

CLAUDIA REGINA VIEIRA

**PROTEÍNA ESTRUTURADORA DE GELO EM CULTIVARES
BRASILEIRAS DE TRIGO E CENTEIO: OCORRÊNCIA,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM MASSAS
CONGELADAS**

**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
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V658p
2011

Vieira, Claudia Regina, 1970-

Proteína estruturadora de gelo em cultivares brasileiras de trigo e centeio: ocorrência, caracterização e aplicação em massas congeladas / Claudia Regina Vieira. – Viçosa, MG, 2011.

xvi, 72f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Mônica Ribeiro Pirozi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 60-64

1. Pão - Processamento. 2. Proteínas anticongelantes.
3. Microscopia - Técnica. 4. Trigo. 5. Centeio.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.7532

CLAUDIA REGINA VIEIRA

**PROTEÍNA ESTRUTURADORA DE GELO EM CULTIVARES
BRASILEIRAS DE TRIGO E CENTEIO: OCORRÊNCIA,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM MASSAS
CONGELADAS**

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: 26 de março de 2011.



Prof. José Benício Paes Chaves
(Coorientador)



Prof. Moacil Alves de Souza
(Coorientador)



Profª Maria Beatriz Abreu Glória



Prof. Renato Souza Cruz



Profª Mônica Ribeiro Pirozi
(Orientadora)

*Ao meu pai:
maranhense de nascimento,
cearense por devoção e
carioca de coração.*

Dedico.

“Uma longa viagem começa com um único passo”.
(Lao-Tsé)

AGRADECIMENTOS

À todos que tornaram possível a realização deste trabalho:

Em primeiro lugar, à minha família, principalmente ao meu filho Rodrigo, minha irmã Ana, meu irmão Jorge e minha “irmãdrasta” Bárbara pela compreensão, carinho, preocupação e apoio nestes anos de doutorado;

À minha orientadora e amiga, Prof^a Mônica Ribeiro Pirozi, por ter me acompanhado em todos os momentos (profissionais e pessoais) bons e difíceis nesses últimos anos em Viçosa;

Aos professores José Benício Paes Chaves e Moacil Alves de Souza pela oportunidade de tê-los tido como colaboradores nesse trabalho;

Aos membros da banca examinadora, professores Renato Souza Cruz e Maria Beatriz Abreu Glória pelas contribuições e as valiosas ideias finais;

Ao meu “casal favorito”: Brenda e Humberto, que estiveram ao meu lado compartilhando tantos momentos felizes, e também tristes, além da grande ajuda nos experimentos e análises dos dados;

Aos meus amigos do Rio de Janeiro, de Belo Horizonte e de Viçosa, que felizmente são muitos, agradeço pela amizade, pelas risadas, pelos “ombros e ouvidos amigos”, pelas diversões, pela compreensão na minha ausência nos momentos importantes;

Aos amigos do LAFA: Ana, Natanielli, Tatiana e Maradini pela contribuição na parte experimental e pela ótima convivência diária. Agradeço especialmente, a minha querida equipe de laboratório: Carolina, Cileimar, Flávia e Juliana, por toda dedicação no nosso trabalho;

Aos meus colegas de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do DTA/UFV pela troca de experiências e aos professores pela contribuição em minha formação científica, em especial à Prof^a Edimar Aparecida Filomeno Fontes pelas sugestões na redação da tese;

Aos funcionários do DTA/UFV, por sua contribuição direta e indireta na realização das minhas atividades acadêmicas, em especial ao Divino e Perereca, pelo apoio técnico nos experimentos;

Ao Departamento de Química (UFV) e aos meus alunos pelas oportunidades de crescimento profissional;

Ao Departamento de Fitotecnia (UFV) pela concessão do espaço físico para realização desse trabalho;

À Prof^a Rosy Mary dos Santos Isaias, ao técnico de laboratório Wagner Rocha e ao aluno de doutorado Thiago Magalhães do Departamento de Botânica do ICB/UFMG pelas contribuições importantíssimas nas análises de microscopia nessa reta final;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto de tese de doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado;

Agradeço.

BIOGRAFIA

Claudia Regina VIEIRA, filha de Benedito Tristão VIEIRA e Neide VIEIRA, nasceu no Rio de Janeiro, capital, em 9 de junho de 1970. Possui curso Técnico em Química pela Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro (ETFQ-RJ), onde estudou de Março de 1985 a Dezembro de 1988. Em março de 1989, iniciou o Curso de Licenciatura em Química na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), concluindo em dezembro de 1993. Fez o curso de mestrado em Ciência de Alimentos na Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) durante o período de março de 2005 a março de 2007. Ingressou no Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, em março de 2007. Foi professora substituta de Química Analítica, Orgânica e Geral no Departamento de Química (DEQ) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, no período de junho de 2008 a Dezembro de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS _____	viii
LISTA DE FIGURAS _____	ix
LISTA DE ABREVIATURAS _____	xii
RESUMO _____	xiii
ABSTRACT _____	xv
INTRODUÇÃO _____	1
OBJETIVOS _____	2
Objetivo geral _____	2
Objetivos específicos _____	2
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA _____	3
1.1 TRIGO E CENTEIO: ASPECTOS GERAIS _____	3
1.2 PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO _____	4
1.2.1 Histórico e fontes _____	4
1.2.2 Tipos e estruturas das ISPs _____	6
1.2.3 Mecanismo de ação das ISPs _____	8
1.3 APLICAÇÕES DAS ISPs _____	9
1.4 MASSAS CONGELADAS _____	11
1.4.1 Importância econômica _____	11
1.4.2 Importância do glúten na panificação _____	12
1.4.3 Efeitos do congelamento na qualidade da massa _____	14
1.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS _____	15
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO EM CULTIVLEIRAS DE TRIGO E CENTEIO _____	17
2.1 INTRODUÇÃO _____	17
2.2 MATERIAL E MÉTODOS _____	19
2.2.1 Material experimental _____	19
2.2.2 Preparação dos extratos de ISPs _____	20
2.2.3 Análises de sólidos totais, proteína e cinzas nos extratos de ISPs _____	20
2.2.4 Identificação das proteínas estruturadoras de gelo (ISPs) _____	20
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	21
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	21
2.4.1 Teor de sólidos totais, proteína e cinzas nos extratos de ISPs _____	21
2.4.2 Identificação das proteínas estruturadoras de gelo (ISPs) _____	23
2.5 CONCLUSÕES _____	26

CAPÍTULO 3 – DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO EM CULTIVARES BRASILEIRAS DE TRIGO _____	27
3.1 INTRODUÇÃO _____	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS _____	29
3.2.1 Material experimental _____	29
3.2.2 Extração das proteínas estruturadoras de gelo _____	30
3.2.3 Caracterização protéica dos extratos de ISPs _____	30
3.2.4 Atividade das ISPs _____	30
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	31
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	31
3.4.1 Composição protéica dos extratos de ISPs _____	31
3.4.2 Identificação das proteínas estruturadoras de gelo (ISPs) _____	33
3.4.3 Atividade das ISPs _____	35
3.5 CONCLUSÕES _____	37
 CAPÍTULO 4 – EFEITO CRIOPROTETOR DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO EM MASSAS DE PÃO CONGELADAS _____	 38
4.1 INTRODUÇÃO _____	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS _____	39
4.2.1 Material experimental _____	39
4.2.2 Preparação dos extratos de ISPs _____	40
4.2.3 Caracterização dos extratos de ISPs _____	40
4.2.4 Elaboração de massa de pão tipo francês _____	40
4.2.5 Sinérese nas massas de pão congeladas _____	41
4.2.6 Identificação e quantificação das proteínas nas massas de pão _____	41
4.2.7 Microscopia das massas de pão _____	44
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	44
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	45
4.4.1 Caracterização dos extratos de ISPs _____	45
4.4.2 Sinérese nas massas de pão congeladas _____	46
4.4.3 Identificação e quantificação das proteínas nas massas de pão _____	49
4.4.4 Microestrutura das massas de pão _____	52
4.5 CONCLUSÕES _____	57
 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS _____	 58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	60
ANEXOS _____	65

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1 – Teor de sólidos totais e proteína nos extratos de ISPs obtidos a partir das plantas de trigo e centeio. _____	22
--	----

Capítulo 4

Tabela 4.1 – Proteína polimérica total e não extraível das massas de pão tipo francês congeladas utilizando extrato protéico da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera) e da massa fresca sem adição de extrato (controle) _____	52
Tabela 4.2 – Proteína polimérica total e não extraível das massas de pão tipo francês congeladas utilizando extrato protéico da cultivar CD 104 (trigo de inverno) e da massa fresca sem adição de extrato (controle) _____	52

Anexos

Tabela A.1 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de sólidos totais nos extratos de ISPs _____	66
Tabela A.2 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de proteína nos extratos de ISPs _____	66
Tabela A.3 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de cinzas nos extratos de ISPs _____	66
Tabela A.4 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de sólidos totais nos extratos de ISPs _____	70
Tabela A.5 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de proteína nos extratos de ISPs _____	70
Tabela A.6 – Resultado do teste de ajustamento do modelo linear para as coordenadas teor de proteína total (mg proteína/100g massa) e proteína polimérica total (PPT) em massas congeladas com adição do extrato da cultivar IPR 89 aclimatada ao frio _____	71
Tabela A.7 – Resultado do teste de ajustamento do modelo linear para as coordenadas teor de proteína total (mg proteína/100g massa) e proteína polimérica não extraível (PPNE) em massas congeladas com adição do extrato da cultivar IPR 89 aclimatada ao frio _____	71
Tabela A.8 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de PPT e PPNE no extrato da cultivar BRS Guabiju _____	72
Tabela A.9 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de PPT e PPNE no extrato da cultivar CD 104. _____	72
Tabela A.10 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de PPT e PPNE no extrato da cultivar IPR 89. _____	72

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 – Morfologia do crescimento de cristal de gelo _____ 9

Capítulo 2

Figura 2.1 – Géis de eletroforese em SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares de trigo de primavera (BRS Guabiju, Ônix e LD 062212 AF), centeio (IPR 89) e trigo de inverno (IPR 84 e CD 104) aclimatados ao frio (AF) e não aclimatados (NA) por sete semanas de cultivo _____ 24

Capítulo 3

Figura 3.1 – Teor protéico dos extratos de ISPs das folhas das plantas de trigo de primavera (BRS Guabiju) e de inverno (CD 104) aclimatadas ao frio por uma a sete semanas. _____ 32

Figura 3.2 – SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares CD 104 (trigo de inverno) e BRS Guabiju (trigo de primavera) obtidos na primeira, segunda e terceira semana de aclimação ao frio. _____ 33

Figura 3.3 – SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares CD 104 (trigo de inverno) e BRS Guabiju (trigo de primavera) obtidos na quarta, quinta e sexta semana de aclimação ao frio. _____ 33

Figura 3.4 SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares CD 104 (trigo de inverno) e BRS Guabiju (trigo de primavera) obtidos na sétima semana de aclimação ao frio e não aclimatados. _____ 34

Figura 3.5 – Morfologia dos cristais de gelo: na água destilada (a), no tampão Tris-HCl (b), nos extratos das cultivares de trigo de primavera BRS Guabiju AF (c) e NA (d) e de inverno CD 104 AF (e) e NA (f). _____ 36

Capítulo 4

- Figura 4.1 – Perfil de separação de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da farinha de trigo por SE-HPLC. _____ 43
- Figura 4.2 – Morfologia dos cristais de gelo: na água destilada (a), no tampão Tris-HCl (b), no extrato da cultivar de centeio IPR 89 (c), e nos de trigo de primavera BRS Guabiju (d) e de inverno CD 104 (e). _____ 46
- Figura 4.3 – Percentual de sinérese nas massas de pão tipo francês utilizando extrato protéico da cultivar IRP 89 (centeio). _____ 47
- Figura 4.4 – Percentual de sinérese nas massas de pão tipo francês utilizando extrato protéico da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera). _____ 47
- Figura 4.5 – Percentual de sinérese nas massas de pão tipo francês utilizando extrato protéico da cultivar CD 104 (trigo de inverno). _____ 48
- Figura 4.6 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa fresca de pão tipo francês sem adição de extrato __ 50
- Figura 4.7 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês sem adição de extrato. _____ 50
- Figura 4.8 – Proteína polimérica total (a) e não extraível (b) das massas de pão tipo francês congeladas utilizando extrato protéico da cultivar IPR 89 (centeio). __ 51
- Figura 4.9 – Microscopia eletrônica de varredura da massa de pão tipo francês (a) e (b) fresca e (c) e (d) congelada, ambas sem adição de extrato. _____ 53
- Figura 4.10 – Microscopia eletrônica de varredura (5000x) da massa de pão tipo francês congelada utilizando extrato de ISPs da cultivar IPR 89 (centeio). _____ 54
- Figura 4.11 – Microscopia eletrônica de varredura da massa de pão tipo francês congelada utilizando extrato de ISPs da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera). _____ 55
- Figura 4.12 – Microscopia eletrônica de varredura da massa de pão tipo francês congelada utilizando extrato de ISPs da cultivar CD 104 (trigo de inverno). _____ 56

Anexos

Figura A.1 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar IPR 89 (centeio) ao nível de 4 mg de proteína/100 g massa. __67

Figura A.2 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar IPR 89 (centeio) ao nível de 8 mg de proteína/100 g massa. __67

Figura A.3 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar IPR 89 (centeio) ao nível de 12 mg de proteína/100 g massa. _67

Figura A.4 – Cromatogramas de proteína total – PPT (A), extraível – PE (B) e não extraível – PNE (C) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar BRS Guabiju ao nível de 4 mg de proteína/100 g massa. _____68

Figura A.5 – Cromatogramas de proteína total – PPT (A), extraível – PE (B) e não extraível – PNE (C) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar BRS Guabiju ao nível de 8 mg de proteína/100 g massa. _____68

Figura A.6 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar BRS Guabiju ao nível de 12 mg de proteína/100 g massa. _____68

Figura A.7 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar CD 104 ao nível de 4 mg de proteína/100 g massa. _____68

Figura A.8 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar CD 104 ao nível de 8 mg de proteína/100 g massa. _____69

Figura A.9 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar CD 104 (trigo de inverno) ao nível de 12 mg de proteína/100 g massa. _____69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AF	Aclimatado ao frio
AFGP(s)	Antifreeze Glicoprotein(s) – Glicoproteína(s) anticongelante(s)
AFP(s)	Antifreeze Protein(s) – Proteína(s) anticongelante(s)
Ala	Alanina
CRA	Capacidade de retenção de água
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
HMW-GS	Subunidades de gluteninas de alta massa molecular
ISP(s)	Ice Structuring Protein(s) – Proteína(s) estruturadora(s) de gelo
LMW-GS	Subunidades de gluteninas de baixa massa molecular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NA	Não aclimatado
Phe	Fenilalanina
PPE	Teor de proteína polimérica extraível
PPNE	Teor de proteína polimérica não extraível
PPT	Teor de proteína polimérica total
Pro	Prolina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SE-HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução por exclusão molecular.
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UR	Umidade Relativa

RESUMO

VIEIRA, Claudia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Proteína estruturadora de gelo em cultivares brasileiras de trigo e centeio: ocorrência, caracterização e aplicação em massas congeladas.** Orientadora: Mônica Ribeiro Pirozi. Coorientadores: José Benício Paes Chaves e Moacil Alves de Souza.

