

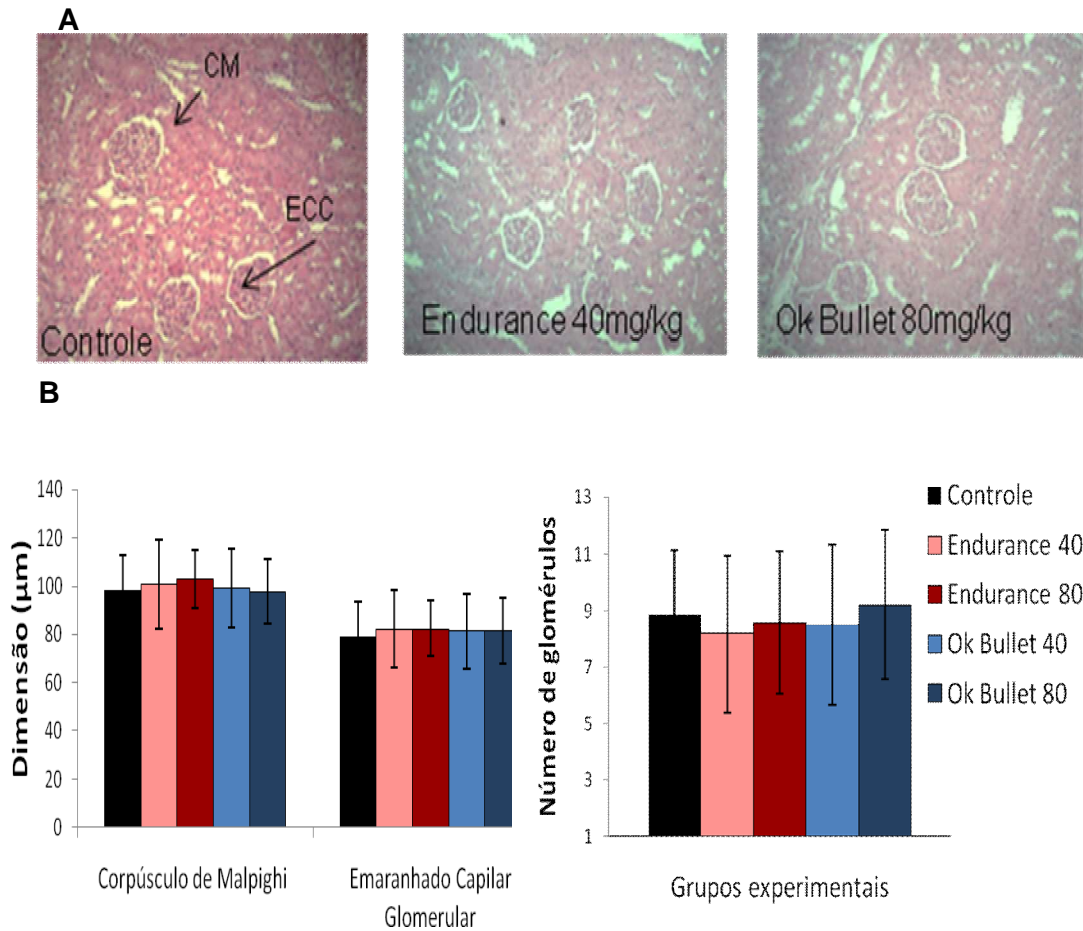


Figura 7: Avaliação histológica do rim direito dos animais experimentais após 14 dias da administração dos extratos. A- Fotomicrografia de plano transversal demonstrando os glomérulos renais, seus corpúsculos de Malpighi (CM) e emaranhado capilar glomerular (ECC) (HE 200X). B- Média e desvio padrão do número de glomérulos por campo e dos diâmetros das estruturas renais. Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

O volume dos hepatócitos e do seu citoplasma e núcleo, estão representados na Tabela 6, verificando-se a ausência de diferenças significativas entre controle e grupos experimentais. A Figura 8 está mostrando o percentual das estruturas hepáticas, observando-se um menor percentual de citoplasma e maior de núcleos nos animais do grupo Ok Bullet na dose $80 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Tabela 6: Valores de médias e desvio padrão referente ao volume (μm^3) dos hepatócitos, núcleo e citoplasma no tecido hepático dos animais experimentais após 14 dias de administração

Volume (μm^3)	Controle	Endurance 40 mg.kg^{-1}	Endurance 80 mg.kg^{-1}	Ok Bullet 40 mg.kg^{-1}	Ok Bullet 80 mg.kg^{-1}
Hepatócitos	3225,3 ± 1096,0	2640,7 ± 1258,9	2275,9 ± 162,1	2831,1 ± 717,3	2135,5 ± 659,6
Núcleo	392,4 ± 50,3	353,1 ± 52,4	351,3 ± 16,7	412,9 ± 61,9	321,9 ± 26,4
Citoplasma	2832,9 ± 1001,9	2287,5 ± 1214,7	1924,7 ± 147,4	2418,22 ± 723,8	1813,6 ± 637,1

Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

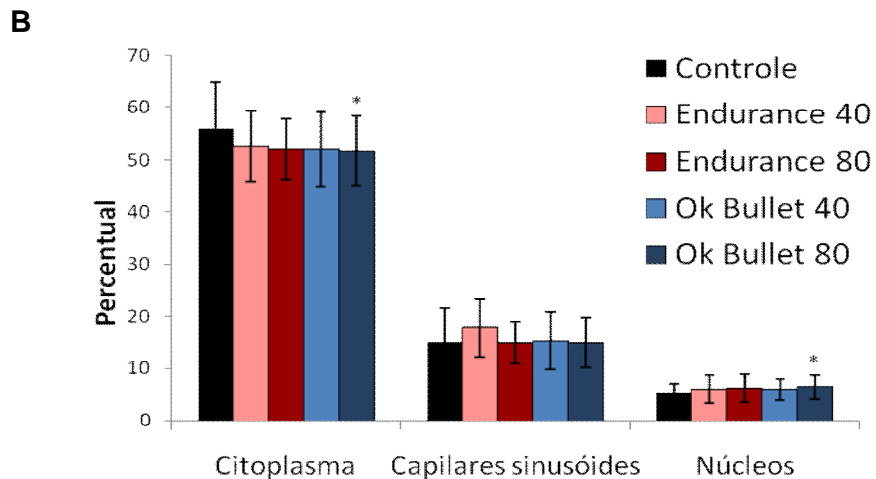


Figura 8: A- Fotomicrografia do tecido hepático indicando a proporção de capilares sinusóides, núcleo e citoplasma dos hepatócitos. (HE 200X). B- Efeito da administração aguda de ISP Endurance e Ok Bullet, nas concentrações de 40 e 80 mg.kg^{-1} , após 14 dias, nas proporções das estruturas hepáticas dos animais experimentais. *Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5%.

5.3.3. Avaliação da inocuidade sub-crônica

Os pesos corporais dos animais estão apresentados na Figura 9. Os animais do grupo controle iniciaram o experimento com pesos médios de $126 \pm 8,6$ g; do grupo Endurance $120 \pm 7,06$ g e do Ok Bullet, $132 \pm 5,6$ g. Todos os grupos apresentaram pesos crescentes ao longo das semanas, sendo que durante o primeiro mês os animais aumentaram expressivamente seu peso, uma vez que eles estavam em idade de crescimento (entre 35 e 60 dias de vida). A partir da quarta semana o aumento do peso foi menor, porém ainda crescente. Mas, não foi observada diferença de peso corpóreo entres os grupos teste e controle.

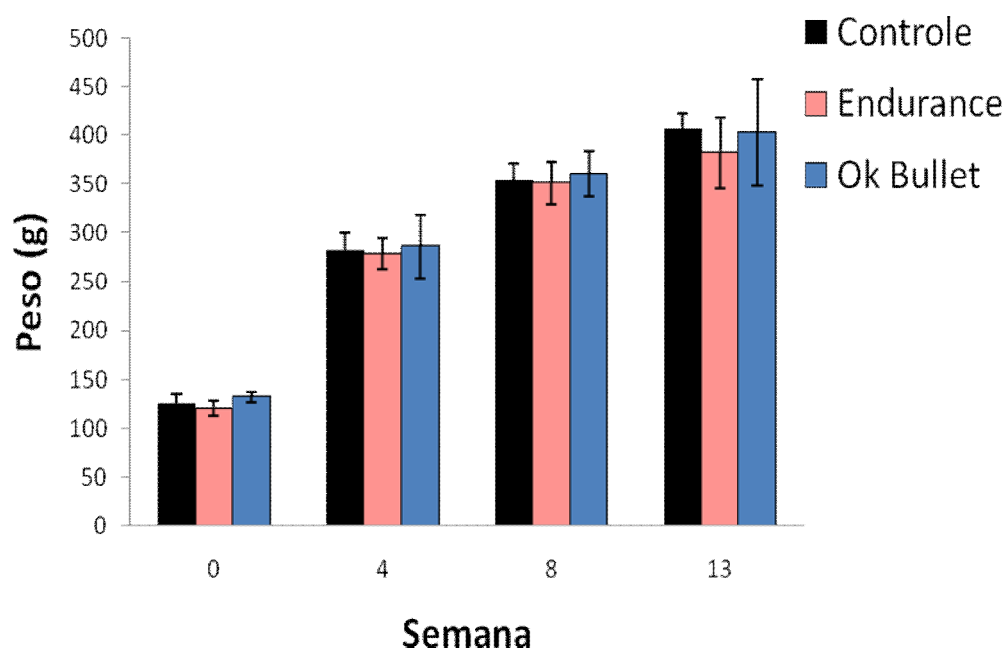


Figura 9: Efeito do extrato de ISP Endurance e Ok Bullet no peso corpóreo dos animais experimentais durante 13 semanas (n= 8). Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

O consumo alimentar total, o ganho de peso total e o coeficiente de eficiência alimentar dos grupos experimentais (Endurance e Ok Bullet) foram comparados ao grupo controle e não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) ao final das 13 semanas (Tabela 7) e semelhantes ao longo do experimento (dados não demonstrados).

Tabela 7: Valores de médias e desvio padrão do consumo total de dieta (g), ganho de peso total (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais dos grupos experimentais durante 13 semanas.

	Consumo alimentar	Ganho de peso	CEA
Controle	2136,62 ± 94,26	280,37 ± 15,53	7,59 ± 0,45
Endurance	2110,87 ± 62,94	262,50 ± 37,75	8,18 ± 1,14
Ok Bullet	2223,68 ± 194,81	271,0 ± 49,97	8,36 ± 1,02

Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5%.

Como apresentado na Tabela 8, a redução do peso absoluto e relativo do rim foi observada nos animais tratados com ISP das duas cultivares em comparação ao grupo controle. Os demais órgãos não tiveram seus pesos diferenciados ($p > 0,05$) em relação ao controle. Quanto às variáveis bioquímicas (Tabela 9), menores valores foram encontrados para uréia, magnésio e fósforo para ambos os extratos de ISP, enquanto o extrato de ISP Ok Bullet proporcionou menor valor de bilirrubina total e o Endurance, menor valor de albumina em comparação ao grupo controle.

Tabela 8: Valores de médias e desvio padrão do peso absoluto e relativo (g / 100 g corporais) dos órgãos dos animais dos grupos experimentais após 13 semanas de experimento.

Órgãos	Peso	Controle	Endurance	Ok Bullet
Fígado	Relativo	3,05 ± 0,07	2,95 ± 0,14	2,92 ± 0,16
	Absoluto	12,40 ± 0,69	11,28 ± 1,24	11,74 ± 1,32
Baço	Relativo	0,24 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,22 ± 0,04
	Absoluto	0,98 ± 0,19	0,85 ± 0,22	0,88 ± 0,24
Rim	Relativo	0,43 ± 0,07	0,36 ± 0,05*	0,35 ± 0,04*
	Absoluto	1,74 ± 0,31	1,39 ± 0,23*	1,39 ± 1,45*
Cérebro	Relativo	0,49 ± 0,06	0,53 ± 0,04	0,50 ± 0,09
	Absoluto	2,01 ± 0,23	2,04 ± 0,11	1,97 ± 0,19

*Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %

Tabela 9: Valores de médias e desvio padrão das variáveis bioquímicas do sangue dos animais experimentais após 13 semanas de tratamento.

	Controle	Endurance	Ok Bullett
AST (U/l)	121,37 ± 18,07	116,37 ± 49,94	124,5 ± 29,59
ALT (U/l)	47,63 ± 10,61	38,37 ± 7,61	39 ± 8,11
Uréia (mg/dl)	44,47 ± 3,27	38,52 ± 4,67*	36,19 ± 2,98*
Fosfatase Alcalina (U/l)	88,75 ± 20,19	85,37 ± 26,93	85,87 ± 20,77
Bilirrubina total (mg/dl)	0,56 ± 0,06	0,57 ± 0,04	0,28 ± 0,28*
Creatinina (mg/dl)	0,53 ± 0,07	0,48 ± 0,05	0,48 ± 0,05
Glicose (mg/dl)	168,87 ± 37,21	171,0 ± 17,56	186,5 ± 36,87
Colesterol total (mg/dl)	89,25 ± 10,02	88,75 ± 12,41	87,5 ± 23,59
Triglicérides (mg/dl)	32,12 ± 12,78	30,0 ± 14,7	34,0 ± 9,62
Cálcio (mg/dl)	9,99 ± 0,39	9,90 ± 0,92	9,33 ± 0,39
Magnésio	2,49 ± 0,37	1,98 ± 0,13*	2,03 ± 0,21*
Fósforo (mg/dl)	9,37 ± 1,85	7,08 ± 0,81*	7,0 ± 0,57*
Albumina (g/dl)	3,14 ± 0,21	2,85 ± 0,17*	2,95 ± 0,11

* Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

As análises morfométricas do rim (Figura 10) não apresentaram diferenças significativas nas dimensões das estruturas dos animais dos grupos experimentais, enquanto da hepática os animais de ambos os grupos teste, Ok Bullet e Endurance, apresentaram redução do volume dos hepatócitos (Tabela 10), menor quantidade de citoplasma e maior quantidade de espaços sinusóides (Figura 11). A morfometria também indicou alterações no baço dos animais experimentais, com aumento no perímetro e área dos centros germinativos dos animais do grupo Ok Bullet (Figura 12).

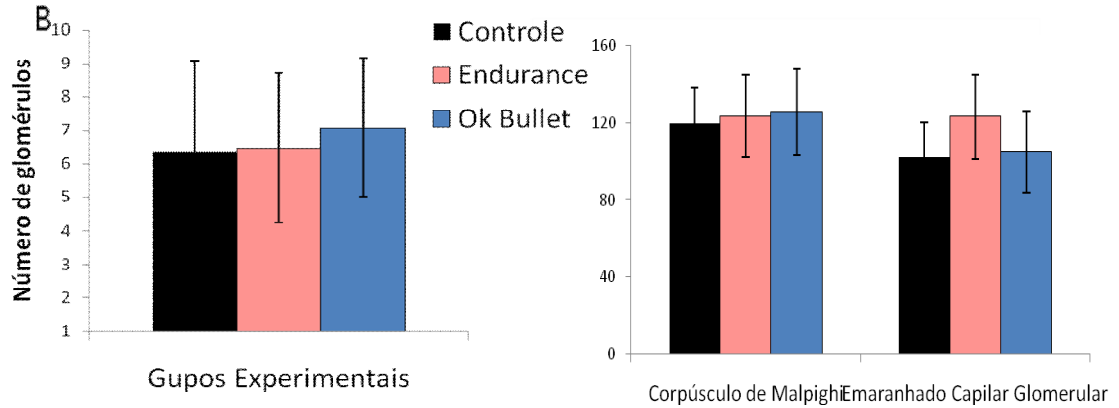
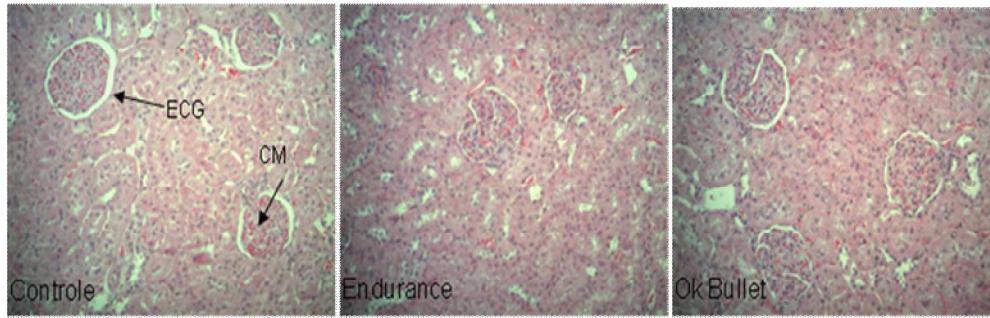
A

Figura 10: Avaliação histológica do rim direito dos animais experimentais tratados com extrato de ISP por 13 semanas. A- Fotomicrografia de plano transversal demonstrando os glomérulos renais e seus corpúsculos de Malpighi (CM) e emaranhado capilar glomerular (ECG) (HE 200X). B- Média e desvio padrão dos diâmetros das estruturas renais e do número de glomérulos por campo.

* Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

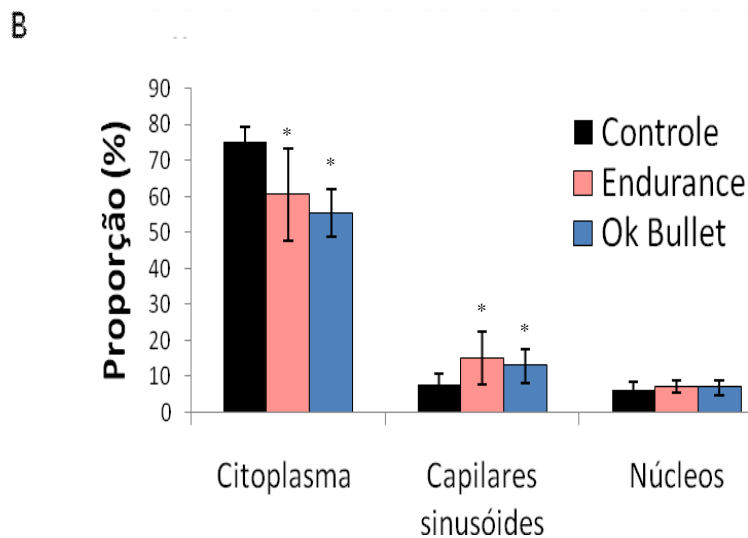
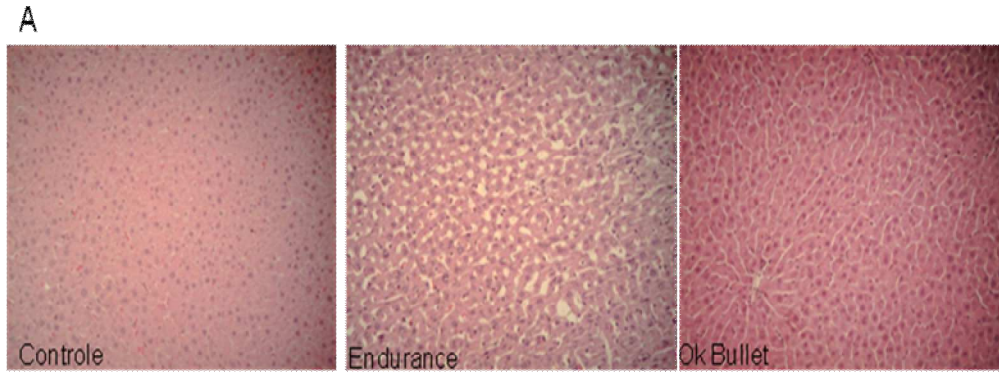


Figura 11: A- Fotomicrografia do tecido hepático indicando a proporção de capilares sinusóides, núcleo e citoplasma dos hepatócitos dos animais experimentais após 13 semanas de tratamento (HE 200X). B- Efeito da administração sub-crônica de ISP Endurance e Ok Bullet por 13 semanas, nas proporções das estruturas hepáticas dos animais experimentais.

*Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

Tabela 10: Valores de médias e desvio padrão referente ao volume (μm^3) dos hepatócitos, núcleo e citoplasma no tecido hepático dos animais experimentais tratados por 13 semanas.