Proteína estruturadora de gelo (ISP) têm demonstrado um grande potencial na melhoria da qualidade dos alimentos congelados, e a obtenção dessas proteínas a partir de fontes naturais tem sido considerada importante. Cultivares de trigo de inverno (IPR 84 e CD 104) e primavera (BRS Guabiju, Ônix e LD 062212) e centeio (IPR 89) após 12 dias de germinação, cresceram por sete semanas sob condições naturais (casa de vegetação, sem controle de temperatura, umidade e iluminação) e frio (0–3°C; UR ~ 80 %) com diferentes regimes de luz (1 400 e 2 000 LUX) e um fotoperíodo de 10/14 h (dia/noite). As plantas foram colhidas e suas folhas, após cortadas, foram trituradas com solução tampão Tris-HCl (pH 7,4) para extração das proteínas pelo método de infiltração a vácuo. Os extratos brutos de ISPs assim obtidos foram reportados como não aclimatados (NA) e aclimatados (AF) e analisados quanto à sua composição química. A presença de ISPs nos extratos foi constatada por eletroforese em SDS-PAGE e pela morfologia dos cristais de gelo. Os extratos AF foram utilizados em massas congeladas para verificar o efeito crioprotetor. Massa fresca (recém preparada) e congelada sem adição de extratos de ISPs foram usadas para comparação. Foram realizadas as seguintes análises nas massas: sinerése, com três ciclos de congelamento/descongelamento, identificação e quantificação de proteínas da massa de pão por SE-HPLC e microestrutura da massa por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O teor de sólidos totais variou de 0,74 a 0,86 % para os extratos AF e 0,92 a 1,70 % para os NA; o teor de proteína de 51,69 a 60,69 % para os extratos AF e 43,78 a 52,18 % para os NA. A interação tipo de tratamento e cultivar não influenciou nos teores de cinzas, mas a aclimação ao frio promoveu menor síntese de minerais. A partir dos resultados de eletroforese em SDS-PAGE, pode-se observar que os extratos NA praticamente não apresentaram bandas, em contrapartida, várias bandas com massa molecular entre 14,4 e 97,0 kDa foram observadas em todos extratos AF. As

cultivares de trigo de primavera mostraram-se menos responsivas ao frio do que as de inverno, uma vez que uma quantidade menor de bandas foram observadas nos géis. As cultivares de trigo de inverno, assim como o centeio apresentaram um maior número de bandas entre 14,4 a 66,0 kDa, enquanto que nas de primavera foram identificadas proteínas na faixa de 20,1 a 66,0 kDa. Após a caracterização dos extratos de ISPs, apenas as cultivares de centeio IPR 89 e de trigo de primavera BRS Guabiju e de inverno CD 104 foram utilizadas no seguimento da pesquisa. Os extratos AF obtidos apresentaram capacidade em modificar o formato dos cristais de gelo, formando cristais tetraédricos e hexagonais diferentes dos formados por soluções que não continham ISPs (formatos arredondados e planos) comprovando atividade das proteínas presentes. Embora não significativa, houve uma tendência à diminuição da sinerese das massas de pão congeladas com a adição de extratos de ISPs, principalmente após o terceiro ciclo de congelamento/descongelamento. Extratos de ISPs das cultivares de trigo (BRS Guabiju e CD 104) não exerceram influência no teor de proteínas poliméricas totais (PPT) e não extraíveis (PPNE) nas massas, mas o da cultivar de centeio (IRP 89) reduziu os valores de PPT e PPNE das massas congeladas, as quais exibiram perfil cromatográfico similar aos encontrados para a massa fresca. As imagens em MEV das massas congeladas com e sem extratos de ISPs e da massa fresca permitiram observar os danos causados na rede de glúten com o congelamento. O estudo da microestrutura das massas permitiu verificar que o uso de extratos de ISPs em massa de pão congelada promoveu maior preservação da matriz protéica, indicando um grande potencial para fabricação de um produto com características semelhantes ao de pão fresco. Esses resultados podem contribuir para divulgar a presença dessas proteínas em diferentes cereais plantados no Brasil, e aumentar o interesse na sua obtenção a partir dessas fontes e sua aplicação em alimentos congelados.

ABSTRACT

VIEIRA, Claudia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2011. **Ice structuring protein in Brazilian wheat and rye varieties: occurrence, characterization and application in frozen dough.** Advisor: Mônica Ribeiro Pirozi. Co-Advisors: José Benício Paes Chaves and Moacil Alves de Souza.

Ice structuring protein (ISP) has shown a great potential to improve the quality of frozen foods. The extraction of these proteins from natural sources has been considered important. Twelve days after planting (germination period), winter (IPR 84 and CD 104) and spring (BRS Guabiju, Ônix and LD 062212) wheat varieties, and rye (IPR 89), grew for seven weeks under natural (green house, no temperature, light or humidity control) and cold conditions (0-3 °C; 80 % RH, light conditions of 1 400 or 2 000 LUX, with a photoperiod of 10/14h, day/night). After harvesting, the leaves were cut and mashed in Tris-HCl buffer, and the proteins were extracted by vacuum infiltrating (pH 7.4). The ISP extracts obtained were reported as non acclimated (NA) and cold acclimated (CA), respecting the conditions they grew, and analyzed according to its chemical composition. The presence of ISP in the extracts was detected by SDS-PAGE and the study of the morphology of ice crystals. The CA extracts were used in frozen dough to verify the cryoprotectant effect of the ISP. Fresh and frozen bread dough without adding the CA extracts were used to compare the dough behavior subjected to the following analysis: freeze-thaw tolerance (syneresis), identification and quantification of the dough polymeric proteins by SE-HPLC, and dough microstructure by scanning electron microscopy. Total solids content varied between 0.74 and 0.86 % and 0.92 and 1.70 % for the CA and NA extracts, respectively. Crude protein content varied between 51.69 and 60.69 % and 43.78 and 52.18 % for the CA and NA extracts, respectively. Interaction between cold acclimation and variety did not affected ash content of the samples, but it was observed a decrease in the ash content in the CA samples, which was related to a decrease in the mineral synthesis under cold acclimation. Results from SDS-PAGE showed very little or no protein bands in the NA extracts, while several bands, with molecular mass ranging from 14.4 to 97.0 kDa, were observed in all the CA extracts. Spring wheat varieties seemed less responsive to the cold acclimation than the

winter ones, considering that fewer protein bands were observed in the gels. The winter wheat and rye varieties showed protein bands ranging from 14.4 to 66.0 kDa, while the bands on the spring varieties exhibited molecular mass ranging from 20.1 to 66.0 kDa. After characterizing the ISPs extract, research proceeded with three varieties BRS Guabiju, CD 104 and IPR 89, spring and winter wheats, and rye variety, respectively. The CA extracts of all three samples were effective in changing the morphology of ice crystals, originating preferably tetrahedral and hexagonal crystals, which were different from the round and plane shaped crystals developed in distilled water, Tris-HCl buffer, and NA extracts. Although not statistically different, there was a consistent trend in reducing the syneresis when ISPs extracts were added in the bread dough, especially after the third freeze-thaw cycle. The ISPs extracts from the wheat varieties BRS Guabiju and CD 104 did not affect the total polymeric protein (PPP) and unextractable polymeric protein (UPP) content of bread dough, but the rye variety (IRP 89) decrease the PPP and UPP content on frozen dough, in such way that these values were similar to those observed in fresh dough. The SEM images of frozen bread dough with and without the ISPs extracts showed the damages caused on the gluten matrix due to the freezing, when compared to the fresh dough. The dough microstructure study led to the conclusion that the ISPs extracts added to bread dough imparted higher preservation to the gluten matrix during freezing, thus posing a great potential to produce frozen dough that makes breads very similar to the fresh ones. These results could contribute to divulge the presence of these proteins in cereals cropped in Brazil, and to increase the interest for ISP extraction from these cereals, and their usage in frozen foods.

INTRODUÇÃO

Anticongelantes biológicos são compostos encontrados naturalmente em alguns insetos, plantas e peixes de regiões muito frias; e são denominados “proteínas estruturadoras de gelo” (Ice Structuring Proteins – ISPs) (JACKMAN *et al.*, 2007). Embora a maior fonte de ISPs sejam peixes de regiões frias (MISHRA e PATTNAIK, 1999), tem sido relatado que plantas podem ser importantes fontes, particularmente, aquelas altamente tolerantes ao frio (CHENG, 1998).

Mishra e Pattnaik (1999) resumiram as principais características das ISPs: interagir com as nucleações do gelo, inibir a recristalização e modificar a forma dos cristais. Estas características sugerem potencial aplicação na agricultura e na indústria de alimentos. A prevenção de danos nas culturas agrícolas pela temperatura de congelamento tem relevância econômica, uma vez que envolve fatores tais como a produção e o preço de alimentos. Já a aplicação na indústria de alimentos, está diretamente ligada a oferecer qualidade e maior vida de prateleira de produtos congelados.

Aplicações de ISPs em alimentos poderiam ser úteis no controle de cristalização porque a quantidade necessária para evitá-la, é relativamente pequena (FEENEY e YEH, 1998). A cristalização do gelo pode ter um impacto prejudicial na textura de alimentos congelados como sorvetes (MISHRA e PATTNAIK, 1999) e carnes (PAYNE e YOUNG, 1995). Em estudo recente realizado por Regand e Goff (2006), concluiu-se que ISPs de trigo de inverno foram efetivas na redução do crescimento de cristais de gelo em sorvete, durante uma etapa de choque térmico, quando comparado com um controle sem adição de ISPs, sendo capazes de melhorar a textura do produto final.

Com o avanço tecnológico e as necessidades e exigências do consumidor moderno pela praticidade e qualidade de alimentos industrializados, as indústrias desse setor tem investido nas linhas de produtos pré-prontos ou prontos para o consumo refrigerados e/ou congelados. Hoje, entretanto, a maioria dos alimentos refrigerados e/ou congelados perde alguns atributos sensoriais no momento do descongelamento para serem consumidos, representando grande desafio para as indústrias alimentícias nessa linha de mercado.

No que diz respeito à produção de pão congelado, embora a melhoria na qualidade de produtos panificados congelados trazidas pelo aprimoramento das formulações, da tecnologia de processamento e da metodologia de congelamento, tenha minimizado as desvantagens desse processo, ainda há a possibilidade de melhoras.

A utilização de ISPs se apresenta como uma alternativa para produtos congelados, visando minimizar ou eliminar danos causados pelo processo de congelamento – descongelamento. Um estudo sobre a utilização do trigo e centeio como fonte de ISPs seria interessante, uma vez que no Brasil nenhum estudo nesse sentido foi realizado até o momento.

OBJETIVOS

Objetivo geral

A proposta deste estudo foi investigar a presença de proteínas estruturadoras de gelo (ISPs) em cultivares de trigo e centeio desenvolvidas no Brasil, caracterizá-las e verificar seu uso potencial como aditivo em massas congeladas.

Objetivos específicos

- ✓ Obter o extrato protéico das folhas de diferentes cultivares de trigo de primavera e de inverno e de centeio desenvolvidas no Brasil;
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente os extratos quanto ao conteúdo de sólidos totais, proteínas e cinzas e à presença de ISPs por eletroforese em SDS-PAGE, e pela morfologia dos cristais de gelo;
- ✓ Produzir massas de pão com três níveis de adição de ISPs e investigar o efeito crioprotetor sobre o glúten pelo método de cromatografia líquida por exclusão molecular (SE-HPLC);
- ✓ Investigar o efeito das ISPs na estabilidade da massa frente ao estresse de congelamento/descongelamento.
- ✓ Examinar o efeito crioprotetor das ISPs nas massas congeladas por meio de análise microscópica da massa (microscopia eletrônica de varredura).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 TRIGO E CENTEIO: ASPECTOS GERAIS

Os cereais são frutos de algumas plantas, pertencentes à família Poaceae, e os mais importantes, do ponto de vista da sua produção mundial, são o trigo, arroz, milho, painço, sorgo, centeio, triticale, aveia e cevada (KENT, 1975). Este tipo de fruto é uma cariopse, que vulgarmente se denomina grão. A cariopse é formada por uma semente aderida fortemente ao pericarpo em toda a sua extensão; e a semente é constituída basicamente por duas partes: o endosperma e o gérmen ou embrião. Em geral, o grão de qualquer cereal está constituído pelas mesmas partes e em proporções aproximadamente iguais (HOSENEY, 1991).

O trigo é uma gramínea do gênero *Triticum*, com várias espécies cujas diferenças genéticas são suficientes para serem consideradas espécies distintas ou sub-espécies. Aproximadamente metade é cultivada e as restantes crescem de forma silvestre. Mais de 90 % do trigo cultivado no mundo, entretanto, corresponde a três espécies, o *Triticum aestivum*, sub-espécie *vulgaris*, o *Triticum turgidum*, sub-espécie *durum* e o *Triticum compactum*, com predominância dos dois primeiros, o *vulgaris* e o *durum* (QUAGLIA, 1991).

O trigo cultivado no Brasil pertence à espécie *Triticum aestivum* L., com características adequadas para sua utilização em panificação. O trigo duro ou trigo para macarrão (*Triticum durum* L.) apresenta características adequadas à indústria de pastas alimentares, mas praticamente não é cultivado no Brasil (SASSAKI e MACHADO, 1999). Esse cereal constitui um elemento de grande relevância na economia do Brasil, devido principalmente a importância deste produto na cesta básica da população. O consumo anual no país tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2011), sob a forma de derivados, principalmente pão, macarrão e farinha.

O centeio pertence a subfamília *Pooideae*, gênero *Secale*, e espécie *cereale*. A forma cultivada caracteriza-se por possuir grãos grandes e ciclo

anual, e em comparação com outras espécies de cereais de inverno, apresenta maior desuniformidade quanto à espigamento, maturação e tipo de planta (JUNIOR e BAIER, 2006).

A cultura do centeio (*Secale cereale* L.) foi introduzida no Brasil, ainda no século XIX, por imigrantes alemães e poloneses, sendo até hoje realizada em grande parte por descendentes de europeus (JUNIOR e BAIER, 2006). É menos produtivo que o trigo em terra comum, mas apresenta rendimentos satisfatórios em climas frios ou secos, em solos arenosos e poucos férteis (KENT, 1975).

O centeio é utilizado tanto na alimentação humana quanto animal, além de apresentar potencial como planta forrageira (integração lavoura e pecuária) e para cobertura de solo. Sua comercialização é voltada principalmente para os moinhos que fornecem a farinha para as indústrias de panificação de pães mistos de trigo com centeio (JUNIOR e BAIER, 2006).