Volume (μm^3)	Controle	Endurance	Ok Bullet
Hepatócitos	4326,4 ± 1399,7	2171,0 ± 579,8*	1965,6 ± 331,9*
Núcleo	350,0 ± 31,4	293,4 ± 27,6	297,2 ± 33,9
Citoplasma	3976,4 ± 1374,6	1877,6 ± 577,0*	1668,4 ± 300,7*

*Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

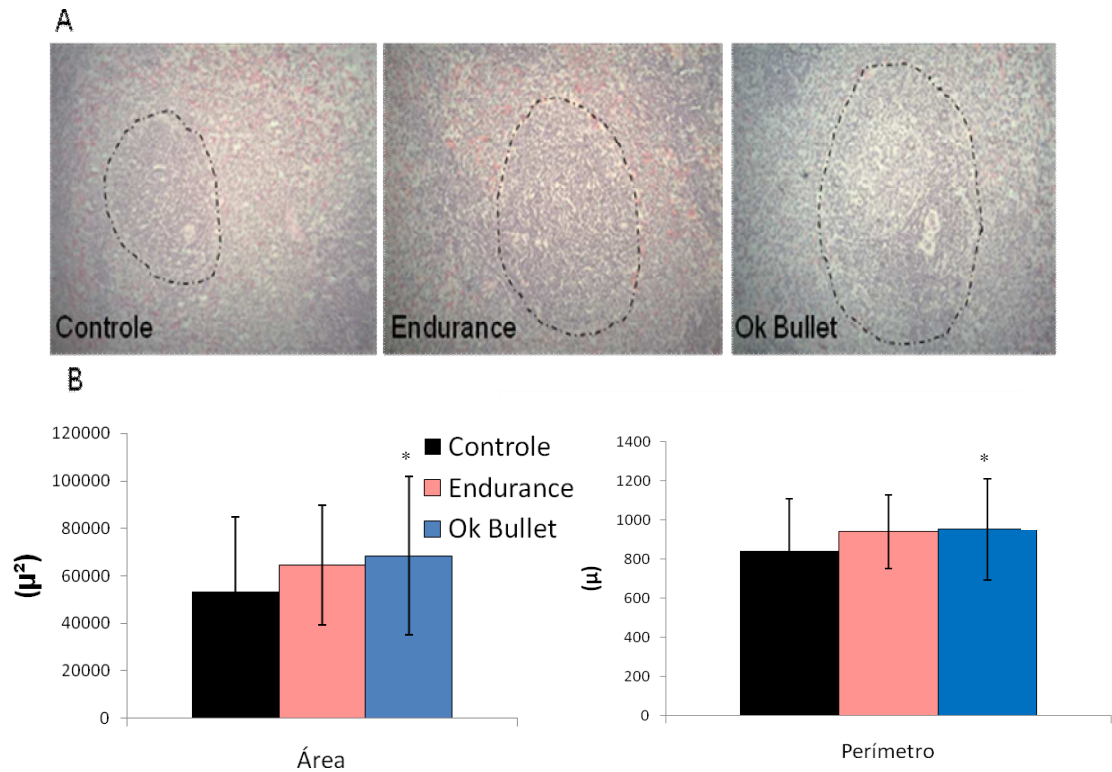


Figura 12: Avaliação histológica do baço dos animais experimentais tratados com extrato de ISP por 13 semanas. A- Fotomicrografia de baço demonstrando os centros germinativos. (HE 200x). B- Média e desvio padrão do perímetro e área dos centros germinativos.

*Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

5.4. Discussão

As proteínas estruturadoras de gelo podem ser extraídas de cereais por técnicas relativamente simples. Em folhas de trigo, uma impregnação a vácuo, seguida de centrifugação foi suficiente para a extração. O processo de impregnação a vácuo foi utilizado para acelerar a infiltração de líquidos nas estruturas porosas de tecidos vegetais sob-baixas pressões, resultando na troca de gases por líquidos (ZHAO e XIE, 2004). Durante essa etapa, o contato entre solvente de extração e as ISP, localizadas no apoplasto da célula, foi favorecido, de modo a aumentar o poder de extração do solvente, e conseqüentemente conteúdo de proteínas extraído. O emprego das outras etapas de calor e de força centrífuga pode eliminar compostos orgânicos,

fitatos, oxalatos e fibras do extrato bruto, reduzindo assim os teores de sólidos. Após a extração, foi verificado que a cultivar Endurance apresentou o maior conteúdo de sólidos totais e proteínas, pois essa cultivar é uma cultivar de trigo vermelho (*Triticum aestivum L.*) classificado como duro e de inverno, que possui a capacidade de resistir e se recuperar de pastagens prolongadas e intensivas, além de ser resistente a pH baixos e tolerante ao frio. Enquanto a cultivar OK Bullet é um trigo vermelho duro de inverno, só que ao contrário da primeira cultivar apresenta baixa sensibilidade ao frio.

A identificação da ISP tornou-se possível com uma análise em eletroforese SDS-PAGE, que identificou proteínas de massas moleculares em torno de 20 kDa. Da mesma forma, alguns estudos observam as ISP com massas moleculares em torno de 12-30 kDa (XU et al., 2009; VIEIRA, 2011; HASSAS-ROUDSARI; 2011).

A introdução de novas proteínas na alimentação humana pode carrear riscos à saúde, provocando reações alérgicas em indivíduos susceptíveis (Bindslev-Jensen, 2003), devendo, portanto, ser avaliada sua utilização. O comportamento geral e os pesos corporais em animais são variáveis críticas para avaliar os primeiros sinais de toxicidade (SIREERATAWONG et al., 2008).

No estudo de inocuidade aguda, uma única utilização dos extratos de ISP Endurance e Ok Bullet, em concentrações de 40 e 80 mg.kg⁻¹ não levou à mortalidade e nem efeitos adversos na aparência e no comportamento dos animais, no crescimento, consumo alimentar, peso absoluto e relativo dos órgãos. Nas análises morfológicas, a maior dosagem de ISP proveniente da cultivar Ok Bullet (700 vezes maior) causou uma redução no percentual de citoplasma e aumento de núcleos de hepatócitos do fígado dos animais, sem, entretanto, alterar os volumes de cada estrutura. O aumento da proporção de núcleos de hepatócitos poderia ser indicativo de aumento no metabolismo protéico (TOMASZEWSKA et al., 2015), porém essa alteração acarretaria também no aumento do volume nuclear, fato não observado.

O uso agudo do extrato de ISP da cultivar Endurance se mostrou seguro após um período de 14 dias, entretanto a maior dosagem (80 mg.kg⁻¹) de ISP proveniente da cultivar Ok Bullet causou alterações morfológicas

hepáticas. Cabe ressaltar que esta dosagem foi calculada correspondendo a uma ingestão 700 vezes maior do que o utilizado em 2 unidades (100 g) de pão francês, segundo Vieira (2011), ou seja, uma dose extremamente alta.

No presente estudo as concentração de extrato de ISP utilizadas, para o teste agudo, considerando o peso de um homem adulto (70 kg), foram de 280 e 560 mg.dia⁻¹ e não causaram mortalidade e nem mesmo efeito adversos, no caso do extrato da cultivar Endurance. Estas ingestões foram maiores que as do estudo de CREVEL et al. (2002) que estimaram, baseado no consumo humano de peixes de água fria, uma ingestão diária de 1-10 mg.dia⁻¹ nos Estados Unidos e entre 50-500 mg.dia⁻¹ na Islândia de ISP de peixe, não causa mortalidade ou efeito adverso, podendo ser segura sua utilização.

Na avaliação da inocuidade sub-crônica do extrato de ISP Endurance e Ok Bullet, o uso diário de 114 µg.kg⁻¹, por um período de 13 semanas, não alterou o ganho de peso, o consumo alimentar e o coeficiente de eficiência alimentar dos animais. Esses resultados foram semelhantes ao estudo de Hall-Manning e colaboradores (2004) que avaliaram da segurança do uso de ISP tipo III HPLC 12, produzida pela recombinação de leveduras, em 20 ratos machos e 20 fêmeas que receberam diariamente, por gavagem, dosagens entre 58 e 580 mg.kg⁻¹ em um período de 13 semanas. No presente estudo, a dosagem foi bem menor que a dos autores citados, pois foi considerada a utilização do extrato de ISP obtido de folhas de trigo para elaboração de pães com massa congelada, sendo esta a dosagem necessária para produção de 100 g de massa de pão francês (VIEIRA, 2011).

O peso absoluto e relativo dos órgãos fígado, baço e cérebro dos animais experimentais não diferenciaram ($p < 0,05$) em relação ao controle. Entretanto, foi verificado um menor peso dos rins dos animais que receberam o extrato de ambas as variedades do trigo. Essa atrofia pode ter sido ocasionada por agentes tóxicos e infecciosos que agem por meio da perturbação do metabolismo celular (FARIAS et al., 2010), uma vez que o rim é um dos principais órgãos afetados por substâncias tóxicas, por ser responsável pela excreção de metabolitos (EZEJA et al., 2013) e por ele

passar um alto volume sanguíneo podendo ficar retida em seus túbulos grande quantidade de toxinas (EMILY, 2007).

A hipouremia observada no presente estudo poderia corroborar com o indício de dano renal grave, entretanto a variável deve ser associado às dosagens de creatinina, como prova de função renal (MARIZ et al., 2006), sendo que, os níveis de creatinina não diferiram entre os grupos teste e controle. A análise morfológica renal também exclui a possibilidade de dano renal, uma vez que não houve diferenças entre as dimensões das estruturas renais dos animais experimentais em relação ao grupo controle.

Outro aspecto relevante observado foi a hipoalbuminemia em animais tratados com ISP Endurance. A albumina está relacionada ao metabolismo de proteínas (SOARES-MOTA et al., 2010) e sua diminuição geralmente ocorre em casos de danos hepáticos. A baixa produção de albumina no presente estudo pode ser justificada pela redução de volume dos hepatócitos e conseqüentemente dilatação dos capilares sinusóides visualizadas na análise histológica.

As variáveis séricas das transaminases AST e ALT e da fosfatase alcalina, neste estudo, não se diferenciaram das do grupo controle. O aumento da atividade de AST e ALT é um sensível marcador da toxicidade hepática (ATEBA et al., 2014) e alterações, especialmente na ALT, são usualmente indicativas de danos hepáticos causados por doença hepatocelular, necrose hepática, obstrução biliar e infecções (OLIVEIRA et al., 2014), portando, a hipótese de toxicidade hepática foi descartada. Da mesma forma, o excesso de bilirrubina (produto da degradação do grupo heme da hemoglobina) está associado a doenças hepáticas (FARIAS et al., 2010; EZEJA et al., 2013), sendo que no presente estudo menores concentrações foram vistas nos grupos tratados com extrato de ISP Ok Bullet.

O baço também é um importante órgão para avaliar a inocuidade de um composto, pois ele cumpre a função de defesa imune contra os anticorpos, que são transportados pelo sangue, e filtro de sangue por meio da eliminação de plaquetas e células envelhecidas (EYNARD, 2011). No baço, ocorreu aumento da área do centro germinativo nos animais que receberam ISP Ok Bullet, o que provavelmente se deve à maior presença de

linfócitos B, que possuem receptores de superfície na forma de uma imunoglobulina capaz de realizar ligação direta a antígenos de qualquer tamanho. Durante a resposta imunitária, as células linfocitárias B de memória podem ocupar a região do centro germinativo esplênico (VEIGA et al., 2007). No presente estudo, o aumento na área dos centros germinativos no grupo exposto ao extrato de ISP OK Bullet pode ser resultado da ativação deste tipo celular, tanto para mobilizar defesas como para montar uma "memória imunológica" para essa substância.

5.5. Conclusão

Os extratos de ISP de folha de trigo de ambas as cultivares foram inócuos no teste agudo na dosagem de $40 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e na dosagem de $80 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ foi inócua para ISP cultivar Endurance. Na administração de forma sub-crônica, por 90 dias, a dosagem de $114 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ não alterou variáveis biométricas dos animais. No entanto, ocorreram alterações morfológicas no fígado e baço, e bioquímicas séricas (diminuição de uréia, magnésio e fósforo em ambas as cultivares, albumina na cultivar Endurance e bilirrubina na cultivar Ok Bullet), sendo estas não correlacionadas com alterações indicativas de toxicidade.

6. ARTIGO II: EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO DE FOLHAS DE TRIGO MELHORA AS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DO PÃO FRANCÊS E NÃO ALTERA AS PROPRIEDADES QUÍMICAS E NUTRICIONAIS

Resumo

O presente estudo avaliou o efeito da adição de extrato de proteínas estruturadoras de gelo de folhas de duas cultivares de trigo (Endurance e Ok Bullet) nas propriedades físico-químicas, na textura e na qualidade protéica do pão francês elaborado com massa congelada em comparação ao pão controle (sem adição de extrato). Os extratos foram obtidos a partir da extração das folhas de trigo e adicionados em concentração de 8 mg / 100 g na massa durante a elaboração. As massas foram congeladas (- 18 °C) por 30 dias, fermentadas e assadas para posterior avaliação. Foram realizadas análises de composição química, análises físicas (volume, cor e textura) e ensaio biológico para determinação da qualidade protéica dos pães. A adição de extrato de proteínas estruturadoras de gelo, independente da cultivar do trigo, melhorou o volume específico e as variáveis de textura, resiliência e adesividade, dos pães após o congelamento e não interferiu na composição centesimal, coloração, nem nos índices de qualidade das proteínas (digestibilidade verdadeira, coeficiente de eficiência protéica e razão protéica líquida) do pão francês ($p > 0,05$). A adição do extrato de proteínas estruturadoras de gelo da cultivar Ok Bullet, também, não alterou o peso do fígado e rim dos animais. A utilização de 8 mg / 100 g de extrato de ISP extraída das folhas dos trigos Endurance e Ok Bullet foi eficiente na melhora das propriedades físicas dos pães elaborados com massa congelada, sem alterar as propriedades químicas e qualidade protéica.

Palavra-Chave: Massa congelada, textura, proteína anticongelante, qualidade protéica.

Abstract

This study evaluated the effect of adding ice structuring protein extracted from the leaf of two wheat cultivars (Endurance and OK Bullet) on the physicochemical properties, the texture and the protein quality of French bread made from frozen dough, compared to a control bread (no added extract). ISP was extracted from wheat leaves and added at a concentration of 8mg/100g of dough during preparation. The dough was frozen (- 18 °C) for 30 days, fermented and baked before evaluation. Chemical analyzes were conducted to determine the chemical composition, physical analysis for the volume, color and texture and a biological assay for determining the protein quality of the bread. The addition of extract, regardless of the wheat cultivar, improved the specific volume and texture variables, and the resilience and adhesiveness of the bread after freezing, and did not affect the proximate composition, color, or protein quality indices (true digestibility, *protein* efficiency ratio and net protein ratio) of the French bread, compared to the control bread ($p > 0.05$). The addition of ice structuring proteins from the Ok Bullet cultivar also did not change the weight of the liver or kidneys of the animals. The use of 8 mg / 100 g of ice structuring protein extracted from the Endurance and OK Bullet wheat leaves was effective in improving the physical properties of bread made from frozen dough without changing the chemical properties or the protein quality.

Key-words: Frozen dough , texture, antifreeze protein, protein quality

d6.1. Introdução

O pão é um dos alimentos mais consumidos no mundo e sua produção é uma das tecnologias mais antigas já conhecidas. No entanto, novas formas de produção tem sido continuamente procuradas pela indústria de panificação com intuito de melhorar a produtividade e distribuição dos produtos sem perda sensorial (SELOMULYO e ZHOU, 2007). Dentre as opções está o congelamento, que permite uma larga produção de pães em locais centrais para posterior distribuição, possibilitando que a massa congelada seja distribuída para os supermercados e padarias mais próximas dos consumidores, e acarretando grandes benefícios econômicos (CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Porém, apesar da produção de pão a partir de massa congelada ter sido aprimorada pelos avanços tecnológicos e pela introdução de aditivos, ainda há problemas, como a fermentação prolongada, o baixo volume, o sabor e o aroma prejudicados (MATUDA et al., 2004). Estes prejuízos devem-se ao congelamento que provoca o enfraquecimento da estrutura da massa, causado pela ruptura da matriz protéica, que reduz a retenção de gás e diminui o número de leveduras viáveis para a fermentação (MEZIANI et al., 2012).

As proteínas estruturadoras de gelo (ISP) apresentam-se como potencial alternativa para minimizar os efeitos do congelamento em massas de pão. Conhecidas como proteínas anticongelantes, é uma família de proteínas com capacidade de controlar o crescimento de cristais de gelo (BRASLAVSKI et al., 2013). Sua aplicação como agente de preservação de alimentos tem aumentado a qualidade de alimentos congelados durante a estocagem e o transporte. Outra vantagem para a indústria de alimentos é que essas proteínas são consideradas ativas em quantidades muito pequenas (HASSAS-ROUDSARI e GOFF, 2012)

As ISP agem diminuindo o ponto de congelamento da água e inibindo o crescimento e a recristalização durante o congelamento (PIROZI e MACRITCHIE, 2002; XU et al., 2009). Elas modificam o formato dos cristais de gelo durante seu crescimento, deixando-o mais arredondado (HOSHINO

et al., 1999; KIANI e SUN, 2011) e desta forma, menos prejudicial à estrutura do alimento.

Seus efeitos nas massas de pães (DING et al., 2015; XU et al., 2009; ZHANG et al., 2008) e em misturas de farinha de trigo e água (JIA et al., 2014; KONTOGIORGOS et al., 2008) vêm sendo investigados nas últimas décadas. Elas diminuem os danos dos cristais de gelo na estrutura da massa, pois diminuem a ruptura da rede de glúten, conseqüentemente, evitando a perda da estrutura e da força da massa; além de apresentarem efeito protetor contra morte de leveduras, uma vez que reduzem o congelamento intracelular. A maioria desses estudos investiga as propriedades termofísicas das massas e sua capacidade de retenção de água após a adição de ISP de diferentes fontes.

Dentre as fontes de ISP mais estudadas estão leveduras (JIA et al., 2014), peixes de água fria (BINDSLEV-JENSEN et al., 2003), vegetais (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008) e cereais (DING et al., 2015; XU et al., 2009). Os cereais sintetizam e acumulam essas proteínas no seu apoplasto desenvolvendo sua habilidade de tolerância ao frio. As folhas de trigo foram estudadas quanto a sua habilidade em sintetizar ISP (ANTIKAINEM e GRIFFITH, 1997; ATICI E NALBANTOGLU, 2003; REGAND e GOFF, 2006) e quanto à capacidade desta ISP em causar menor sinerese da massa de pão após ciclos de congelamento/descongelamento (VIEIRA, 2011).

Pouco se sabe a respeito do efeito das ISP extraídas de folhas de trigo nas propriedades físicas e, principalmente, na qualidade nutricional de pães elaborados com massa congelada. A hipótese do estudo baseia-se na premissa de que as ISP extraídas da folha de trigo melhoram as características físicas dos pães, sem interferir na qualidade nutricional. Portanto, o objetivo deste estudo é elaborar pão francês de massa congelada com extrato de ISP obtida de folhas de duas cultivares de trigo (Endurance e Ok Bullet) e avaliar suas propriedades físicas, químicas e a qualidade protéica.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Extrato de proteínas estruturadoras de gelo

Foram utilizados extratos de folhas de duas cultivares de trigo: Endurance e Ok Bullet, extraídos conforme Roudsari (2011) adaptado por Campelo 2014, utilizando de ácido ascórbico, ClCa_2 e EDTA. Os extratos apresentaram diferenças no conteúdo protéico (Tabela 11) e massa molecular em torno de 20,1 kDa (Figura 13).

Tabela 11: Médias e desvio padrão do conteúdo de sólidos totais, proteína bruta e cinzas dos extratos de ISP extraídos de folhas de trigo. (n=3)

Cultivar	Sólidos totais (mg/100g) ¹	Proteínas totais (mg/100g) ¹	Cinzas (%)
Endurance	980,00 ± 20,00 ^a	395,33 ± 1,43 ^a	2,10 ± 0,02 ^a
Ok Bullet	920,00 ± 10,00 ^b	357,96 ± 2,87 ^b	2,07 ± 0,02 ^a

¹ Os resultados estão expressos em matéria seca. Letras diferentes numa mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t, entre as médias das populações.

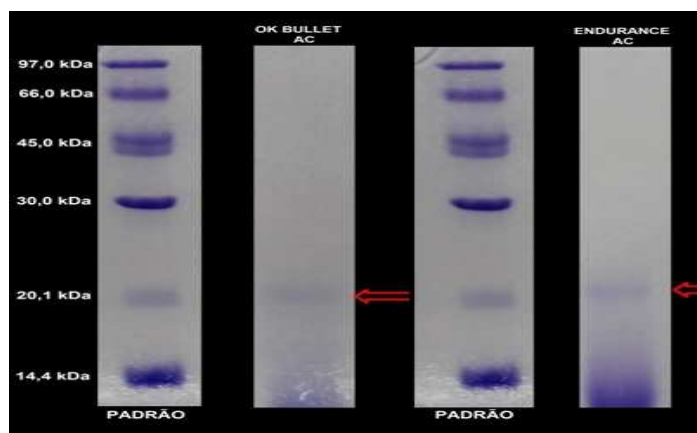


Figura 13: Perfis protéicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos pelas cultivares de trigo Ok Bullet e Endurance. Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos.

6.2.2. Preparo da massa

As massas de pão francês foram elaboradas segundo método 10-10B da AACC (2000) com modificações de Vieira (2011), utilizando: 500 g de farinha de trigo tipo especial, 30 g de açúcar, 7,5 g de sal iodado, 5,5 g de fermento biológico instantâneo, 5 g de gordura vegetal e 330 ml de água.

Todos os ingredientes adquiridos em mercado local. Os extratos de ISP, de cada cultivar, foram diluídos em água e adicionados à massa em uma concentração de 8 mg de proteína / 100 g de massa. A amostra controle foi preparada sem adição de extrato de ISP.