1.2 PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO

1.2.1 Histórico e fontes

Lillford e Holt (1994) relataram que, em 1957, Scholander e colaboradores identificaram que a capacidade dos peixes sobreviverem a $-1,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ tinha relação com macrossolutos presentes em seu sangue. Esses solutos foram chamados de “anticongelantes”. Cerca de 20 anos depois, De Vries e colaboradores notaram que 90 % dos peixes na Antártica, da subordem Perca, também desenvolviam mecanismos similares para sobreviver. Esses trabalhos pioneiros conduziram à identificação e caracterização do grupo de substâncias responsáveis por esse fenômeno e foi descoberto, *in vitro*, que glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) poderiam alterar o comportamento de congelamento, tamanho e formação dos cristais de gelo.

De acordo com Lillford e Holt (1994), anos mais tarde, Duman e De Vries confirmaram que um tipo de peixe de águas frias (linguado) no hemisfério norte também produzia substâncias anticongelantes. Entretanto,

esses eram peptídeos anticongelantes não glicosilados de estruturas completamente diferentes e foram denominados de proteínas anticongelantes (AFPs). Recentemente, esse grupo de proteínas foi denominado de proteínas estruturadoras de gelo (ISPs – Ice Structuring Proteins).

Desde então, as ISPs têm sido descobertas em diversas classes de organismos que habitam regiões frias. Os peixes são os organismos mais estudados para obtenção de ISP e são reconhecidos como a maior fonte dessas proteínas. Vários insetos como os artrópodes terrestres, ácaro e aranha, também produzem ISP, mas não produzem as glicosiladas (MISHRA e PATTNAIK, 1999). Tem sido relatado que plantas podem ser importantes fontes de ISPs, particularmente, plantas altamente tolerantes ao frio, mas também algumas samambaias e musgos. Estas substâncias ocorrem em baixas concentrações, mas são efetivas na inibição da recristalização de pequenos cristais de gelo (CHENG, 1998).

As partes das plantas que mostram atividade anticongelante incluem caule, folha, gomo e flor, raiz, rizoma e tubérculo. As ISPs são secretadas dentro do xilema, parede celular e espaços intracelulares dos tecidos (MISHRA e PATTNAIK, 1999). De acordo com Antikainen e Griffith (1997) e Smallwood (1998), como exemplos de plantas que contêm ISP têm-se: alho-mostarda, aveia primavera, agrião de inverno, canola de inverno, couve-de-bruxelas, cenoura, cevada de inverno, carvalho branco, centeio de inverno, triticale e trigo. Dentre essas, a mais estudada é o centeio de inverno.

Tem sido mostrado que o centeio de inverno tem resistido a temperaturas abaixo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As ISPs acumulam nas folhas de cereais de inverno durante a aclimação ao frio, onde são usadas para inibir a recristalização do gelo durante os ciclos de congelamento e descongelamento (GRIFFITH *et al.*, 1992; CHUN, YU e GRIFFITH, 1998).

De acordo com Atici e Nalbantoglu (2003), cultivares de trigo de inverno têm sobrevivido em temperaturas abaixo de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e algumas gramíneas têm resistido a temperaturas abaixo de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, confirmando que certas plantas têm seus mecanismos especiais de proteção contra o estresse ao frio.

Embora alguns estudos tenham sido realizados quanto a ocorrência de ISPs em diversos organismos, ainda são escassos os dados em relação

ao seu conteúdo. Griffith (1999) encontrou até 0,307 mg/g de ISP nas folhas de centeio de inverno.

1.2.2 Tipos e estruturas das ISPs

As ISPs englobam duas famílias de proteínas, as glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) e proteínas anticongelantes (AFPs), que tem a capacidade de diminuir a temperatura de congelamento inibindo o crescimento dos cristais de gelo. A estrutura de ambas tem sido extensamente estudada por décadas e tem-se observado serem muito diferentes uma da outra (YEH e FEENEY, 1996; FEENEY e YEH, 1998; CHENG, 1998).

As AFGPs têm sido enumeradas de 1 a 8, de acordo com sua mobilidade em eletroforese em gel. As AFGPs de 1 a 5 têm massa molecular na faixa de 10 a 30 kDa e atividades anticongelantes similares (FEENEY e YEH, 1993). Na sua estrutura, há repetição de unidades de alanina (Ala), seguida pela treonina (Thr), com um arranjo de Ala-Ala-Thr em repetição em unidades de tripeptídeos, com um grupo dissacarídeo ligado aos resíduos de Thr. Duas Ala adicionais estão no C-terminal (BARRET, 2001).

As menores AFGPs de 6 a 8 têm massa molecular variando de 2,6 a 5 kDa (FEENEY e YEH, 1993) e têm prolina (Pro) em algumas posições, ao invés de alanina, seguida de Thr. Apesar desta aparente simplicidade na estrutura das AFGPs, a sua conformação não é ainda claramente entendida. O consenso das teorias parece ser que a cadeia adota três dobras para o lado esquerdo da hélice semelhante a poli-L-prolina (LILLFORD e HOLT, 1994).

De acordo com Feeney e Yeh (1998), a mais estudada das AFGPs é a encontrada em linguado (*Pseudopleuronectes americanus*), mas diferentes espécies de peixes e alguns outros organismos têm sido usados para isolar os diferentes tipos de AFP. Quatro tipos de estruturas têm sido descritas devido a considerável diferença no comportamento estrutural em virtude de seus maiores conteúdos de aminoácidos (MISHRA e PATTNAIK, 1999).

A AFP Tipo I tem estrutura alfa-hélice, enquanto que as Tipo II e III têm estruturas secundárias incomuns (LILLFORD e HOLT, 1994). A AFP Tipo I é abundantemente encontrada em linguado (DAVIES e SYKEST,

1997). Essas AFPs são mais ricas em Ala, assim como as AFGPs (FEENEY e YEH, 1993), sendo que a repetição de unidades parece ser de 11 aminoácidos de seqüência geral: $-[\text{Thr}(\text{X})_2\text{-aminoácido polar}(\text{X})_7]-$, onde X é usualmente uma Ala. Essa estrutura helicoidal resulta numa molécula anfifílica com maior parte da cadeia apolar em um lado da hélice (LILLFORD e HOLT, 1994).

As AFPs Tipo II também contêm predominantemente resíduos de Ala (~14,4 %), mas também contêm cisteína (Cys) (LILLFORD e HOLT, 1994) e alguns resíduos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina – Phe, triptofano – Trp e tirosina – Tyr) em ambiente assimétrico (MISHRA e PATTNAIK, 1999). Foi primeiramente isolada a partir do teleósteo marinho *Hemitripterus americanus*, mas também foi encontrada em outras espécies de peixes e insetos. A sua conformação é bem diferente, havendo uma falta significativa de conformação alfa-hélice e folha-beta. Possivelmente, essas moléculas também são anfifílicas, mas com resíduos polares.

As AFPs Tipo III, encontradas no peixe-carneiro (*Macrozoarces americanus*), apresentam composição e seqüência de aminoácidos totalmente diferentes das outras AFPs, elas não são ricas em Ala e não contêm resíduos de Cys. Além disso, não têm predominância de um aminoácido específico entre seus 62 – 66 resíduos (YEH e FEENEY, 1996), entretanto são as que têm estrutura mais bem balanceada entre todos os tipos de AFP. De acordo com Mishra e Pattnaik (1999), elas possuem resíduos hidrofóbicos assimetricamente posicionados e têm estruturas secundárias e terciárias definidas.

A última AFP descoberta, AFP Tipo IV, foi isolada a partir do peixe-escorpião (*Myoxocephalus octodecimspinosus*). Análises da seqüência dos 108 resíduos protéicos sugerem que apresentam estrutura altamente helicoidal e completamente alheia a outras AFPs. AFP Tipo IV são ricas em glutamina (Gln) e ácido glutâmico (Glu), cerca de 26 %, e tem teor médio de Ala de 10 %, em contraste com os 60 % encontrados na APF Tipo I (DAVIES e SYKEST, 1997; BARRET, 2001).

De acordo com relatos encontrados na literatura, ISPs têm sido reportadas em mais de 27 espécies de plantas superiores. Seis ISPs, com massas moleculares variando entre 16 a 35 kDa, têm sido identificadas em extratos de folhas de centeio aclimatadas ao frio. Estudos revelaram que

essas proteínas são isoformas de três membros de classes de proteínas relacionadas a patogenicidade: quitinases, β -1,3-glucanase e taumatina, associadas com aumento da resistência às doenças em plantas. No caso das ISPs, estas também apresentam propriedades para modificar o mecanismo de crescimento de cristais de gelo em resposta ao estresse pelo frio (HON *et al.*, 1994; ANTIKAINEN e GRIFFITH, 1997; CHENG, 1998).

1.2.3 Mecanismo de ação das ISPs

Desde o descobrimento de Scholander e cols., diversas investigações têm mostrado que as ISPs diminuem a temperatura de expansão macroscópica do gelo abaixo da temperatura de congelamento, sem afetar o ponto de fusão e a pressão osmótica, o que poderia ter efeitos letais em organismos vivos (FEENEY e YEH, 1993). A elucidação do mecanismo de inibição tem envolvido estudos sobre a massa molecular, a seqüência de aminoácidos e as estruturas secundárias e terciárias. Devido à complexidade dos diferentes tipos de ISPs, maior atenção tem sido dada a mais simples das estruturas, a AFP Tipo I (LILLFORD e HOLT, 1994).

Segundo Feeney e Yeh (1998), as ISPs são principalmente reconhecidas pela habilidade em abaixar o ponto de congelamento e retardar a recristalização no armazenamento em temperaturas de congelamento. Observações a partir de diversos estudos sobre a atividade das ISPs incluem:

- Apesar dessas proteínas serem capazes de abaixar o ponto de congelamento, a temperatura de fusão não é alterada, demonstrando que o mecanismo não é coligativo.
- A atividade não coligativa pode ser 500 vezes maior que a de compostos como o açúcar e o sal, no entanto, há uma concentração assintótica em que a atividade satura.
- A recristalização de soluções congeladas é inibida a baixas concentrações dessas proteínas.
- Ocorre crescimento de gelo com formato tipo agulha na presença de AFGP, ao invés da usual predominância de crescimento de formas dendríticas.

De acordo com Hon *et al.* (1994) e Griffith e Ewart (1995), geralmente, cristais de gelo formados em água são redondos, pois crescem ao longo do eixo *a* (Fig 1.1a). Por outro lado, os cristais de gelo formados em soluções contendo ISPs tendem a se expandir ao longo do eixo *c*. Em soluções diluídas de ISPs, os cristais são hexagonais e planos (Fig 1.1b); em concentrações moderadas, formam-se em colunas hexagonais (Fig 1.1c); e em altas concentrações de ISPs são uma complexa bipirâmide hexagonal (Fig. 1.1d).

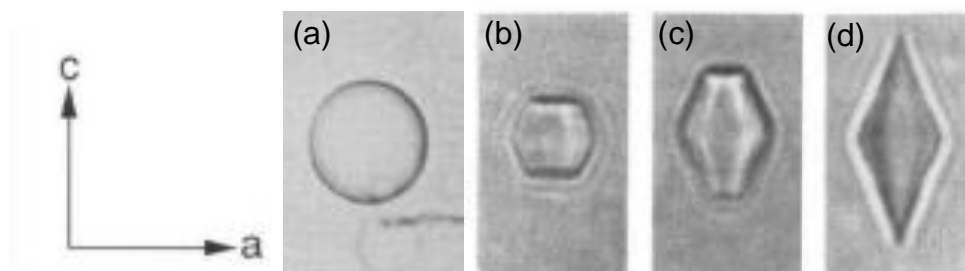


Figura 1.1 – Morfologia do crescimento de cristal de gelo: (a) em água pura os cristais são planos e redondos; (b – d) no extrato de ISP obtido a partir de plantas de centeio aclimatadas ao frio, o crescimento dos cristais de gelo começa a se expandir ao longo do eixo *c*. (Fonte: Hon *et al.*, 1994).

1.3 APLICAÇÕES DAS ISPS

A aplicação prática de ISPs tem sido investigada, com um significativo número de patentes. As características das ISPs sugerem sua potencial aplicação na agricultura e indústria de alimentos com grande relevância sócio-econômica. A prevenção de danos nas culturas agrícolas pela temperatura de congelamento diminui as perdas em épocas de geadas. Enquanto que a aplicação na indústria de alimentos pode oferecer qualidade e aumento da vida de prateleira de produtos congelados. Aplicações em alimentos poderiam ser úteis no controle de recristalização porque a quantidade necessária é relativamente pequena (FEENEY e YEH, 1998).

Payne e Young (1995) isolaram uma AFGP de um peixe da Antártica (*Dissostichus mawsoni*) e testaram sua ação em carne de cordeiro congelada, administrando injeções de extrato contendo essas proteínas no animal antes do abate. Os autores observaram uma diminuição significativa no tamanho dos cristais de gelo durante o congelamento dos extratos e na perda de água na carne durante o descongelamento, quando comparados a

um controle sem AFGP. Esses resultados sugerem que essas proteínas podem ser úteis na redução dos danos associados com a estocagem de carnes congeladas.

Clemmings *et al.* (1997) desenvolveram uma patente em que a ação de AFPs foi testada em sorvetes, iogurtes, milk shakes dentre outras sobremesas congeladas/refrigeradas. O estudo demonstrou que a utilização dessas proteínas exclui a necessidade de uma etapa de congelamento com condições extremas de temperatura e que a formação de cristais de gelo foi menor proporcionando produtos de textura mais macia e volumosa.

Feeney e Yeh (1998), realizando testes em sorvete e em um produto composto de cerveja e sorvete, notaram que após 1 h em -6 a -8 ° C, a amostra controle tinha visivelmente cristais maiores, enquanto que a amostra com ISP não mostrou qualquer variação no crescimento do cristal.

Moskin (2006) relatou que o conglomerado anglo-holandês Unilever pediu permissão à Agência de Padrões de Alimentos do Reino Unido para usar um novo ingrediente em sobremesas congeladas- uma proteína clonada do sangue de um peixe do Oceano Ártico parecido com a enguia, o peixe-carneiro americano (*Macrozoarces americanus*). No entanto, ao invés de extrair a proteína do peixe, o que a Unilever afirmou não ser sustentável ou economicamente factível, a empresa desenvolveu um processo para fabricá-la, alterando a estrutura genética de uma linhagem de levedura para que produzisse a proteína durante a fermentação. Este ingrediente, chamado de proteína de estruturação do sorvete, foi aprovado pelo Departamento de Drogas e Alimentos (FDA) dos EUA e foi usado pela Unilever para fazer alguns produtos gelados nos EUA, como alguns picolés e uma nova linha da Breyers, Light Doublé Churned, de barras de sorvete. No entanto, esse produto encontrou uma resistência por parte do consumidor europeu, principalmente, por se tratar de um material geneticamente modificado.