Os ingredientes foram misturados em masseira (marca Amadio, modelo 56-RC-6504) por aproximadamente 8 minutos até o desenvolvimento completo da massa. Posteriormente foram retiradas amostras de 150 g de cada formulação, boleadas e deixadas em descanso por 20 minutos, sendo cilindradas e modeladas manualmente, embaladas em sacos de polietileno identificados. As amostras foram armazenadas em freezer (marca Consul, modelo CVU26) a -18°C. Após período de 30 dias de estocagem as amostras foram retiradas do congelamento e submetidas a um descongelamento sob refrigeração (12 °C) por 12 horas, fermentadas (30 °C por 90 minutos) e finalmente assadas em forno elétrico (marca Fischer, modelo 090102) a uma temperatura de 200 °C por 20 minutos. Para avaliação físico-química, os pães permaneceram 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente).

6.2.3. Avaliação físico-química de pão francês elaborados com extrato de proteínas estruturadoras de gelo

Composição centesimal

Foi determinada a quantidade de umidade e matéria seca (método 925.09), utilizando estufa a 105 °C; de cinzas ou material mineral (método 923.03); de proteína bruta, método de micro Kjeldahl, multiplicando-se o resultado pelo fator 6,25(960.52); de lipídios (método 945.1), utilizando-se éter de petróleo; e de fibra alimentar total (método 985.29). Todos os métodos foram baseados na descrição da AOAC, 2012. Os carboidratos totais digeríveis foram calculados por diferença.

Volume e volume específico

O volume foi medido por deslocamento de semente de painço e o volume específico (mg / g) calculado pela razão entre volume e massa de acordo com AACC (1995), método nº 72-10.

Análise de cor

A avaliação instrumental da cor do miolo e da crosta dos pães foi realizada em colorímetro triestímulo (HunterLab, ColorQuest XE, USA), trabalhando com D₆₅ (luz do dia, 6.500K) com leitura direta de reflectância das coordenadas de cromaticidade “L” (luminosidade), “a” (tonalidades de vermelho a verde) e “b” (tonalidades de amarela a azul), empregando-se a escala Hunter-Lab.

6.2.4. Análise de perfil de textura do miolo

As análises de textura foram feitas em texturômetro TA-XT Express, com probe cilíndrica de 25 mm de diâmetro. Os resultados incluíram dureza, elasticidade, mastigabilidade, coesividade e resiliência. Para cada análise, foi utilizado uma fatia de pão de 1 cm. O instrumento foi calibrado como se segue: velocidade de pré-teste: 3 mm/s, velocidade do teste: 1 mm/s, velocidade pós-teste: 5 mm/s; distância de ruptura 1 %; distância: 50 %, e tempo: 5 s; conforme sugerido por Zhang et al. (2008).

6.2.5. Estudo da qualidade protéica de pão francês elaborado com extrato de proteínas estruturadoras de gelo

Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, recém desmamados, com média de 30 dias de idade, com peso corporal variando entre 73 a 77 g, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e mantidos em condições de temperatura de 22 ± 3 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Para avaliação da qualidade protéica foi incorporado os pães controle, Endurance e Ok Bullet na dieta dos animais (Tabela 12). Desta forma, a composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves, Nielsen e Fahey (1993), com o teor de proteínas alterado para 9,5 %. Durante o período de 14 dias os animais receberam as dietas experimentais e água deionizada *ad libitum*.

Tabela 12: Composição das dietas experimentais (g / 100 g).

	Ingredientes		Dietas experimentais	
	Caseína	Pão Controle	Pão Endurance	Pão Ok Bullet
Caseína	7,81	0	0	0
Pão Controle	0	74,8	0	0
Pão Endurance	0	0	79,4	0
Pão Ok Bullet	0	0	0	80,85
Amido dextrinizado	13,2	0,79	0	0
Sacarose	10	10	5,2	3,86
Óleo de soja	9	6,9	6,84	6,85
Celulose	6	2,5	3,5	3,39
Mix mineral	3,5	3,5	3,5	3,52
Mix vitamínico	1	1	1	1
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	51,9	0	0	0
Proteína (g / 100 g de dieta)	9,15	9,73	9,5	9,79
Densidade calórica (Kcal / g)	3,94	3,6	3,6	3,61

Coefficiente de eficiência alimentar

No período experimental os animais foram pesados no 1^o, 7^o e 14^o dias e determinou-se o ganho de peso e o CEA, que representa a relação entre o ganho de peso (g) e o consumo total de dieta pelos animais (g).

Coefficiente de eficiência protéica e razão protéica líquida

O coeficiente de eficiência protéica (*protein efficiency ratio* – PER) foi determinado por meio do método de Hegsted (1977) modificado para 14 dias de experimento (MORAES et al., 2010), relacionando o ganho de peso dos animais (g) com o consumo de proteína (g). A razão protéica líquida (*net protein ratio* – NPR) foi determinada, de acordo com Bender e Doell (1957), levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste (g), mais a perda de peso do grupo com dieta aprotéica (g), em relação ao consumo de proteína do grupo-teste (g).

Digestibilidade verdadeira

Para a determinação da DV as dietas foram marcadas com corante índigo carmim na concentração de 0,2 %. Estas dietas foram oferecidas aos animais no 8º e 11º dias. As fezes marcadas foram coletadas no 9º dia, bem como a totalidade das fezes no 10º e 11º dias, e as fezes não marcadas, no 12º dia. As fezes coletadas foram armazenadas em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, as fezes foram secas em estufa (Marconi®, modelo MA-035/5, Piracicaba, Brasil) a 105 °C durante 24 h. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador (Arno®) para determinação da concentração de nitrogênio, pelo método de semimicro Kjeldahl (AOAC, 2012), com amostras em triplicata. A DV foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, excretado nas fezes e a perda metabólica nas fezes, que correspondeu ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

Peso absoluto e relativo dos órgãos

Ao final do décimo quarto dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados com isoflurano (Isoforine, Cristália®). O fígado e o rim foram removidos e pesados. O peso relativo foi determinado considerando 100 g de peso corporal.

6.2.6. Análise estatística

O estudo foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), quando significativo ($p < 0,05$), as médias comparadas pelo de Dunnett, com nível de significância de 5 %, sendo comparados os pães contendo extratos de ISP com o pão controle. A análise estatística foi realizada no programa Statistical Analysis System (SAS, 1996) versão 9.3, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

6.3. Resultados

6.3.1. Análise físico-química dos pães

Os pães elaborados com os extratos de ISP apresentaram composição centesimal semelhante ($p > 0,05$) a dos pães controle, indicando que os extratos não interferiram no conteúdo de proteína, cinzas e fibra alimentar (Tabela 13).

Tabela 11: Composição centesimal (base úmida) dos pães controle e elaborados com extrato de ISP obtido da folha de duas cultivares de trigo, na concentração de 8 mg / 100 g de massa. Valores apresentados em média \pm desvio padrão. (n=3)

Formulação	Pão Controle	Pão Endurance	Pão Ok Bullet
Umidade	29,1 \pm 0,7	29,4 \pm 0,1	28,9 \pm 0,7
Carboidratos	54,51 \pm 0,83	54,5 \pm 0,3	54,51 \pm 0,17
Proteínas	12,43 \pm 0,35	11,97 \pm 0,21	12,4 \pm 0,53
Lipídeos	0,16 \pm 0,09	0,2 \pm 0,05	0,19 \pm 0,03
Cinzas	1,7 \pm 0,1	1,97 \pm 0,21	1,90 \pm 0,17
Fibra alimentar solúvel	1,02 \pm 0,01	0,97 \pm 0,02	1,06 \pm 0,04
Fibra alimentar insolúvel	1,04 \pm 0,03	0,99 \pm 0,06	0,98 \pm 0,09
Fibra alimentar total	2,06 \pm 0,04	1,96 \pm 0,08	2,04 \pm 0,05

Não houve diferença significativa dos grupos testes em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

Os volumes, geral e específico, dos pães produzidos com massa congelada estão apresentados na Tabela 14. Ao analisar o volume específico, verificou-se que os extratos de ISP de ambas as cultivares de trigo proporcionaram um maior volume nos pães comparado ao controle após 30 dias de congelamento ($p < 0,05$). Quanto às coordenadas cromáticas, o extrato de nenhuma cultivar interferiu na luminosidade (“L”), na intensidade de vermelho (“a”), nem na intensidade de amarelo (“b”) do miolo dos pães em comparação ao controle (Tabela 14).

Tabela 12: Valores de médias e desvio padrão de volume (mL), volume específico (mL / g) e análise de cor dos pães controle e pães contendo 8 mg / 100 g de massa de ISP obtido de folhas de trigo de duas cultivares (n=3).

Formulação	Volume	Volume específico	Coordenadas cromáticas		
			"a"	"b"	"L"
Pão Controle	296 ± 12,6	2,21 ± 0,1	2,01 ± 0,04	19,9 ± 0,55	67,5 ± 1,55
Pão Endurance	329 ± 29,1	2,64 ± 0,2*	1,84 ± 0,15	19,8 ± 0,65	70,8 ± 0,68
Pão Ok Bullet	320 ± 17,3	2,67 ± 0,1*	1,76 ± 0,1	19,4 ± 0,47	71,1 ± 2,17

*Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

6.3.2. Análise do perfil de textura do miolo

O perfil da textura do miolo dos pães elaborados com extrato de ISP foram superiores ($p < 0,05$) ao pão controle (Figura 14), com valores de coesividade de 0,72 para pão controle e 0,77 para Endurance e Ok Bullet e de resiliência de 0,37 para os pães controle, 0,44 para o Endurance e 0,77 para o Ok Bullet.

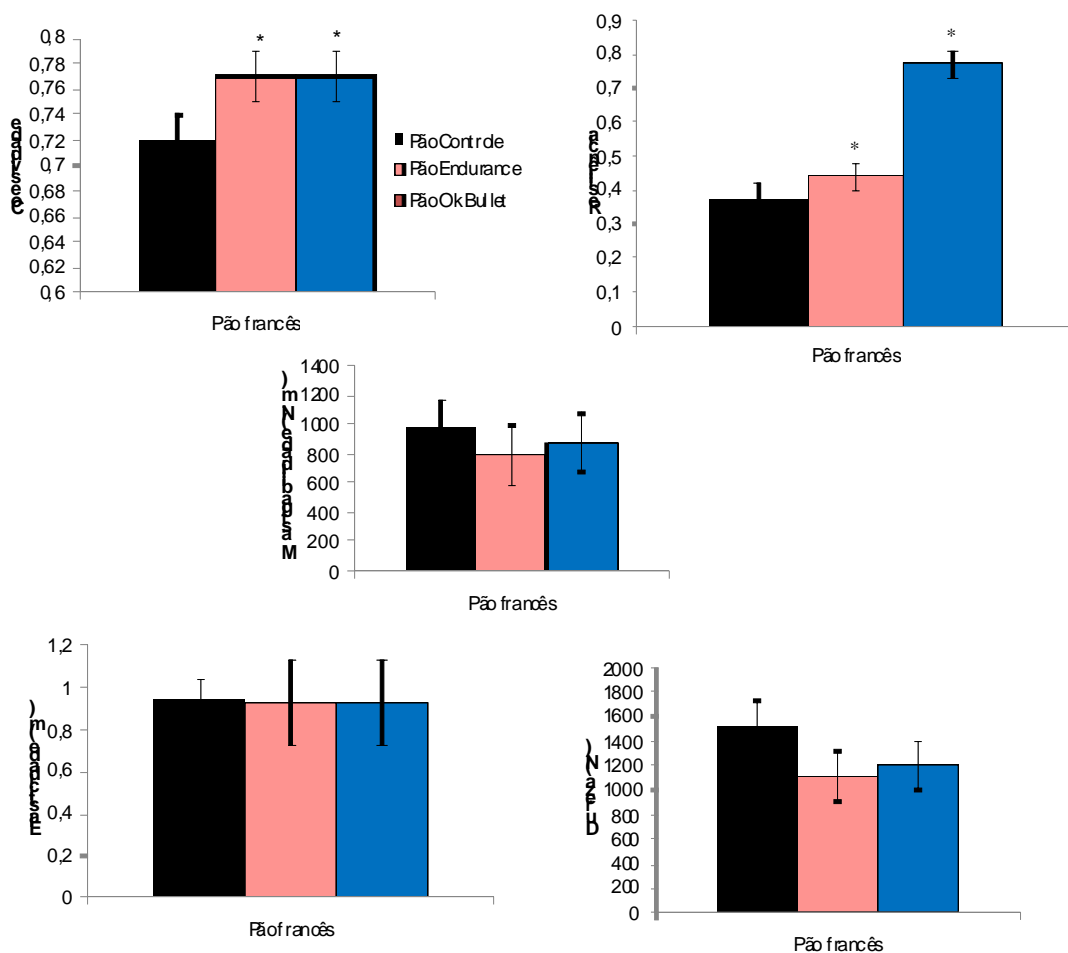


Figura 14: Análise de perfil de textura do miolo de pães elaborados com e sem extrato de ISP da folha do trigo de duas cultivares, elaborados com massa congelada por 30 dias. Valores de média e desvio padrão. *Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

Os valores de dureza do miolo dos pães variaram de 1113 N a 1530 N, sendo o valor maior referente ao pão controle, apesar de não significativo ($p= 0,1254$), os pães com adição de extrato apresentaram uma tendência na redução da dureza. A elasticidade variou de 0,94 m a 0,93 m; enquanto a mastigabilidade variou de 976 N.m a 792 N.m, sem diferenças ($p > 0,05$) entre os pães estudados.

6.3.3. Qualidade protéica

Os pesos corporais dos animais estão apresentados na Figura 15. Os animais iniciaram o experimento com pesos semelhantes ($p > 0,05$), conforme planejado. Não houve diferenças entre os pesos dos animais dos grupos que receberam o pão, com e sem extrato de ISP, ao longo dos 14 dias de experimento.

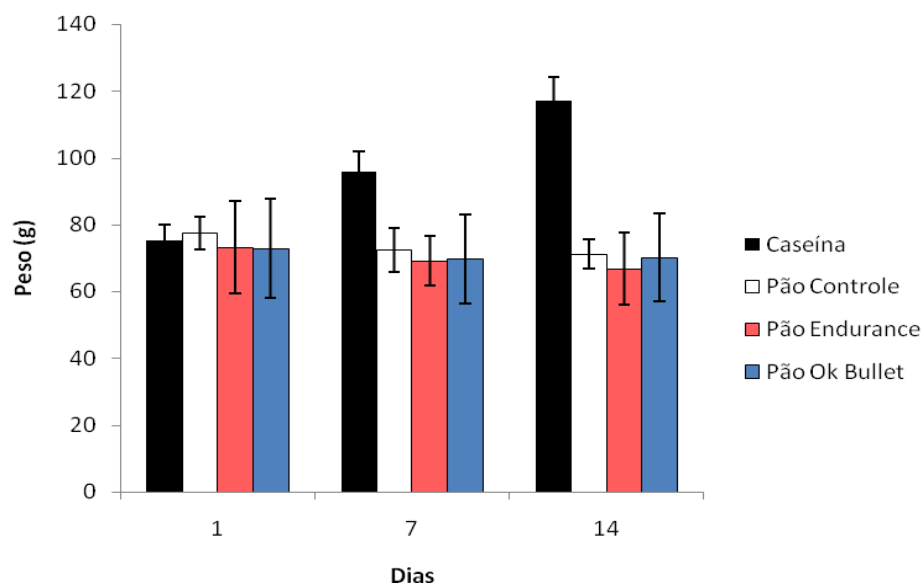


Figura 15: Efeito do consumo de pão com extrato de ISP no peso corpóreo dos animais experimentais durante 14 dias ($n= 6$). Não houve diferença significativa dos pães testes em relação ao pão controle, segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

O consumo alimentar, o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar dos grupos testes (Endurance e Ok Bullet) não diferiram do grupo pão controle ($p > 0,05$) ao final dos 14 dias (Tabela 15). Da mesma forma, a adição de extrato de ISP Endurance e Ok Bullet na elaboração de pão francês não influenciou no consumo de proteínas pelos animais, o PER, o NPR, a DV das dietas experimentais, nem o peso das fezes dos animais (Tabela 16).

Tabela 13: Valores de médias e desvio padrão do consumo total de dieta (g), ganho de peso total (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais durante 14 dias ($n=6$).

	Consumo alimentar	Ganho de peso	CEA
Caseína	204,55 ± 14,75	41,83 ± 4,49	2,14 ± 0,13
Pão Controle	90,49 ± 36,16	-6,17 ± 1,72	-14,58 ± 4,68
Pão Endurance	66,03 ± 20,98	-6,5 ± 4,84	-7,48 ± 4,87
Pão Ok Bullet	97,15 ± 18,46	-2,83 ± 2,48	-18,56 ± 26,34

Não houve diferença significativa dos pães testes em relação ao pão controle, segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

Tabela 14: Valores de médias e desvio padrão do consumo de proteína (g), coeficiente de eficiência protéica (PER), razão protéica líquida (NPR), digestibilidade verdadeira (DV) das dietas experimentais contendo caseína e pão francês, com e sem adição de ISP e o peso das fezes secas (g) dos animais experimentais.

Dieta	Proteína	PER	NPR	DV (%)	Fezes
Caseína	18,82 ± 1,35	2,22 ± 0,11	3,37 ± 0,09	91,84 ± 2,52	3,95 ± 0,51
Pão Controle	8,78 ± 1,86	-0,78 ± 0,26	-9,11 ± 1,31	83,68 ± 8,65	2,02 ± 0,38
Pão Endurance	7,84 ± 1,86	-0,84 ± 0,51	-9,38 ± 4,72	85,79 ± 6,29	1,63 ± 0,54
Pão Ok Bullet	8,66 ± 1,87	-0,30 ± 0,34	-5,42 ± 2,13	85,42 ± 3,01	2,02 ± 0,48

Não houve diferença significativa dos pães testes em relação ao pão controle, segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

Como apresentado na Tabela 17, o fígado dos animais que receberam o pão contendo extrato de ISP Ok Bullet apresentaram menor valor, absoluto e relativo, em relação aos animais do grupo pão controle.

Tabela 15: Valores de médias e desvio padrão dos pesos absoluto e relativo (g / 100 g corporais) dos órgãos dos animais experimentais após 14 dias (n= 6).

	Fígado		Rim	
	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo
Caseína	4,75 ± 0,39	4,19 ± 0,4	0,58 ± 0,34	0,62 ± 0,05
Pão Controle	3,02 ± 0,23	4,48 ± 0,29	0,43 ± 0,04	0,65 ± 0,02
Pão Endurance	2,87 ± 0,29	4,47 ± 0,15	0,42 ± 0,05	0,65 ± 0,03
Pão Ok Bullet	2,59 ± 0,26*	3,95 ± 0,47*	0,42 ± 0,06	0,65 ± 0,06

*Diferença significativa em relação ao grupo controle segundo o teste de Dunnett com nível de significância de 5 %.

6.4. Discussão

As proteínas estruturadoras de gelo vem sendo estudadas em massas de pão congeladas por apresentarem a habilidade de diminuir o conteúdo de água congelada na massa, resultando em efeitos benéficos tais como, estabilidade do volume do pão, maior maciez da massa e aumento da capacidade fermentativa da massa sem influenciar negativamente no sabor do pão produzido. No presente estudo, a adição de extrato de ISP obtidos de folhas de trigo proporcionaram um aumento no volume específico do pão, independentemente da cultivar do trigo. Estes efeitos estão associados à

capacidade das proteínas estruturadoras de gelo de diminuir o ponto de congelamento e retardar fortemente a recristalização (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

Quanto a composição química e a coloração dos pães, como era esperado, os extratos de ISP não alteraram as características típicas de pão francês, visto que a adição do extrato foi de 8 mg por 100 g de massa, e esta concentração está dentro da faixa de adição de ISP em massas de pão. Estudos apontam para a adição de 0,1; 0,06 e 0,08 % de ISP em massa de pães (KONTOGIORGOS, GOFF e KASAPIS, 2008; ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008; VIEIRA, 2011), para se ter resultados positivos no volume e textura sem alterar as demais características. Uma das vantagens dessas proteínas é que são consideradas ativas em quantidades muito pequenas (HASS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

A utilização de 0,08 % de extrato de ISP obtido das folhas de trigo (de ambas as cultivares) diminuiu a perda de coesividade e de resiliência do miolo dos pães, como observado nos pães controle. A coesividade representa a força das ligações internas (CARR e TADINI, 2002) e é um bom indicador do frescor do pão (COLLAR e BOLLAIN, 2004), enquanto a resiliência é a capacidade do material de absorver e liberar energia quando este é deformado, ou seja, é a propriedade verificada quando um pão é apertado com as pontas dos dedos, e, ao soltá-lo retorna a posição original (ABNT, 2013). A textura do pão pode ser influenciada pelo congelamento, causando baixa qualidade em pães, desta forma, os extratos de ISP de folhas de trigo foram importantes na prevenção destas alterações causadas pela formação de cristais de gelo na massa do pão.