1.4 MASSAS CONGELADAS

1.4.1 Importância econômica

Devido a praticidade, conveniência e redução de custos, estabelecimentos como lojas de conveniência e supermercados têm optado pela comercialização de massas congeladas, pães pré-assados congelados ou pães assados congelados. As vantagens do pão de massa congelada em relação aos processos tradicionais podem ser assim resumidas: padronização do produto, redução de espaço físico, uso de mão-de-obra não especializada, e agilidade e flexibilidade para a produção. A diferença encontrada entre o pão de massa congelada e o pão pré-assado congelado está no tempo de preparo no ponto de venda (ROMEU, TADINI e MATUDA, 2006).

O congelamento de massas tem sido de grande interesse desde a década de 50 para lidar com os problemas do curto período de vida de prateleira de massas convencionais (ZHANG, ZHANG e WANG, 2007). Muito antes (1926), na Áustria, já haviam sido realizados experimentos utilizando baixas temperaturas para o retardamento da etapa de fermentação da massa, numa tentativa de reduzir o trabalho noturno nas padarias (WATANABE e BENASSI, 2000).

Entre as décadas de 50 e 60, a produção de pão a partir de massa congelada não obteve êxito, principalmente devido a curta vida de prateleira e o procedimento inadequado no preparo do produto pelo consumidor. A partir da década de 70, o uso de massa congelada nos Estados Unidos se popularizou devido ao surgimento de padarias nas grandes redes de supermercados. Concomitantemente, as padarias de pequeno porte começaram a congelar porções reserva de massa para serem posteriormente descongeladas, fermentadas e assadas em horários de maiores demandas, por acharem esse processo mais conveniente e econômico (WATANABE e BENASSI, 2000).

Com uma maior exigência dos consumidores e procura por pães sempre frescos, ou seja, recém assados em qualquer horário do dia, o uso de massa congelada permitiu maior flexibilidade na produção, diminuindo consideravelmente o trabalho noturno das padarias. Com essas vantagens,

a indústria de panificação começou a adotar o uso de massa congelada na produção de pães (RÄSÄNEN, HÄRKÖNEN e AUTIO, 1995).

O mercado de massas de pão congeladas tem crescido constantemente, dado a demanda por produtos assados de conveniência e de alta qualidade. O processo de congelamento é amplamente usado nas padarias industriais para facilitar a produção de pão e a panificação de varejo, permitindo a compra de pães frescos a qualquer hora. Além disso, facilita o transporte, reduz os custos de produção e as habilidades dos padeiros passam a ser menos essenciais (FUNCK e FRANCISCO, 2006). Por outro lado, o volume e a qualidade dos pães são menores em relação às massas frescas, principalmente com longos tempos de estocagem (RÄSÄNEN, HÄRKÖNEN e AUTIO, 1995).

1.4.2 Importância do glúten na panificação

Segundo Tedrus *et al.* (2001) dentre as farinhas de cereais, apenas a de trigo forma uma massa viscoelástica capaz de reter o gás produzido durante a fermentação pelas leveduras, permitindo sua expansão. As proteínas, mais especificamente as formadoras do glúten, são as responsáveis por esta característica própria do trigo.

As propriedades viscoelásticas da massa de trigo são o fator principal na determinação da qualidade de panificação, sendo essas propriedades resultantes da estrutura e interações das proteínas do glúten (SANTOS, 2008).

O glúten é formado quando a farinha de trigo misturada a água sofre a ação de um trabalho mecânico. À medida que a água começa a interagir com as proteínas insolúveis da farinha de trigo (glutenina e gliadina) a rede de glúten começa a ser formada. As quantidades destas duas proteínas no trigo são fatores determinantes para a qualidade da rede formada no processo de panificação. Quanto à formação da rede do glúten, normalmente é atribuída às gluteninas a formação das malhas, cujas fibras retêm as gliadinas (SILVA *et al.*, 2004).

As gliadinas são geralmente correlacionadas às características de viscosidade e extensibilidade do glúten. Embora alguns autores associem gliadinas específicas com qualidade de panificação, e isto tem sido aceito,

estas proteínas não devem ter um efeito direto na qualidade do trigo em termos de força da massa (GIANIBELLI *et al.*, 2001). No entanto, segundo Pylar (1988), frações de gliadina com massa molecular mais elevada afetam significativamente as propriedades de mistura e reológicas da massa de trigo.

As gliadinas são prolaminas monoméricas, as quais apresentam cadeias com ligações simples ou as que apresentam em sua estrutura apenas ligações dissulfídicas intramoleculares. Além das gliadinas, as albuminas/globulinas representam outra classe neste grupo de proteínas no trigo (SANTOS, 2008).

As gliadinas são divididas em quatro grupos com base na mobilidade em Acid-PAGE, α - (mobilidade mais alta), β -, γ -, e ω -gliadinas (mobilidade mais baixa). A massa molecular varia de 30 a 40 kDa para os tipos α -, β - e γ -gliadinas, e 60 a 80 kDa para o tipo ω -gliadinas (GIANIBELLI *et al.*, 2001).

As gluteninas são proteínas poliméricas de elevada massa molecular, variando de ≈ 100 kDa a milhões de Da. Proteínas poliméricas são aquelas que apresentam ligações dissulfídicas intramoleculares e intermoleculares formando assim cadeias compostas por subunidades. São considerados três grupos principais, albuminas de alta massa molecular, tritricinas e glutenina (SANTOS, 2008).

Dois grupos de subunidades formam as gluteninas, os de baixa massa molecular (LMW-GS) e de alta massa molecular (HMW-GS). As subunidades de gluteninas LMW-GS subdividem-se de acordo com a mobilidade em SDS-PAGE em dois grupos, subunidade B e C, com massa molecular igual a 40 e 50 kDa, respectivamente. As subunidades de gluteninas HMW-GS ou tipo A têm massas moleculares de 95 a 136 kDa (SANTOS, 2008).

As LMW-GS representam 60 % do total de gluteninas presente no endosperma do trigo, entretanto recebem menos atenção por parte dos pesquisadores que as HMW-GS. Isto ocorre em parte pela similaridade de massas moleculares com as gliadinas o que dificulta a identificação em SDS-PAGE unidimensional. A composição de aminoácidos e a estrutura das LMW-GS são consideradas similares as γ -gliadinas (GIANIBELLI *et al.*, 2001).

As HMW-GS, embora sejam um dos componentes minoritários das proteínas do endosperma de trigo, são primordiais no processo de panificação, por ser o principal determinante da elasticidade do glúten. Muitas cultivares de trigo apresentam quatro ou cinco subunidades HMW, frequentemente elas diferem em mobilidade em SDS-PAGE podendo ser divididas em tipo x (alta) e y (baixa). Ambos os tipos de HMW-GS apresentam um domínio repetitivo central e dois domínios não repetitivos terminais (N-terminal e C terminal) com conteúdo elevado de resíduos de cisteína (GIANIBELLI *et al.*, 2001). Esses domínios, presumivelmente, são as bases moleculares utilizadas para explicar o papel das HMW-GS com a funcionalidade do glúten, uma vez que, os resíduos de cisteína estão relacionados à promoção das ligações dissulfídicas entre as subunidades HMW-GS e LMW-GS, responsáveis pela formação das proteínas poliméricas (WRIGLEY, 1996).

Subunidades de HMW-GS apresentam conteúdo elevado de prolina e glicina e baixo conteúdo de lisina. Por causa da diferença na distribuição de aminoácidos dentro da cadeia, a região central é hidrofílica e os domínios não repetitivos, C e N-terminal, são hidrofóbicos (GIANIBELLI *et al.*, 2001).

1.4.3 Efeitos do congelamento na qualidade da massa

Na produção de massa congelada, tanto o congelamento quanto de descongelamento tem afetado a qualidade do produto após o assamento (ZHANG, ZHANG e WANG, 2007).

De acordo com Watanabe e Benassi (2000), as maiores deficiências apontadas em pães de massa congelada são: baixo volume, estrutura de miolo aberta e mais firme, tempo de fermentação excessivamente longo, qualidade do produto razoável por apenas algumas semanas, ou seja, o potencial de panificação da massa decresce substancialmente com o tempo de armazenamento e com os ciclos de congelamento e descongelamento parciais, que podem ocorrer durante a distribuição, transporte e armazenamento do produto.

Para Berglund, Shelton e Freeman (1991) os danos na rede de glúten são devidos, principalmente, à ação mecânica dos cristais de gelo durante o congelamento. O congelamento provoca o enfraquecimento da estrutura da

massa pelos danos causados na rede de glúten, reduzindo a sua capacidade de retenção de gás. Autio e Sinda (1992) verificaram que a presença de células de leveduras mortas na massa não afeta as propriedades reológicas, indicando que mudanças estruturais na massa congelada e descongelada não estão associadas com a liberação de substâncias redutoras de células de leveduras. Entretanto, segundo Ribotta *et al.* (2004), o enfraquecimento é causado por compostos redutores, provenientes das células de levedura que rompem ligações dissulfídicas e pela recristalização do gelo.

LeBail *et al.* (2000) *apud* Romeo, Tadini e Matuda (2006) estudaram a influência do congelamento sobre a massa de pão francês em relação à qualidade do pão produzido destas massas. No primeiro estudo, as massas foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em congelador com ar forçado em três velocidades, 1, 2 e 3 m/s, até atingir $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ no centro. Foram verificados um declínio na qualidade do pão e a perda da elasticidade da massa com o decorrer do tempo de congelamento. Os autores atribuíram o enfraquecimento da massa à formação de cristais de gelo.

1.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Proteínas estruturadoras de gelo (ISPs) são substâncias encontradas em diversos organismos vivos que sobrevivem em regiões muito frias (abaixo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) e são capazes de diminuir a temperatura de congelamento dos fluídos biológicos sem afetar a pressão osmótica. Essa propriedade está relacionada a sua capacidade em modificar a morfologia do crescimento dos cristais de gelo, dependendo da concentração e tipo das ISPs presentes. O mecanismo de ação das ISPs em organismos vivos pode se apresentar como uma alternativa para o mercado de preservação de alimentos congelados, como massas de pão.

Estudos envolvendo o mecanismo de ação das ISPs, assim como suas fontes de obtenção e disponibilidade foram amplamente discutidos na literatura internacional na década de 90. Diversos pesquisadores conseguiram elucidar que tipos de ISPs, a composição aminoacídica, em alguns casos, e quais estruturas secundárias e terciárias dessas proteínas

estão presentes nas diferentes espécies de organismos vivos, sendo o maior enfoque àquelas extraídas dos peixes naturais de regiões com temperaturas abaixo de 0 °C.

No final da década de 90 e início dos anos 2000, começam a surgir pesquisas envolvendo plantas, sendo o centeio a cultura de inverno mais estudada. Nessa mesma época, começam a aparecer, mais frequentemente, trabalhos que visam à aplicação dessas proteínas em alimentos com o objetivo de preservar os danos causados durante o congelamento devido ao crescimento dos cristais de gelo. Alguns estudos relatam o potencial de aplicação de ISPs em sorvetes, tendo sido até mesmo comercializado um produto contendo esse tipo de proteína clonada do sangue de um peixe encontrado no Oceano Ártico.

Embora o estudo das ISPs tenha sido amplamente discutido na literatura internacional, no Brasil nenhum trabalho foi realizado até o momento. Estudos, que caracterizem extratos brutos de folhas de cultivares de cereais, como trigo e centeio, plantados no Brasil, trarão informações inéditas nesse campo de pesquisa em Ciência e Tecnologia de alimentos no âmbito nacional.

A aplicação prática de ISPs em alimentos congelados permitirá um conhecimento prévio sobre essas proteínas e demandará novas pesquisas com o objetivo de investigar suas propriedades crioprotetoras.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO EM CULTIVLEIRAS DE TRIGO E CENTEIO

2.1 INTRODUÇÃO

Baixa temperatura é a maior limitação ambiental para produção agrícola. Geadas tardias atrasam a germinação das sementes, geadas precoces diminuem a qualidade e rendimento da colheita e baixas temperaturas diminuem a sobrevivência de algumas culturas de inverno, como os cereais, por exemplo. Algumas plantas, entretanto, têm a habilidade de resistir às temperaturas abaixo do congelamento, por prolongados períodos de tempo. Estudos têm demonstrado que isso é possível devido à síntese de proteínas específicas que estão envolvidas no desenvolvimento de tolerância ao congelamento nessas plantas (HEW *et al.*, 1999).

No inverno, a temperatura de algumas áreas frias pode chegar abaixo de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Plantas de inverno encontradas no Ártico, Antártica e Alpes têm desenvolvido um alto nível de tolerância ao frio. Acredita-se que as proteínas associadas com a tolerância ao congelamento são produzidas endogenamente pelas células das plantas e são secretadas através da membrana plasmática dentro dos espaços intercelulares, para efeito e modificação da formação de cristais de gelo durante a exposição a temperaturas de congelamento (ATICI e NALBANTOĞLU, 2003).

O centeio é uma planta capaz de resistir a temperaturas abaixo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CHUN, YU e GRIFFITH, 1998). Cultivares de trigo de inverno têm sobrevivido em temperaturas abaixo de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e algumas gramíneas tem resistido a temperaturas abaixo de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, confirmando que certas plantas têm seus mecanismos especiais de proteção contra o estresse ao frio (ATICI e NALBANTOĞLU, 2003).

De acordo com Silva *et al.* (2008), o trigo é capaz de resistir ao congelamento das células por um processo chamado de aclimatação ao frio. O fenômeno ocasiona mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares que tornam as plantas resistentes não somente a temperaturas congelantes, mas

também à desidratação induzidas pelo congelamento. Segundo os mesmos autores, a aclimação ocorre de acordo com a ação seqüencial de temperaturas de resfriamento (maiores do que 0 °C) e de congelamento (-3 a -5 °C). Entre os cereais, ocorre grande diferença na exigência da temperatura acima de 0 °C, necessária para a iniciação da aclimação. O trigo, por exemplo, aclimata em temperatura abaixo de 2 °C.

A diminuição do potencial hídrico nos tecidos, em razão da diminuição do potencial osmótico pelo acúmulo de açúcares nos vacúolos é um aspecto importante. Esse processo está correlacionado ao aumento significativo de ácido abscísico e resulta na modificação da síntese de proteínas (SILVA *et al.*, 2008).

Denominadas proteínas anticongelantes (AFPs) em vários estudos, estas também são conhecidas como proteínas estruturadoras de gelo (ISPs), por se ligarem e influenciarem no crescimento dos cristais de gelo. Proteínas com essas características têm sido identificadas em peixes que vivem em áreas suscetíveis à formação de gelo e em plantas e insetos sujeitos a esses ambientes (ANTIKAINEN e GRIFFITH, 1997; CHENG, 1998; FEENEY e YEH, 1998; GRIFFITH, 1999; ZHANG, ZHANG e WANG, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

De acordo com Hew *et al.* (1999), a secreção de polipeptídios dentro do apoplasto acompanhada por um aumento na atividade anticongelante é uma resposta comum em todas as plantas da família Poaceae expostas ao frio. Esses autores relatam que os polipeptídios e as proteínas associados com a tolerância ao congelamento são produzidos em menor quantidade em plantas não cultivadas em baixas temperaturas.