No presente estudo, o resultado encontra-se dentro do esperado para a digestibilidade verdadeira dos pães controle e adicionados de ISP, que foi em torno de 85%, uma vez que a digestibilidade protéica de alimentos de origem vegetal variam de 60 a 85 % (KOPEC et al., 2011), e a mesma não foi influenciada pela adição do extrato de ISP. A digestibilidade de um produto é o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização protéica da dieta, sendo, portanto um condicionante da sua qualidade. Ela mede a porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvíveis na forma de aminoácidos, ou de qualquer outro composto

nitrogenado pelo organismo. Proteínas cujas ligações peptídicas não são hidrolisadas pelo processo digestivo são excretadas nas fezes ou sofrem transformações no intestino grosso (MACEDO e DAMICO, 2000; BORGES et al., 2010).

Os valores de consumo das dietas, CEA, PER e NPR dos grupos contendo extratos de ISP, não se diferenciaram ($p > 0,05$) do grupo com pão controle, apesar de todos os animais perderam peso, como consequência da baixa qualidade da proteína do trigo. Desta forma, a proteína do trigo promoveu baixo crescimento dos animais.

Valores pequenos encontrados de PER indicam que as proteínas presentes nas dietas com pão não são suficientes para obtenção de crescimento, pois segundo a interpretação desse índice, para cada 1 grama dos pães ingeridos, houve uma perda de 0,3 a 0,8 g de peso corporal. Os valores de NPR indicam uma baixa capacidade de utilização da proteína para fins de crescimento. Isto porque, apesar de o trigo apresentar boas propriedades tecnológicas para a produção de pão, suas proteínas são consideradas de baixa qualidade nutricional, devido à deficiência em aminoácidos essenciais (PIRES, 2006). O pão é pobre no aminoácido lisina e esta também foi a razão para o baixo ganho de peso e baixos valores de PER encontrado em animais alimentados com pães enriquecidos com fibra no estudo de Kopec et al. (2011). Entretanto, cabe ressaltar que a adição de ISP independente da cultivar do trigo não influenciou em nenhuma variável da qualidade protéica.

Após a necropsia dos animais, foi verificada a redução no peso absoluto e relativo do fígado dos animais que receberam o pão adicionado de extrato de ISP Ok Bullet em comparação aos animais que receberam pão controle. A concentração do extrato de ISP utilizada nos pães garantiu uma ingestão de aproximadamente $7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, considerando um adulto de 70 kg. Esta dosagem é considerada pequena para causar efeitos deletérios no organismo de animais, visto que estudo mostra que o consumo crônico de até $580 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de extrato de ISP de peixe possa ser seguro em ratos (Hall-Manning et al., 2004). Entretanto, torna-se necessário a investigação da toxicidade de pães contendo extratos de ISP de folha de trigo.

6.5. Conclusão

A utilização de extrato de ISP ($7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) extraído de folhas de trigo Endurance e Ok Bullet foi capaz de garantir um maior volume e preservar as propriedades de textura, coesividade e resiliência dos pães elaborados com massa congeladas por 30 dias a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta mesma quantidade de extrato não interferiu na composição química, na coloração típica dos pães, na qualidade das proteínas do pão francês. Entretanto, houve diminuição no peso, absoluto e relativo, do fígado dos animais que receberam dietas contendo extrato de ISP Ok Bullet.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A proteína estruturadora de gelo extraída das folhas do trigo das cultivares norte-americanas apresentou massa molar em torno de 20 kDa. O extrato protéico da cultivar Endurance apresentou maior conteúdo de proteínas e sólidos totais.

Os extratos de ISP obtidos foram inócuos no teste agudo na dosagem de 40 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ e na dosagem de 80 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ foi inócuo o extrato de ISP cultivar Endurance.

A dosagem de 114 µg.kg⁻¹.dia⁻¹ administrada de forma sub-crônica, por 90 dias, não alterou variáveis biométricas dos animais. No entanto, ocorreram alterações morfológicas e séricas, sendo estas não correlacionadas com alterações indicativas de toxicidade.

A utilização de 8 mg por 100 g de massa de extrato de ISP extraída de folhas de trigo Endurance e Ok Bullet foi capaz de garantir um maior volume e preservar as propriedades de textura, coesividade e resiliência, dos pães elaborados com massa congeladas por 30 dias a - 18 °C, sem alterar a coloração típica dos mesmos.

Nutricionalmente, esta mesma quantidade de extrato (7 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹) não interferiu na composição química, na qualidade das proteínas do pão francês, porém alterou o peso do fígado dos animais que receberam a dieta contendo extrato de ISP Ok Bullet. Sendo necessário maior investigação do consumo crônico de pão contendo o extrato de folhas desta cultivar.

O tipo de extração utilizado garante uma melhor garantia de segurança do uso dos extratos de ISP, pois permite a obtenção de ISP com solventes simples como ácido ascórbico, cloreto de cálcio, e EDTA. Entretanto, não permite o isolamento destas proteínas, podendo conter no extrato outras proteínas que causem efeitos deletérios ao organismo animal. Desta forma, a utilização da ISP purificada em estudos de inocuidade deve ser considerada.

O extrato de ISP da cultivar Ok Bullet deve ser melhor investigado tanto na ingestão aguda quanto na sua utilização em pães, devendo ser revista a

dosagem a ser utilizada, uma vez que ocasionou maiores alterações, principalmente, no fígado e baço dos animais do que a cultivar Endurance.

Sugere-se outros estudos a fim de esclarecer melhor os efeitos das ISP em organismos animais a fim de obter subsídios que fundamentem sua utilização no consumo humano, tais como:

- Avaliar a inocuidade aguda e sub-crônica de extrato de proteínas extruturadoras de gelo purificadas.
- Investigar a inocuidade sub-crônica de pães elaborados com extrato purificado de ISP.
- Realizar testes de inocuidade em animais machos e fêmeas.
- Examinar histologicamente o trato gastro-intestinal dos animais que receberam ISP.
- Avaliar a resposta imunológica dos animais experimentais.
- Analisar em estudos de inocuidades as cultivares nacionais.

8. ANEXO I

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 107/2013, intitulado “Toxicidade de proteínas estruturadoras de gelo obtida de folha de trigo”, coordenado pela professora Mônica Ribeiro Pirozi do Departamento de Tecnologia de Animal, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 21/02/2014 com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 107/2013, named “Toxicity of ice structuring proteins obtained from wheat leaf”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 21, 2014 valid for 12 months.


Prof. Cláudio César Fonseca

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

9. REFERÊNCIAS

- AACC. American Association of Cereal Chemists, 2000. Approved methods. (10a. Edição). Saint Paul: American Association of Cereal Chemists.
- ACTI, O.; NALBANTOGLU, B. Antifreeze protein in higher plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1187-1196, 2003.
- ANTIKAINEM, M.; GRIFFITH, M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. **Physiologia Plantarum**, v.99, p. 423-432, 1997.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemistry., 2012. Official methods of analysis. 19th ed. Gaithersburg, 3000p.
- ARAUJO, J. M. A. **Química de alimentos**. 3ª Ed. Viçosa:UFV, 2004.
- ATEBA, S., B.; SIMO, R. V.; MBANYA, J. C.; KRENN, L. Safety profile and gender specific differences of a methanol extract of *Eriosema laurentii* (Leguminosae) in acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 27-32, 2014.
- BÁRCENAS. M. E.; ROSELL, C. M. Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of par-baked bread. **Food Chemistry**, v. 95, p. 438–445, 2006.
- BARRETT, J. Thermal hysteresis proteins – Review. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.33, p.105-107, 2001.
- BERGLUND, P.; SHELTON, D.; FREEMAN, T. Frozen bread dough ultra structure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycle. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 105-107, 1991.
- BINDSLEV-JENSEN, C.; STEN, E.; EARL, L.K.; CREVEL, R.W.R.; BINDSLEV-JENSEN U.; HANSEN, T.K.; STAHL SKOV, P.; POULSEN, L.K. Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type III HPLC 12 using the FAO/WHO 2001 decision tree for novel foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 81-87, 2003.
- BONA, S. **Estudos da viabilidade da produção de pão francês a partir de massa congelada**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2002 (Dissertação de Mestrado).
- BORGES, J. T. S.; PIROZI, M. R.; COSTA, N. M. B.; VIDIGAL, J. G. Qualidade protéica de pão de sal contendo farinha de linhaça (*Linum usitatissimum L.*). **Alim Nutr**, v. 21, p. 109-117, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASLAVSKY, I.; DRORI, R.; CELIK, Y.; DOLEV, M. B.; DAVIES, P. L. The dynamic nature of antifreeze protein activity. **Abstracts/Cryobiology**, v. 76, p. 415, 2013.

CAETANO, C. Tecnologia de Congelamento: como, quando e por quê? **Revista Padaria 2000**. Edição 36, p.32-45, 2000.

CAMPELO, F. A. **Extração e Purificação de Proteínas Estruturadoras de Gelo Obtida da Folha do Trigo**. Viçosa/MG, 2014 (Dissertação de mestrado).

CARR, L. G.; TADINI, C. C. Influencia da quantidade de levedura e gordura vegetal sobre os parâmetros físicos e de textura no pão tipo francês pré assado congelado. **Congresso Internacional de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2002. Disponível em <http://sites.poli.usp.br/pqi/lea/docs/cicta2002b.pdf> Acesso em 23/05/2015.

CAUVIN, S. P.; YOUNG, L. S. Bread spoilage and staling. **Technology of breadmaking**, p.248-259, 1998.

CHEN, G.; JANSSON, H.; LUSTRUP, K. F.; SWENSON, J. Formation and distribution of ice upon freezing of different formulations of wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 279-284, 2012.

CHEN, G.; OHGREN, C.; LANGTON, M.; LUSTRUP K. F.; NYDEN, M.; SWENSON, J. Impact of long-term frozen storage on the dynamics of water and ice in wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 57, p. 120-124, 2013.

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

CONTADO, E. W. N. F.; PEREIRA, J.; EVANGELISTA, S. R.; JUNIOR, F. A. L.; ROMANO, L. M.; COUTO, E. M. Composição centesimal da mucilagem do inhame (*Dioscorea spp.*) liofilizado comparado a de um melhorador comercial utilizado na panificação e avaliação sensorial de pães de forma. **Ciências Agrárias**, v.33, p. 1813-1818, 2009.

CREVEL, R. W. R.; COOPER, K. J.; POULSEN, L. K.; HUMMELSHOJ, L.; BINDSLEV-JENSEN, C.; BURKS, A. W.; SAMPSON, H. A. Lack of immunogenicity of ice structuring protein type III HPLC12 preparation administered by the oral route to human volunteers. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 45, p. 79-87, 2007.