Em estudo realizado por Hon *et al.* (1994), os autores conseguiram isolar seis AFPs com massa molecular variando de 16–35 kDa a partir do apoplasto de folhas de centeio de inverno aclimatadas ao frio. Antikainen e Griffith (1997) examinaram o acúmulo de proteínas no apoplasto de plantas durante a aclimação ao frio por sete semanas através de eletroforese (SDS–PAGE). Em cevada e trigo de inverno, trigo e centeio de primavera, as proteínas secretadas no apoplasto das folhas foram semelhantes aos de centeio de inverno.

O presente trabalho tem como objetivo investigar a presença das ISPs em cultivares brasileiras de trigo e centeio aclimatadas ao frio, além de caracterizar físico-quimicamente os extratos obtidos a partir das folhas dessas plantas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material experimental

O experimento de campo foi conduzido seguindo um arranjo fatorial 6x2 em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em que cada tratamento teve três repetições, totalizando 36 unidades experimentais. Para o preparo dos extratos de ISPs foram utilizadas as cultivares de trigo de primavera: BRS Guabiju, Ônix e LD 062212 desenvolvidas pela EMBRAPA, OR Sementes e IAPAR, respectivamente, uma cultivar de centeio: IPR 89 desenvolvida pela IAPAR e duas cultivares de trigo de inverno: IPR 84 e CD 104 desenvolvidas pela IAPAR e COODETEC, respectivamente.

As sementes foram semeadas em vasos plásticos de 4 L de solo contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), superfosfato simples (1 g/L) e calcário dolomítico (15 g/L) crescendo sob condições naturais (casa de vegetação, sem controle de temperatura, umidade e iluminação) por 12 dias, em casa de vegetação do Setor de Agronomia da UFV.

Após esse período, as plantas foram transferidas (três repetições de cada) para aclimação em regime de luz de 10/14 h (dia/noite) por sete semanas em câmara fria com sistema de refrigeração (0–3°C, UR ~ 80 %) e iluminação (1 400LUX) adaptados para a pesquisa, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. Essas amostras foram referidas como plantas aclimatadas ao frio (AF). As que permaneceram sob condições naturais (casa de vegetação, sem controle de temperatura, umidade e iluminação com três repetições de cada), também por sete semanas, foram referidas como não aclimatadas (NA). As plantas foram regadas com água quando necessário.

Ao término de sete semanas de cultivo, foram obtidos os extratos de ISPs a partir das folhas das plantas.

2.2.2 Preparação dos extratos de ISPs

Os extratos brutos de ISPs foram preparados de acordo com método (infiltração à vácuo) descrito por Zhang *et al.* (2008) com algumas modificações. As folhas das plantas, após colhidas, foram cortadas com tesoura em três seções no sentido transversal, lavadas com água deionizada e trituradas em liquidificador (Marca Arno, modelo Faciliq) na velocidade 1 por 5 min, com solução tampão Tris-HCl (pH 7,4) na proporção 1:200 (amostra:tampão g/mL) para as plantas AF e na proporção 1:20 (amostra:tampão g/mL) para as NA. A mistura foi centrifugada a $3500 \times g$ a 4 °C por 30 min e filtrada em papel de filtro Whatman nº 40. Os filtrados contendo as ISPs foram acondicionados em potes plásticos identificados e mantidos sob refrigeração até a realização das análises.

2.2.3 Análises de sólidos totais, proteína e cinzas nos extratos de ISPs

Nesta etapa, todas as análises foram realizadas segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997): sólidos totais (n. 925.10), proteína bruta (n. 960.52) e cinzas (n.923.03).

2.2.4 Identificação das proteínas estruturadoras de gelo (ISPs)

A distribuição da massa molecular de ISPs foi estudada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE). Foi utilizado o método vertical com placas de 10x10 cm, descontínuo de alta resolução em SDS–PAGE, descrito por Laemmli (1970) e modificado por Fullington, Cole e Kasarda (1983) empregando-se gel de empilhamento (“stacking gel”) de poliacrilamida a 4 % (p/v) e gel de fracionamento (“runnig gel”) de poliacrilamida a 15 % (p/v). A eletroforese foi conduzida a voltagem constante de 100 V por 4 horas. 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, inibidor de tripsina 20,1 kDa; lisozima purificada da clara de ovo 14,4 kDa.

A coloração dos géis com prata foi realizada de acordo com procedimento descrito por Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no software SAS System v 9.1, onde as características avaliadas foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e os resultados para os quais foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$), foram analisados pelo teste de t, com nível de significância de 5 %.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Teor de sólidos totais, proteína e cinzas nos extratos de ISPs

Os dados apresentados na Tabela 2.1 referem-se à composição química dos extratos de ISPs obtidos a partir das folhas das diferentes cultivares estudadas. Pode-se observar que maior teor de sólidos totais foi encontrado nas NA as quais permaneceram por sete semanas em temperatura ambiente após a germinação. Independente do tratamento utilizado, a cultivar não influenciou significativamente nos teores de sólidos totais, exceto para IPR 84 que diferiu das demais no extrato NA.

O menor teor de sólidos encontrado para as cultivares AF provavelmente ocorreu devido ao bloqueio do crescimento das plantas provocado pela baixa temperatura. Isso se deve a presença de hormônios vegetais, dentre eles o ácido abscísico, que é um regulador do crescimento e desenvolvimento das plantas que promove respostas fisiológicas a estresses abióticos, como neste caso, o frio (LEUNG e GIRAUDAT, 1998; FINKELSTEIN, GAMPALA e ROCK, 2002), fazendo com que a planta sintetize menor quantidade de nutrientes, como por exemplo, minerais, diminuindo assim a quantidade de sólidos totais nos extratos.

Tabela 2.1 – Teor de sólidos totais e proteína nos extratos de ISPs obtidos a partir das plantas de trigo e centeio.

Cultivar	Sólidos (g/100 g)		Proteína ¹ (g/100 g)	
	AF ²	NA ³	AF ²	NA ³
Trigo de Primavera:				
BRS Guabiju	0,74 ± 0,03 ^{a(A)}	1,70 ± 0,05 ^{a(B)}	60,69 ± 2,61 ^{a(A)}	52,18 ± 3,41 ^{a(B)}
Ônix	0,75 ± 0,01 ^{a(A)}	1,11 ± 0,09 ^{a(B)}	58,23 ± 3,19 ^{ac(A)}	43,78 ± 0,75 ^{b(B)}
LD 062212	0,78 ± 0,09 ^{a(A)}	1,07 ± 0,01 ^{a(B)}	56,75 ± 4,39 ^{acd(A)}	48,13 ± 1,55 ^{ac(B)}
Centeio:				
IPR 89	0,78 ± 0,05 ^{a(A)}	1,10 ± 0,06 ^{a(B)}	51,69 ± 2,74 ^{bcd(A)}	47,06 ± 1,42 ^{bc(B)}
Trigo de Inverno:				
IPR 84	0,86 ± 0,17 ^{a(A)}	0,92 ± 0,15 ^{b(A)}	54,76 ± 2,67 ^{cd(A)}	51,24 ± 2,50 ^{ac(A)}
CD 104	0,74 ± 0,02 ^{a(A)}	1,06 ± 0,04 ^{a(B)}	53,15 ± 1,48 ^{cd(A)}	47,18 ± 1,64 ^{bc(B)}

¹ Os resultados estão expressos em matéria seca; ² AF: aclimatados ao frio; ³ NA: não aclimatados ao frio. Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna e maiúsculas numa mesma linha entre as médias dos teores de sólidos ou proteína mostram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de t.

Em contraste, o teor de proteína bruta foi significativamente maior para os extratos das plantas aclimatadas ao frio, exceto para a cultivar IPR 84 em que não foram observadas diferenças estatísticas a 5 % de significância pelo teste de t entre os dois tratamentos. Chun; Yu e Griffith (1998) também encontraram valores mais elevados de proteínas no extrato de uma cultivar de trigo de primavera aclimatada ao frio, quando comparado ao da não aclimatada.

Segundo Modesto *et al.* (2002), à medida que as forrageiras atingem a sua maturidade, ocorre decréscimo nos teores de proteína bruta associado com aumentos nos teores de parede celular. Neste estudo, foi observado que as plantas cultivadas sob condições naturais desenvolveram-se mais que as plantas aclimatadas ao frio, o que explica essa diferença observada nos teores de proteína.

Nota-se também que o extrato da cultivar de trigo de primavera BRS Guabiju apresentou um maior conteúdo de proteína quando comparado com o conjunto de cultivares de inverno (trigo e centeio), nas amostras tratadas sob aclimação ao frio. Embora esse comportamento não tenha sido observado em todas as cultivares de trigo de primavera estudadas em trabalhos semelhantes também foi observada essa diferença. Hew *et al.* (1999), em estudo envolvendo diferentes cultivares de cereais, notaram que extratos de cultivares de primavera, apresentaram maior teor de proteínas

quando comparadas as cultivares de inverno. Entretanto, este comportamento ainda não está elucidado.

Não houve interação significativa para o tipo de tratamento (AF ou NA) e tipo de cultivar quanto ao teor de cinzas. O extrato da cultivar BRS Guabiju apresentou um teor de cinzas (1,91%) significativamente menor que das cultivares Ônix (2,21%), LD062212 (2,24%), IPR89 (2,52%), IPR84 (2,40%) e CD104 (2,34%). O extrato de centeio (IPR89) apresentou um teor de cinzas significativamente maior que das cultivares de trigo de primavera (BRS Guabiju, Ônix e LD062212).

A aclimação ao frio diminuiu significativamente os teores de cinzas dos extratos (0,98%), em relação às cultivares não aclimatadas (3,56%), corroborando que as condições de crescimento da planta, observadas durante o experimento, influenciaram a síntese de nutrientes.

2.4.2 Identificação das proteínas estruturadoras de gelo (ISPs)

Na Figura 2.1, estão as imagens dos géis obtidos por eletroforese SDS-PAGE na identificação das ISPs dos extratos obtidos a partir das cultivares estudadas neste trabalho, após sete semanas de aclimação ao frio (AF) e não aclimatadas (NA).

Nos extratos NA não foram observadas bandas nos géis, sendo que somente os das cultivares BRS Guabiju e da CD 104 continham algumas proteínas na faixa de 14,4 e 97,0 kDa, sob as condições de análise.

Na Figura 2.1, pode-se observar no extrato de folhas de centeio (IPR 89) as seguintes proteínas: uma de 14,4 kDa, duas de 20,1-30,0 kDa, uma de 30,0-45,0 kDa e uma de 66,0 kDa. Similarmente, as cultivares de trigo de inverno apresentaram um maior número de proteínas na faixa de 14,4 a 66,0 kDa. No extrato da IPR 84, foram identificadas uma proteína de massa molecular entre 14,4-20,1 kDa, três de 20,1-30,0 kDa e outra de 45,0-66,0 kDa, enquanto que no da CD 104, foram encontradas proteínas de 14,4, 14,4-20,1, 20,1, 20,1-30,0, 45,0-66,0 e 97,0 kDa, sendo está última, identificada somente nessa cultivar.

Para as cultivares de trigo de primavera, o extrato da BRS Guabiju AF, apresentou apenas duas proteínas no intervalo de massa molecular investigado, uma com 20,1 kDa e outra na faixa de 20,1-30,0 kDa, enquanto

que nos da Ônix e LD 062212, foram encontradas proteínas de 20,1–30,0 kDa e 45,0–66,0 kDa, uma de cada, além de outra de 45,0 kDa somente para a LD 062212.

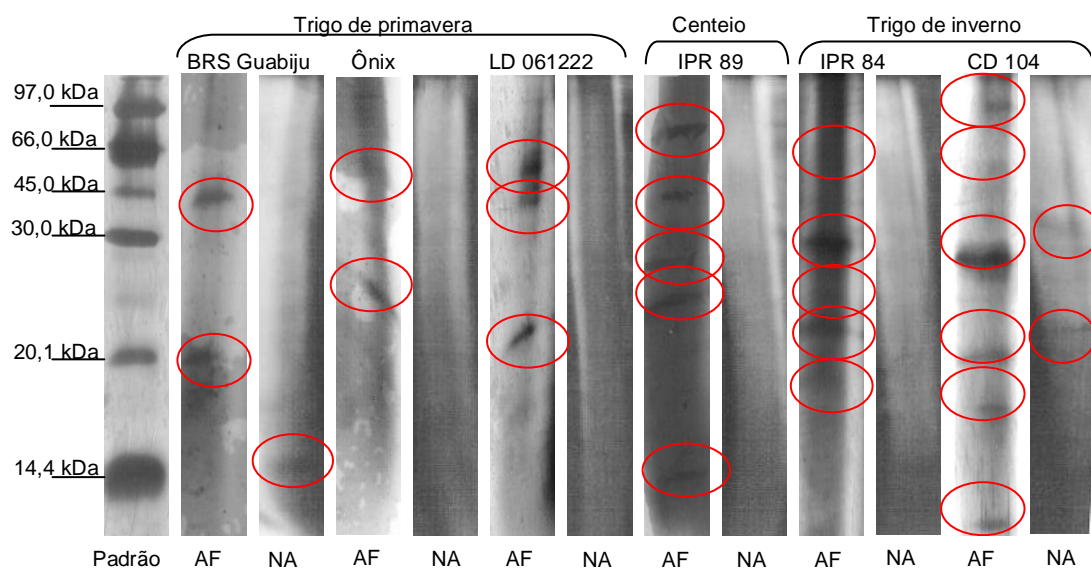


Figura 2.1 – Géis de eletroforese em SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares de trigo de primavera (BRS Guabiju, Ônix e LD 062212 AF), centeio (IPR 89) e trigo de inverno (IPR 84 e CD 104) aclimatados ao frio (AF) e não aclimatados (NA) por sete semanas de cultivo. Padrão: fosforilase b 97,0 kDa; 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.

Nota-se que as cultivares de primavera (BRS Guabiju, Ônix e LD 062212) apresentaram menos proteínas com massas moleculares entre 14,4 e 97,0 kDa quando comparadas com as cultivares de inverno (IPR 84 e CD 104). Isto não é, no entanto, um indicativo de que estas possuem uma atividade de ISPs mais baixa ou menos eficiente do que as cultivares de inverno, uma vez que, segundo Hon *et al.* (1994), a atividade de ISPs depende não só do tipo como também da concentração de ISP presente no extrato.

Resultados semelhantes foram reportados por Hon *et al.* (1994), ao identificarem e caracterizarem ISPs, individualmente, em extratos obtidos a partir de folhas de centeio aclimatadas ao frio. Os autores separaram as proteínas por SDS–PAGE em condições não redutoras, sendo que um total de sete bandas foi observado. As bandas foram cortadas e cinco das proteínas eluídas, com massas moleculares de 19, 26, 32, 34 e 36 kDa, mostraram um alto grau de atividade de ISPs, uma vez que modificaram a morfologia de crescimento normal de cristais de gelo, formando bipirâmides

hexagonais quando as soluções foram congeladas. Entretanto, as proteínas de 11 e 13 kDa apresentaram baixa atividade.