CREVEL, R. W. R.; FEDYK, J. K.; SPURGEON, M. J. B. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 899-903, 2002

DAVIES, P. L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 11, p. 548-555, 2014.

DING, X.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, H.; XIAO, J. Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 32-40, 2015.

EYNARD, A. R. **Histologia e embriologia humanas: bases celulares e moleculares**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed. 696p. 2011.

EZEJA, M. I.; ANAGA, A. O.; ASUZU, I. U.. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.034>.

FARIAS, J. L. *et al.*. **Patologia geral: fundamento das doenças, com aplicações clínicas**. 4 ed. atual e ampliada. Rio de Janeiro. 2010. 297p.

GRIFFITH, M.; LUMB, C.; WISEMAN, B. S.; WISNIEWSKI, M.; JOHNSON, R. W.; MARANGONI, A. G. Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. **Plant Physiology**, v. 138, p. 330-340, 2005.

HALL-MANNING, T.; SPURGEON M.; WOLFREYS, A. M.; BALDRICK, A. P. Safety evaluation of ice-structuring protein (ISP) type III HPLC 12 preparation. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 321-333, 2004.

HASSAS - ROUDSARI, M.; Extraction, Purification and study of mechanism of action of apoplastic ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat leaves. 2011.168p. Tese de Doutorado. University of Guelph. Canadá, 2011.

HASSAS-ROUDSARI, M.; GOFF, H. D. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. **Food Research International**, v. 46, p. 425-436, 2012.

HON, W. C.; GRIFFITH, M.; CHONG, P.; YANG, D. S. C. Extraction and Isolation of antifreeze Proteins from Winter Rye (*Secale cereal L.*) Leaves. **Plant Physiology**, v. 104, p. 971-980, 1994.

HOSHINO, T., ODAIRA, M., YOSHIDA, M., AND TSUDA, S. Physiological and biochemical significance of antifreeze substances in plants. **Journal of Plants Research**. v.112, p.255-261, 1999.

JIA, C.; HUANG, W.; RAYAS-DUARTE, P.; ZOU, Q.; ZHANG, L. Hydration, polymeration and rheological properties of frozen gluten-water dough as influenced by thermostable ice structuring protein extract from Chinese privet (*Ligustrum vulgare*) leaves. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 132-136, 2014.

KIANI, H.; SUN, D. W. Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 407-426, 2011.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H. D.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice-structuring protein on the physical properties of frozen flour-water mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1135-1147, 2008.

KOPEC, A.; PYSZ, M.; BORCZAK, B.; SIKORA, E.; ROSELL, C. M.; COLLAR, C.; SIKORA, M. Effect of sourdough and dietary fiber on the nutritional quality of breads produced by bake-off technology, v. 54, p. 499-505, 2011.

MACEDO, M. L. R.; DAMICO, D. C. S. Effects of proteína fractions from *Zea mays* L. on development and survival of Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Insect Sci Applicarion**, v. 20, p. 135-139, 2000.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAUJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Estudos toxicológicos agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 16, n.3, p. 372-378, 2006.

MATUDA, T. G. **Análise térmica da massa de pão francês durante o processo de congelamento e descongelamento**. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004 (Dissertação de Mestrado).

MATUDA, T. G. **Estudo do congelamento da massa de pão: determinação experimental das propriedades termofísicas e desempenho de panificação**. São Paulo, 2008 (Tese de doutorado).

MEZIANI, S.; IOANNOU, I.; JASNIEWSKI, J.; BELHAJ, N.; MULLER, J. M.; GHOUL, M.; DESOBRY, S.,. Effects of freezing treatments on the fermentative activity network integrity of sweet dough. **LWT- Food Science and Tecnology**, v.46, p. 118-126, 2012.

MOREIRA, M. E. C., PEREIRA R. G. F. A., DIAS S. M. J., DIAS D. F., GONTIJO V. S., GIUSTI-PAIVA A., VELOSO M. P., DORIGUETTO A. C., NAGEM T. J., SANTOS M. H. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the 2,8-Dihydroxy-1,6-Dimethoxyxanthone from *Haploclathra paniculata* (Mart) Benth (Guttiferae). **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 6, p. 686-693, 2014.

OLIVEIRA, C. R.; RIGO, L. A.; FRANÇA, R. T.; GRESSLER, L. T.; ROSA, L. D.; OURIQUE, A. F.; OLIVEIRA, D. T.; DOYLE, R. L.; MOREIRA, K. L. S.; VEIGAS, M. L.; LOPES, S. T. A.; BECK, R. C. R.; SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. Diminazene Aceturate Liposomes: Morphometric and Biochemical Liver, Kidney, and Spleen of Rats Infected with *Trypanosoma evansi*. **Pathol. – Res. Pract**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.08.010>.

PHIMOLSIRIPOL, Y.; SIRIPATRAWAN, U.; TULYATHAN, V.; CLELAND, D.J. Effect of freezing and temperature fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality. **Journal of Food Engineering**, v.84, p.48-56, 2008.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 26, p. 179-187, 2006.

PIROZI, M.R.; MACRITCHIE, F. Antifreeze proteins from winter wheat and its potential application in frozen bread doughs (Oral Presentation). KSU Graduate Research Forum. Kansas State University, Manhattan, KS, April 2002.

PROPAN 2015. **Programa de Desenvolvimento da Alimentação, Confeitaria e Panificação** – Propan. Disponível em www.propan.com.br. Acesso em 07/07/2015.

RÄSÄNEN, J., HÄRKÖNEN, H., AUTIO, K. Freeze-thaw stability of prefermented frozen lean wheat doughs: effect of flour quality and fermentation time. **Cereal Chemistry**, St paul, v. 72, n. 6, p. 637-642, 1995.

REGAND, A., GOFF, H. D. Ice Recrystallization Inhibition in Ice Cream as Affected by Ice Structuring Proteins from Winter Wheat Grass. **Journal of Dairy Science**, v.89, p 49-57, 2006.

RONDA F.; ROSS, Y. H. Staling of fresh and frozen gluten-free bread. **Journal of Cereal Science**, v. 53, p. 340-346, 2011.

ROUDSARI, M. H. **Extraction, Purification and study of mechanism of action of apoplastic ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat leaves**. Canada. 2011. (Tese de Doutorado).

RUPEREZ, P.; BRAVO, L. Oligofructanos y gomas. In: Lajolo, L. M.; Calixto, F. S.; Penna, E. W.; Menezes, E. W. **Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnologia y Salud. Obtencion, Caracterizacion, Efecto Fisiológico y Aplicacion en Alimentos**. Varela: São Paulo, 2001.

Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from the European Commission on the safety of 'Ice Structuring Protein (ISP)'. **The EFSA Journal**, v. 768, p. 1-18, 2008.

SELOMULYO, V.O.; ZHOU, W. Frozen bread dough: effects of freezing storage and dough improvers. **Journal of Cereal Science**, v. 45, p. 1-17, 2007.

SIREATOWON G., S.; LERTPRASERTSUKE, N.; SRISAWAT, U.; THUPPIA, A.; NGAAMJARIYAWAT, A.; SUWANNLIHIO, N.; JAIJOY, K. Acute and sub-chronic toxicity study of the water extract from *tiliacora*

trianora (Colebr.)Diels in rats. **Journal Science and Techonology**, v. 30, p. 729-737, 2008.

SITOHY, M.; OSMAN, A.; GHARIB, A.; CHOBERT, J. M.; HAERTIE, T. Food and Chemical Toxicology, v. 59, p. 618-625, 2013.

SOARES-MOTA, M. R.; SCHWARZ, A.; BERNARDI, M. M.; MAIORKA, P. C.; SPINOSA, H. S. Toxicological evaluation of 10% *Solanum lycocarpum* St Hill fruit consumption in the diet of growing rats: Hematoligical, biochemical and histopathological effects. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 549-553, 2010.

SOUSA, L. M. C. **Incorporação e otimização de aditivos alimentares e auxiliares tecnológicos em produtos de panificação**. Universidade Católica Portuguesa. Porto/2012. (Relatório para obtenção do título de mestre em Engenharia Alimentar).

TOMASZEWSKA, E.; WINIARSKA-MIECZAN, A.; DOBROWOLSKI, P. Hematological and serum biochemical parameters of blood in adolescent rat and histomorphological changes in the jejuna epithelium and liver after chronic exposure to cadminum and lead in the case of supplementation with green tea vs black, red or white tea. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, p. 331-339, 2015.

VEIGA, R. K. A.; MELO-JÚNIOR, M. R.; ARAÚJO FILHO, J. L. S.; MELLO, L. A. ; PONTES-FILHO, N. T. Alterações morfométricas no timo, baço e placas de peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. **Revista Eletronica de Farmácia**, v. 4, p. 32-42, 2007.

VIEIRA, C. R. **Proteínas estruturadora de gelo em cultivares brasileiras de trigo em centeio: ocorrência, caracterização e aplicação em massas congeladas**. Viçosa/MG. 2011. (Tese de doutorado).

WANG, P.; XU, L.; NIKOO, M.; OCEN, D.; WU, F.; YANG, N.; JIN, Z.; XU, X.; Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. **Food Hydrocolloids**. v.35, p.238-246, 2014.

XU, H. N.; HUANG, W.; JIA, C.; KIM, Y.; LIU, H. Evaluation of water holding capacity and breadmaking properties for frozen dough conteining ice structuring proteins from winter wheat. *Journal of Cereal Science*. v. 49, p. 250-253, 2009a.

XU, H. N.; HUANG, W.; WANG, Z.; DUARTE, P. R. Effect of ice structuring protein from winter wheat on thermophysical properties of dough during freezing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 410-413, 2009.

XU, H. N.; HUANG, W.; WANG, Z.; DUARTE, P. R. Effect of ice structuring protein from winter wheat on thermophysical properties of dough during freezing. **Journal of Cereal Science**. v. 50, p.410-413, 2009b.

ZACHARIASSEN, K. E.; KRISTIANSEN, E. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. **Cryobiology**, v.41,p.257–279, 2000.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; GAO, H.; GUO, X. N. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze protein on texture properties of frozen dough and volatile compounds os crumb. **LWT- Food Science and Tecnology**, v. 41, p. 1029-1036, 2008.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; GAO, H.; GUO, X. N.; YAO, H. Y. Improvement of texture properties and flavor of frozen dough by carrot (*Daucus carota*) antifreeze protein supplementation. **J.Agric Food Chem**, v. 55, p. 9620-9626, 2007.

ZHAO, Y., XIE, J. Pratical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 434-451, 2004.