Em um estudo envolvendo o acúmulo de ISPs em cereais tolerantes ao frio, Antikainen e Griffith (1997) também identificaram diferentes proteínas em extratos de folhas aclimatadas a baixas temperaturas que se mostraram capazes de modificar a forma dos cristais de gelo, o que não foi constatado nos extratos não aclimatados. No extrato da cultivar de trigo de inverno, foram identificadas proteínas de massa molecular de 31,0–45,0, 21,5, 14,4–21,5, 14,4 e menor de 14,4 kDa sendo uma de cada, e duas de 21,5–31,0 kDa. Cultivar de trigo de primavera produziu extrato com composição similar, exceto que a proteína de massa molecular na faixa de 31,0–45,0 kDa não estava presente.

Kontogiorgos *et al.* (2007) isolaram e caracterizaram ISPs a partir do extrato de folhas de trigo de inverno aclimatadas ao frio. Os extratos obtidos foram concentrados por ultrafiltração e purificado antes da identificação das proteínas. Os autores tinham como objetivo identificar a presença de ISPs capazes de inibir a recristalização do gelo. A determinação da massa molecular por espectrometria de massa confirmou a presença das proteínas de 21,3 e 12,9 kDa, identificadas pela eletroforese SDS–PAGE. Também foi detectada a presença de uma proteína com massa molecular de 40 kDa. Os autores verificaram, ainda, que os extratos não aclimatados não produziram atividade de ISPs, ou seja, eles não inibiram a recristalização do gelo.

A partir das observações relatadas por esses pesquisadores e de acordo com os resultados encontrados, acredita-se que as cultivares estudadas no presente trabalho têm potencial para produzir extratos capazes de apresentar atividade de ISPs. Sendo assim, estudos posteriores foram realizados para testar essa suposição.

2.5 CONCLUSÕES

A aclimação ao frio provocou diminuição no teor de sólidos totais e cinzas, e um aumento na concentração de proteína nos extratos de todas as cultivares.

Nos extratos AF, foram identificadas diferentes proteínas com massas moleculares na faixa de 14,4 a 66,0 kDa para o centeio e as cultivares de trigo de inverno, enquanto que os extratos de trigo de primavera exibiram um menor número de bandas, entre 20,1 a 66,0 kDa, valores esses que estão dentro da faixa de massa molecular de ISPs presentes em plantas aclimatadas ao frio.

Os extratos NA praticamente não exibiram bandas protéicas, quando comparadas aos extratos AF, indicando que a aclimação ao frio induz a formação de ISPs em cultivares brasileiras de trigo e centeio.

CAPÍTULO 3

DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO EM CULTIVARES BRASILEIRAS DE TRIGO

3.1 INTRODUÇÃO

A capacidade das plantas em sobreviver a temperaturas de congelamento pode variar extensamente. Em um extremo estão as plantas de regiões tropicais que virtualmente não possuem capacidade de sobreviver em temperaturas muito baixas. Por outro lado, plantas herbáceas de regiões de clima temperado, geralmente sobrevivem a temperaturas de congelamento variando de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependendo da espécie.

De uma forma geral, o máximo de tolerância ao congelamento das plantas é induzido em resposta a baixas temperaturas, não congelantes (por volta de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$), um fenômeno conhecido como "aclimação ao frio." Plantas de trigo cultivadas em temperatura ambiente, por exemplo, morrem por congelamento em ambientes frios por volta de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas depois de aclimatadas ao frio, conseguem sobreviver ao congelamento em temperaturas tão baixas quanto $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (THOMASHOW, 1998).

Quando um organismo é resfriado a uma temperatura abaixo do ponto de congelamento de equilíbrio dos fluidos do seu tecido, o gelo pode se formar, evento geralmente letal para as células. Organismos que são resfriados a temperaturas de congelamento, apresentam algum mecanismo capaz de interferir no congelamento da água do corpo, de tal maneira que o congelamento é prevenido ou torna-se tolerável. Isso é feito por meio da nucleação de gelo e mecanismos antinucleantes, que de várias maneiras promovem ou neutralizam a formação de gelo. Proteínas anticongelantes podem impedir o crescimento de cristais de gelo em soluções de uma forma não coligativa, ou seja, sem afetar significativamente o ponto de fusão da solução. Isto implica que os cristais de gelo podem permanecer em contacto com a água supercongelada sem crescimento dos mesmos (GRIFFITH *et al.*, 1992; ZACHARIASSEN e KRISTIANSEN, 2000; ATICI e NALBANTOĞLU, 2003).

De acordo com Hew *et al.* (1999), o mecanismo responsável pela tolerância ao congelamento em plantas reside dentro da célula, para protegê-la na formação interna de cristais de gelo. Esses autores encontraram um grupo de polipeptídios acumulados extracelularmente, inibe a nucleação de gelo e atividades anticongelantes controlam o crescimento dos cristais nos espaços intercelulares. Os polipeptídeos associados com propriedades anticongelantes, recentemente reportados como proteínas estruturadoras de gelo (ISPs), estão presentes em grupos com massas moleculares de 5–9, 9–11, 11–15, 21–23, 24–27, 30–31, 31–33, 32–36, 60–68, 89–100 e de 161 kDa, e podem combinar para fornecer estruturas de proteínas tolerantes ao congelamento com propriedades de modificar a nucleação do gelo e/ou com capacidade anticongelante.

Os mesmos autores estudaram o acúmulo de polipeptídeos durante a aclimação ao frio por várias semanas e observaram que aos 78 dias de aclimação, folhas de centeio atingiram um máximo de tolerância ao congelamento, exibindo um alto conteúdo dos polipeptídeos extracelulares. No entanto, a maioria dos polipeptídios diminui em intensidade ou deixa de estar presentes após 102 dias de aclimação e as folhas ficam pouco tolerantes ao frio.

A atividade anticongelante em extratos de folhas aclimatadas ao frio pode ser determinada pela observação de cristais de gelo no estágio de congelamento em microscópio. Em água pura, o gelo normalmente cresce paralelo ao eixo basal (chamado eixo *a*) da estrutura cristalina, com pouco crescimento perpendicular ao eixo basal, ou seja, paralelo ao eixo *c*, de modo que os cristais de gelo parecem planos e redondos. Na presença do extrato em baixas concentrações (nM) de ISPs, o crescimento do cristal de gelo é inibido no plano basal *a*, tanto que as faces do prisma hexagonal dos cristais começam a ficar evidentes. Em altas concentrações (μ M) de ISPs, os cristais de gelo crescem predominantemente ao longo do eixo *c* para formar bipirâmides hexagonais ou cristais tipo agulha. (GRIFFITH *et al.*, 1992; HON *et al.*, 1994, 1995; ANTIKAINEN e GRIFFITH, 1997; HEW *et al.*, 1999).

De acordo com Hon *et al.* (1995), as ISPs conseguem estabelecer ligações com o gelo modificando sua morfologia, devido à existência de terminais polares de aminoácidos que se alinham, de modo a permitir interações estáveis com a grade cristalina.

Os polipeptídios associados com a tolerância ao congelamento são produzidos em menor extensão por células de plantas não aclimatadas ao frio. Os extratos obtidos a partir dessas plantas formam cristais de gelo planos e circulares, quando submetidas ao congelamento, semelhantes a morfologia dos cristais em água pura (HEW *et al.*, 1999).

A proposta deste trabalho foi investigar a presença e atividade de ISPs em cultivares de trigo ao longo de sete semanas de cultivo sob aclimação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material experimental

Para o preparo dos extratos de ISPs, foram utilizadas as cultivares de trigo de primavera (BRS Guabiju desenvolvida pela EMBRAPA) e de inverno (CD 104 desenvolvida pela COODETEC). O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo quatro repetições para as plantas sem aclimação por sete semanas, e mais quatro para cada uma das sete semanas de aclimação ao frio.

As sementes foram semeadas e cultivadas conforme descrito no item 2.2.1 do capítulo 2, exceto que foram utilizados 2 000 LUX no sistema de iluminação da câmara fria. As plantas aclimatadas foram regadas, semanalmente, com solução nutritiva [(NH₄)₂SO₄ a 0,1 %]. Ao final de cada semana de cultivo, por um período total de sete semanas, quatro vasos (repetições) de cada cultivar foram retirados do sistema de refrigeração e as plantas foram colhidas para extração das ISPs. Essas amostras foram referidas como plantas aclimatadas ao frio (AF). As que permaneceram sob condições naturais (casa de vegetação, sem controle de temperatura, umidade e iluminação) por sete semanas, foram referidas como não aclimatadas (NA).

3.2.2 Extração das proteínas estruturadoras de gelo

A obtenção dos extratos brutos de ISPs foi realizada de acordo com método descrito por Zhang *et al.* (2008) modificado. O procedimento foi o mesmo utilizado no item 2.2.2 do capítulo 2, exceto que cultivares AF foram trituradas em liquidificador com solução tampão Tris-HCl (pH 7,4) na proporção 1:7 (amostra:tampão g/mL).

3.2.3 Caracterização protéica dos extratos de ISPs

Para caracterização dos extratos foram realizadas análises para determinar o seu conteúdo protéico e a identificação das ISPs por eletroforese SDS–PAGE.

As análises de proteína e sólidos totais nos extratos foram realizadas segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997), métodos n^o. 960.52 e n^o. 925.10, respectivamente.

A distribuição da massa molecular de ISPs foi estudada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme procedimento descrito no item 2.2.4 do capítulo 2.

3.2.4 Atividade das ISPs

A atividade das ISPs nos extratos obtidos após sete semanas de aclimação foi analisada qualitativamente pelo exame da morfologia do crescimento dos cristais de gelo de acordo com Hew *et al.* (1999) com algumas modificações.

Lâminas para microscopia, contendo 5 µL da amostra e cobertas por lamínula, foram acondicionadas em uma caixa de isopor contendo dióxido de carbono seco (–78 °C) por 10 min. A observação dos cristais de gelo foi feita imediatamente após a retirada da lâmina da caixa. A morfologia dos cristais de gelo foi feita através de imagens capturadas com câmera digital (Sony DSC W-150, 8.1 Mega pixels, 5x optical zoom) acoplada ao microscópio de contraste de fase (Olympus BX 41, Ocular 10x, Objetiva 10x, Contraste PH3), no Departamento de Botânica da UFMG. A água destilada, a solução

tampão Tris-HCl (pH 7,4) e os extratos das plantas não aclimatadas ao frio foram usados na comparação.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada Análise Estatística Descritiva para avaliar o efeito do tempo de aclimação no teor de proteína dos extratos das cultivares estudadas. Os gráficos foram obtidos utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Composição protéica dos extratos de ISPs

Os extratos obtidos durante as sete semanas de aclimação ao frio tiveram variação nos teores de sólidos totais entre 0,64 a 1,92 g/100 g de amostra e 0,64 a 1,72 g/100 g de amostra para as cultivares BRS Guabiju e CD 104, respectivamente. Para os extratos obtidos do trigo de primavera e inverno cultivados sob condições naturais, os teores foram iguais a 1,70 e 1,06 g/100 g, respectivamente.

Na Figura 3.1 estão representados os teores de proteínas nos extratos protéicos obtidos durante as sete semanas de aclimação ao frio. Nota-se queda no teor de proteína da 1^a a 3^a semana, com estabilização durante as semanas seguintes, exceto para cultivar BRS Guabiju que aumentou consideravelmente o teor de proteínas da 6^a para 7^a semana. Como as cultivares de primavera são menos responsivas à aclimação, comparadas às de inverno, acredita-se que essas plantas desenvolvam algum mecanismo para compensar esse comportamento. Sugere-se que as proteínas específicas tolerantes ao congelamento sintetizadas pelas cultivares de primavera sejam menos efetivas na sua proteção a baixas temperaturas, de modo que a maior concentração protéica nestas plantas ocorra para aumentar sua tolerância ao estresse pelo frio.

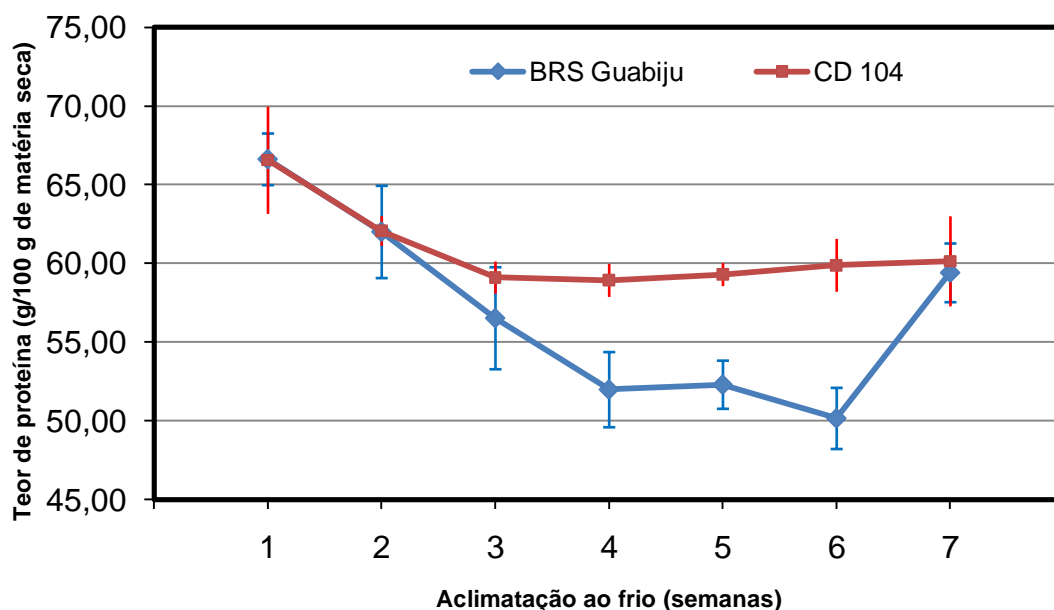


Figura 3.1 – Teor protéico dos extratos de ISPs das folhas das plantas de trigo de primavera (BRS Guabiju) e de inverno (CD 104) aclimatadas ao frio por uma a sete semanas. As barras representam o desvio padrão da média.

Em estudo semelhante, Antikainen e Griffith (1997) investigando a presença de ISPs em diferentes membros da família Poaceae, observaram que o teor de proteína em extratos obtidos a partir de cultivares de trigo de inverno e primavera acumulou gradativamente a partir da 3ª semana de aclimação. Esses autores também observaram uma queda no teor de proteína da 1ª a 3ª semana, mas os autores não explicaram quais são as razões que levam a esse comportamento no teor protéico durante o estresse ao frio.

Supõem-se que essa queda no conteúdo protéico ocorra ao longo das primeiras semanas em resposta ao estresse ao frio regulado por hormônios vegetais, por exemplo, o ácido abscísico (ABA). O ABA, um fitormônio do estresse, regula o crescimento e desenvolvimento da planta, por todo o ciclo de vida, desempenhando funções durante a germinação. Além disso, é capaz de regular aspectos fisiológicos nas respostas a estresses naturais tais como seca, salinidade e frio (LEUNG e GIRAUDAT, 1998; FINKELSTEIN, GAMPALA e ROCK, 2002).

3.4.2 Identificação das proteínas estruturadoras de gelo (ISPs)

A identificação de ISPs por eletroforese nos extratos de trigo de inverno e primavera durante as sete semanas de aclimação ao frio e não aclimatados se encontram nas Figuras 3.2, 3.3 e 3.4.

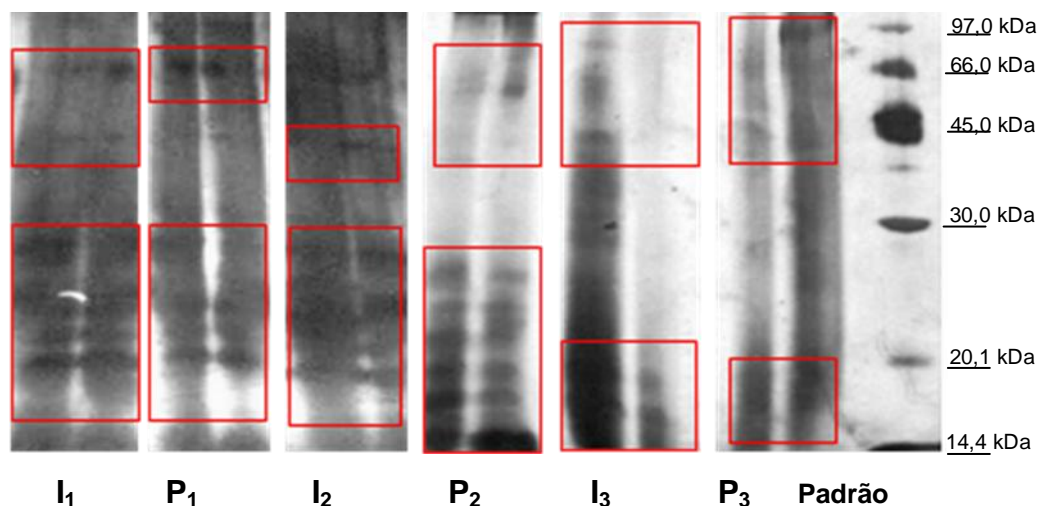


Figura 3.2 – SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares (I) CD 104 (trigo de inverno) e (P) BRS Guabiju (trigo de primavera) obtidos na primeira (I₁ e P₁), segunda (I₂ e P₂) e terceira semana (I₃ e P₃) de aclimação ao frio. Padrão fosforilase b 97,0 kDa; albumina bovina 66,0 kDa; albumina de ovo 45,0 kDa; anidrase carbônica 30,0 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa; lisozima purificada da clara de ovo 14,4 kDa.

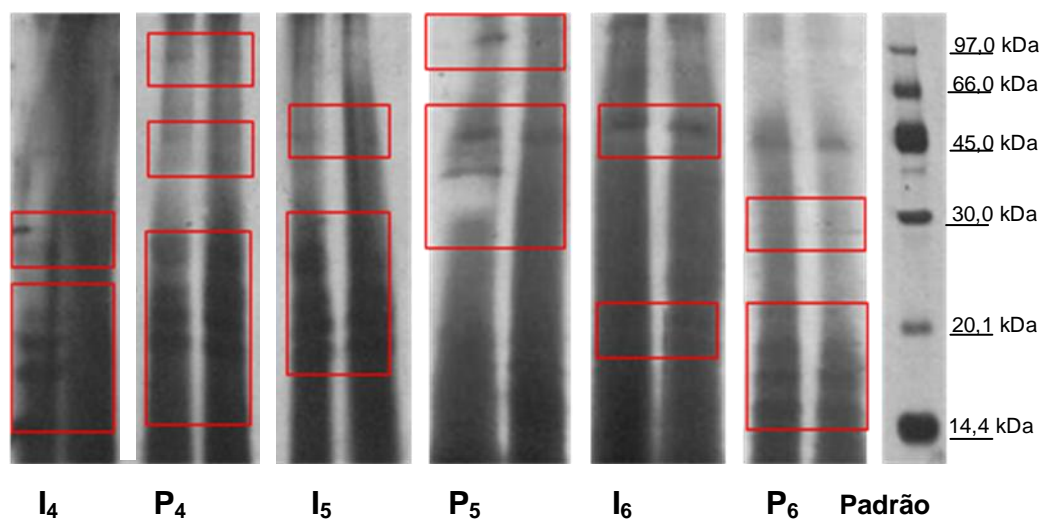


Figura 3.3 – SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares (I) CD 104 (trigo de inverno) e (P) BRS Guabiju (trigo de primavera) obtidos na quarta (I₄ e P₄), quinta (I₅ e P₅) e sexta semana (I₆ e P₆) de aclimação ao frio. Padrão: fosforilase b 97,0 kDa; albumina bovina 66,0 kDa; albumina de ovo 45,0 kDa; anidrase carbônica 30,0 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa; lisozima purificada da clara de ovo 14,4 kDa.

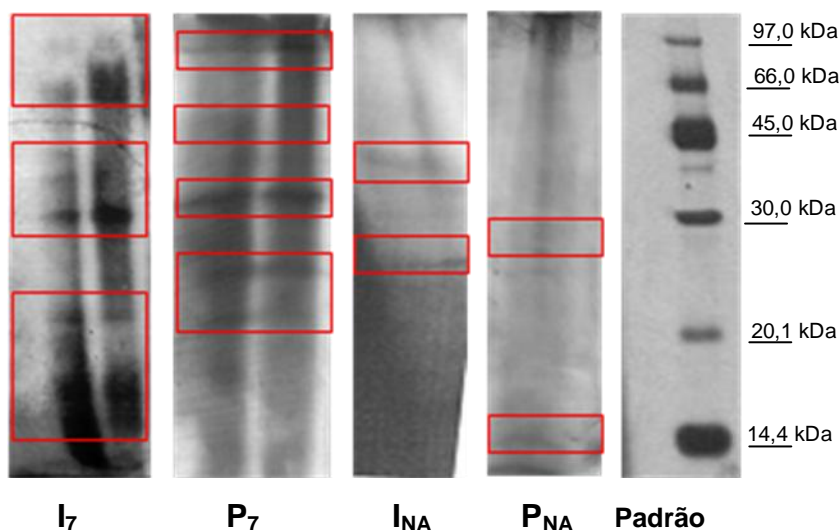


Figura 3.4 SDS–PAGE dos extratos obtidos das cultivares (I) CD 104 (trigo de inverno) e (P) BRS Guabiju (trigo de primavera) obtidos na sétima (I₇ e P₇) semana de aclimação ao frio e não aclimatados (I_{NA} e P_{NA}). Padrão: fosforilase b 97,0 kDa; albumina bovina 66,0 kDa; albumina de ovo 45,0 kDa; anidrase carbônica 30,0 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa; lisozima purificada da clara de ovo 14,4 kDa.

Nota-se que diferentes ISPs na faixa de 66,0–97,0 kDa foram identificadas apenas nas duas primeiras semanas, enquanto que as de 97,0 kDa foram encontradas apenas após três semanas (Fig 3.2). A ISP de 66,0 kDa esteve presente somente na terceira semana para os dois tipos de trigo (Fig 3.2) e para sétima semana no trigo de inverno (Fig 3.4).

Pode ser também observado que ao longo das sete semanas de aclimação, houve uma prevalência das bandas na faixa de 14,4 a 30,0 kDa, para os dois tipos de trigo. No entanto, somente após cinco semanas, nota-se a presença de ISP de 30,0 kDa em alguns extratos obtidos. A ISPs de 14,4 kDa foi identificada somente nos extratos de trigo de primavera com duas e quatro semanas (Fig 3.2 e 3.3.) e no de inverno na sétima semana (Fig 3.4).

Nos extratos não aclimatados foram identificadas duas ISPs em cada um deles, no de trigo de inverno uma ISPs com massa molecular entre 30,0–45,0 kDa e outra com 20,1–30,0 kDa. O extrato de trigo de primavera possui uma ISP de 14,4 kDa e também uma ISP com massa molecular entre 20,1–30,0 kDa, mas que é diferente da do trigo de inverno (Fig. 3.4).

Os resultados encontrados são sustentados por pesquisas anteriores de outros autores. Hew *et al.* (1999) observaram que polipeptídios de extratos de folhas de centeio não aclimatadas são detectados a níveis muito

pequenos e que eles se acumulam paulatinamente durante 35, 50, 57 e 78 dias de aclimação ao frio. Os autores verificaram que a maioria dos polipeptídios acumulados estava relacionada com mudanças na tolerância ao congelamento.

Assim como no presente estudo, Antikainen e Griffith (1997) também observaram que distintas proteínas foram identificadas em diferentes semanas de aclimação. Os autores mencionaram que uma proteína de 32 kDa aumentou de intensidade durante as sete semanas de aclimação, enquanto que as de 35, 25 e 16 kDa foram detectadas apenas após quatro semanas de aclimação ao frio. Proteínas similares acumulam no apoplasto das folhas de trigo de inverno e primavera durante a aclimação ao frio. Foi também detectada uma de 42 kDa no trigo de inverno e outra de 22 kDa no trigo de primavera aclimatados ao frio. Além disso, foi encontrada outra de 24 kDa em ambos tipos de trigo. Os autores conseguiram relacionar a presença dessas proteínas com atividades de ISPs através do exame da morfologia do crescimento de cristais de gelo.

3.4.3 Atividade das ISPs

A atividade das ISPs em modificar a forma dos cristais de gelo não foi observada em nenhum dos extratos das plantas não aclimatadas (Fig. 3.5d e f); assim como na água destilada (Fig. 3.5a) e no tampão (Fig. 3.5b), há formação de cristais de gelo planos e circulares.

Na Figura 3.5 (c) e (e), o crescimento dos cristais de gelo junto ao eixo *c*, indicaram que após sete semanas de aclimação ao frio, os extratos obtidos das cultivares de trigo de primavera (BRS Guabiju) e inverno (CD 104) exibiram uma morfologia dos cristais de gelo característica da presença de ISPs, resultados esses que foram semelhantes aos encontrados por outros pesquisadores (HON *et al.*, 1994 e 1995; ANTIKAINEN e GRIFFITH, 1997; GRIFFITH *et al.*, 1997; HEW *et al.*, 1999; GRIFFITH e YAISH, 2004; JACKMAN *et al.*, 2007).

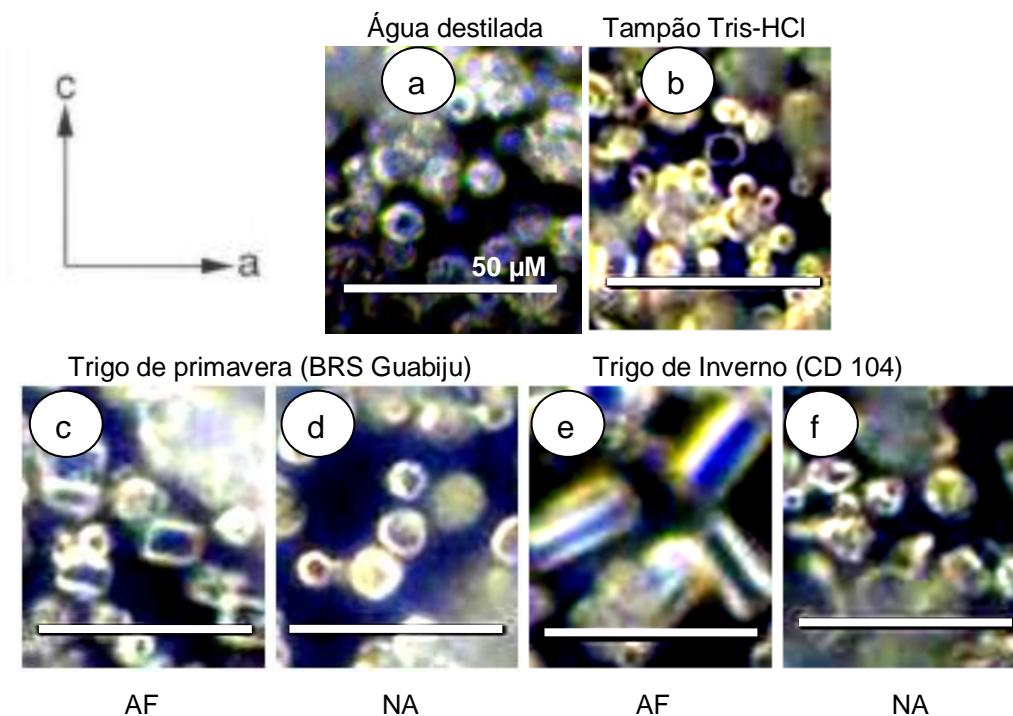


Figura 3.5 – Morfologia dos cristais de gelo: na água destilada (a) e no tampão Tris-HCl (b), o crescimento do gelo ocorre no sentido do plano basal a, formando cristais planos e redondos. O mesmo é observado para os extratos das cultivares de trigo de primavera BRS Guabiju (d) e de inverno CD 104 (f) não aclimatados ao frio. Nos extratos das plantas aclimatadas ao frio por sete semanas, os cristais de gelo crescem no sentido do eixo c, com formatos tetraédricos, tanto para a cultivar de trigo de primavera BRS Guabiju (c) e de inverno CD 104 (e).

As formas observadas são características de um nível baixo de ISPs, sendo que os cristais dos extratos das cultivares BRS Guabiju e CD 104 apresentaram um formato tetraédrico e de coluna hexagonal, respectivamente. Segundo Antikainen e Griffith (1997) nos extratos com baixa atividade de ISPs, os cristais de gelo se apresentam como hexágonos planos. Num estudo utilizando diferentes cultivares de cereais, esses autores observaram que as cultivares de trigo de primavera e inverno apresentaram alto nível de atividade anticongelante constatado pela observação de formas de bipirâmides hexagonais e cristais tipo agulha, respectivamente.

Como os extratos analisados no presente trabalho são mais diluídos que os pesquisados por Antikainen e Griffith (1997), a concentração de ISPs presentes é mais baixa, acarretando, conseqüentemente, em menor capacidade em modificar a estrutura do gelo. Acredita-se também, que as cultivares de trigo brasileiras podem exibir comportamento diferente frente ao estresse ao frio, e sintetizar menor nível de ISPs nas plantas.

3.5 CONCLUSÕES

O conteúdo protéico nos extratos obtidos de cultivares brasileiras de trigo diminuiu nas primeiras três semanas de aclimação ao frio e se manteve constante até a sétima semana. Diferentes proteínas com massas moleculares entre 14,4 e 97,0 kDa estão presentes nesses extratos ao longo de sete semanas de aclimação, havendo, de modo geral, uma prevalência de bandas na faixa de 14,4 a 30,0 kDa para as duas cultivares. As proteínas presentes nestes extratos foram capazes de modificar a morfologia de crescimento dos cristais de gelo, com formatos tetraédrico e de coluna hexagonal, indicando baixa atividade de ISPs.

CAPÍTULO 4

EFEITO CRIOPROTETOR DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO EM MASSAS DE PÃO CONGELADAS

4.1 INTRODUÇÃO

Segundo a RDC n.º 90 de 18 de outubro de 2000, o pão tipo francês é um “produto fermentado, preparado, obrigatoriamente, com farinha de trigo, sal (cloreto de sódio) e água, que se caracteriza por apresentar casca crocante de cor uniforme castanho-dourada e miolo de cor branco-creme de textura e granulação fina não uniforme” (BRASIL, 2000). O pão tipo francês é o mais consumido entre os diferentes produtos de panificação produzidos no Brasil (ABIP, 2009).

Nos últimos anos, os estabelecimentos no segmento de panificação têm optado pela comercialização de massas congeladas, pães pré-assados congelados ou pães assados congelados, devido à praticidade, diminuição de custos com mão de obra especializada e flexibilidade para a produção com a diminuição considerável do trabalho noturno nesses estabelecimentos (WATANABE e BENASSI, 2000; GUTKOSKI e SANTOS, 2004; ROMEU, TADINI e MATUDA, 2006).

No entanto, esses tipos de produtos apresentam algumas características indesejáveis, pois podem perder sua qualidade e aparência de pão fresco. Isso é uma consequência das alterações que ocorrem durante os ciclos de congelamento e descongelamento parciais, durante a distribuição, transporte e armazenamento (WATANABE e BENASSI, 2000).

Durante o congelamento, cristais de gelo se formam dentro da estrutura da massa causando danos na rede de glúten por ação mecânica (BERGLUND, SHELTON e FREEMAN, 1991). Assim, durante o descongelamento da massa, pode haver perda considerável de água, diminuindo a qualidade de panificação. O baixo volume e estrutura de miolo aberta e mais firme do pão assado também são características indesejáveis provocadas pelo estresse do congelamento (WATANABE e BENASSI, 2000; XU *et al.*, 2009).

A utilização de farinha de trigo de glúten forte, leveduras tolerantes ao congelamento e adição de alguns aditivos tem sido uma prática com o objetivo de minimizar essas perdas na qualidade da massa congelada para produção do pão (ZANG *et al.*, 2007 e 2008). No entanto, os aditivos mudam as propriedades de textura, assim como a produção de compostos voláteis do pão (ZANG *et al.*, 2008).

Proteínas estruturadoras de gelo (ISP) são substâncias encontradas em uma ampla gama de plantas de inverno que são capazes de inibir o crescimento e recristalização de gelo que se forma nos espaços intercelulares (GRIFFITH *et al.*, 1997; GRIFFITH e YAISH, 2004). Essa habilidade das ISPs tem levado à apresentação de propostas para a utilização dessas proteínas em uma vasta área, como a melhoria das propriedades dos alimentos congelados, a criopreservação de órgãos e células de transplante, criocirurgia e na aquicultura (CREVEL, FEDYK e SPURGEON, 2002).

O presente trabalho tem como objetivo obter extratos protéicos com atividade de ISPs a partir de cultivares de trigo e centeio e verificar seu efeito crioprotetor em massas de pão tipo francês congeladas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material experimental

A primeira etapa do experimento foi conduzida seguindo delineamento inteiramente casualizado (DIC), em que uma cultivar de trigo de primavera (BRS Guabiju desenvolvida pela EMBRAPA), uma de trigo de inverno (CD 104 desenvolvida pela COODETEC) e uma de centeio (IPR 89 desenvolvida pela IAPAR) foram plantadas com quatro repetições, totalizando 12 unidades experimentais.

As sementes foram semeadas e cultivadas sob refrigeração por sete semanas após 12 dias de germinação sob condições naturais, conforme descrito no item 3.2.1 do capítulo 3.

4.2.2 Preparação dos extratos de ISPs

A extração das proteínas (infiltração à vácuo) foi realizada de acordo com método descrito por Zhang *et al.* (2008) modificado. O procedimento foi igual ao utilizado no item 3.2.2 do capítulo 3.

4.2.3 Caracterização dos extratos de ISPs

As análises de proteína e sólidos totais nos extratos foram realizadas segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997), métodos nº. 960.52 e nº. 925.10, respectivamente.

A atividade das ISPs nos extratos obtidos foi analisada qualitativamente pelo exame da morfologia do crescimento dos cristais de gelo de acordo com Hew *et al.* (1999) com algumas modificações, descrito no item 3.2.4 do capítulo 3.

4.2.4 Elaboração de massa de pão tipo francês

As massas de pão tipo francês foram elaboradas segundo método 10–10B da AACC (2000) com modificações. Para elaboração da massa de pão tipo francês, foi utilizada farinha de trigo tipo especial – Suprema (Bunge Alimentos S.A.) com 13,44 % e 13,04 % de proteína e teor de umidade, respectivamente, dados esses que foram utilizados nos cálculos da formulação da massa.

Para cada amostra, aproximadamente 20 g de farinha de trigo foram utilizadas seguindo a formulação (em Baker's %): 100 % de farinha de trigo; 6,0 % de sacarose; 1,5 % de sal; 1,1 % de fermento e 1,0 % de gordura vegetal hidrogenada. Cada massa deu origem a 3 replicatas que foram utilizadas nas análises de sinérese, identificação e quantificação de subunidades de gluteninas e microscopia da massa.

A quantidade de água adicionada, baseada em 60,3 % de absorção, foi calculada de acordo com o teor de proteína e umidade da farinha. Os extratos de ISPs das folhas de trigo e centeio foram diluídos em água, de modo que três níveis diferentes de proteínas foram adicionados: 4, 8 e

12 mg de proteína/100 g de massa. Amostras sem adição do extrato de ISPs foram preparadas somente com água (0 mg de proteína/100 g de massa).

A massa foi misturada em um agitador mecânico de haste (marca Nova Ética, modelo 103), com batedor tipo gancho em três etapas: na primeira foram misturados a farinha, o açúcar e o sal durante 30 segundos, a seguir, o fermento dissolvido na água e/ou extrato de ISPs foi adicionado e misturado por um minuto, na última etapa foi acrescentada a gordura vegetal hidrogenada agitando-se por mais 6 min para o desenvolvimento da massa.

Após a formação de uma massa lisa e homogênea, foram retiradas três amostras de 10 g de cada formulação, boleadas, deixadas em descanso por 20 minutos, sendo cilindradas e modeladas manualmente, e colocadas em sacos plásticos de polietileno identificados. Por fim, as amostras foram congeladas em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelo tempo necessário de acordo com a realização das análises.

4.2.5 Sinérese nas massas de pão congeladas

As amostras contendo ISPs e a amostra sem adição de extrato foram submetidas a três ciclos de congelamento (20 horas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) e descongelamento (4 horas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) segundo metodologia estabelecida por Lee *et al.* (2002), com algumas modificações. A técnica consiste em colocar a amostra em um funil de Büchner acoplado a um kitassato. Sobre a amostra foi colocado um peso de 1 kg para acelerar a saída da água durante filtração a vácuo por 10 min. A determinação da sinérese (porcentagem de água liberada) foi calculada pela diferença entre a massa inicial (M_i) antes do congelamento e a massa final (M_f) das amostras após a filtração (Eq. 4.1).

$$\% \text{ Sinérese} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (4.1)$$

4.2.6 Identificação e quantificação das proteínas nas massas de pão

Foi utilizada técnica de análise descrita por Pirozi *et al.* (2008) para identificação e quantificação das gluteninas nas massas de pão com e sem adição de extrato de ISPs após o congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 30 dias. Para

comparações, também foi realizada análise com a massa recém preparada (não congelada) sem adição de extrato.

4.2.6.1 Preparo das amostras

4.2.6.1.1 Proteína polimérica total

Em um microtubo tipo Eppendorf, contendo 10 mg de amostra, foram adicionados 1 mL de tampão-SDS (0,5 % SDS em 0,05 M fosfato de sódio monobásico, pH 6,9), seguindo homogeneização em um agitador de tubos (tipo vórtex, marca Marconi, modelo MA-162) por 5 min na velocidade 10. Posteriormente, a suspensão foi tratada em sonicador de haste (marca Cole-Parmer Instrument Company Ltd., modelo Ultrasonic Homogenizer 4710 series), em potência constante de 8 W por 15 segundos, sendo as amostras resfriadas em banho de gelo e mantidas sob refrigeração até a centrifugação. As amostras foram então centrifugadas a $16.873 \times g$ por 15 min em microcentrífuga (marca Eppendorf AG, modelo 5418); o sobrenadante foi recolhido por uma seringa e filtrado em filtro de nylon de 0,45 μm dentro de vials de 2 mL. Os vials foram aquecidos em banho-maria (Marca Solab) a $80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 min, resfriados em banho de gelo e conservados sob refrigeração até a sua quantificação no SE-HPLC.

4.2.6.1.2 Proteína polimérica extraível

A preparação das amostras para identificação das proteínas poliméricas extraíveis foi realizada sob as mesmas condições descritas para quantificação das proteínas poliméricas totais, exceto que as amostras não passaram pela etapa de tratamento no sonicador de haste. O resíduo foi reservado para obtenção de proteína polimérica não extraível.

4.2.6.1.3 Proteína polimérica não extraível

O resíduo da extração da etapa anterior foi ressuspenso em 1 mL de tampão-SDS e tratado de acordo com o procedimento descrito para quantificação das proteínas poliméricas totais com algumas modificações. O

resíduo foi homogeneizado no agitador de tubos por 10 min e foi utilizada potência constante de 8 W por 30 segundos no sonicador de haste.

4.2.6.2 Determinação das proteínas poliméricas por SE-HPLC

Para a determinação das PPT, PPE e PPNE, 20 µL de amostras foram injetadas em SE-HPLC, em um sistema SHIMADZU SCL-10AVP com injeção automática, utilizando uma coluna de exclusão molecular Phenomenex BioSep-SEC S4000 (300 x 7,8 mm). O eluente empregado foi uma solução de acetonitrila (ACN) e água na proporção de 1:1 contendo 0,05 % de ácido trifluoracético (TFA), com tempo de eluição de 15 min. A quantificação foi obtida pelo uso de um detector espectrofotométrico (UV-VIS), em comprimento de onda de 214 nm. A leitura dos cromatogramas foi realizada com o auxílio do programa Lcsolutions v.1.22 SP1, conforme descrito a seguir.

4.2.6.2.1 Avaliação dos cromatogramas

Os cromatogramas foram divididos em picos principais denominados picos 1 e 2, que correspondem às frações de proteínas polimérica (gluteninas), e monoméricas (gliadinas e albuminas/globulinas), respectivamente (Figura 4.1).

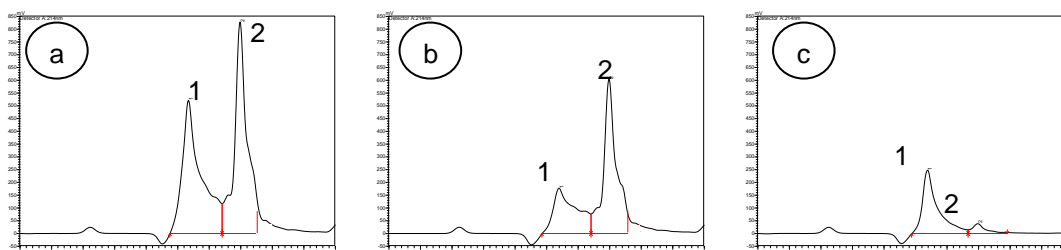


Figura 4.1 – Perfil de separação de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da farinha de trigo por SE-HPLC.

A porcentagem de proteína polimérica total (PPT) foi calculada como: $[\text{Área do pico } 1_{\text{PPT}} / (\text{Área do pico } 1_{\text{PPT}} + \text{Área do pico } 2_{\text{PPT}})] \times 100$; e a porcentagem de proteína polimérica não extraível (PPNE) foi definida como: $\text{Área do pico } 1_{\text{PPNE}} / (\text{Área do pico } 1_{\text{PPNE}} + \text{Área do pico } 1_{\text{PPE}}) \times 100$

4.2.7 Microscopia das massas de pão

Foi verificada a aparência da microestrutura da massa de pão tipo francês nas amostras contendo ISPs e sem adição de ISPs após o congelamento por 90 dias, e na massa controle sem adição de ISPs recém-preparada (sem congelamento) de acordo com a metodologia descrita por Ribotta *et al.* (2004).

As massas foram cortadas com uma lâmina em pequenas porções e após o descongelamento (daquelas congeladas), todas as amostras foram fixadas em glutaraldeído 25 % (1:30) por 2 h e desidratadas em uma série de gradientes de acetona (25, 50, 75 e 80 %) por 20 min cada, e por fim em acetona 100 % em três intervalos consecutivos de 20 min para assegurar total desidratação.

As amostras foram secas em secador de ponto crítico (Marca Bal-tec, modelo CPD 03) e metalizadas com ouro por 2 min (15–20 nm de espessura) em um metalizador (Marca Sputtering-Balzers, modelo FDU-010), ambos do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. A observação da morfologia das amostras foi então realizada em microscópio eletrônico de varredura (Marca Zeiss, modelo DSM 950) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, utilizando um potencial de aceleração de 15 kV. A micrografia foi realizada com 500x e 5.000x de ampliação da escala de medida da fotografia eletrônica obtida através do software Ditwin 1.0.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os teores de sólidos totais e proteína foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi analisada pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5 %.

Os dados de sinérese foram avaliados pela análise descritiva dos histogramas obtidos para as massas de pão preparadas com diferentes extratos das cultivares utilizadas no experimento.

Na identificação e quantificação de subunidades de gluteninas foi utilizada análise de regressão, com ajustes de modelo para as amostras congeladas. Uma comparação de médias entre as amostras congeladas e a

fresca (controle) foi realizada usando o teste de Dunnett a 5 % de probabilidade.

As análises estatísticas foram feitas no programa SAS System v. 9.1 e os gráficos foram feitos no programa Microsoft Office Excel 2007.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Caracterização dos extratos de ISPs

Os teores de sólidos totais nos extratos das cultivares estudadas foram diferentes ($p \leq 0,05$) entre si, sendo que a cultivar de trigo de primavera BRS Guabiju apresentou o maior teor (1,92 g/100 g de extrato) quando comparada as cultivares de trigo de inverno CD 104 (1,74 g/100 g de extrato) e centeio IPR 89 (1,09 g/100 g de extrato). Já o conteúdo de proteína dos extratos obtidos das cultivares BRS Guabiju (60,43 g/100g de matéria seca) e CD 104 (60,14 g/100 g de matéria seca) não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), e foram maiores que o da IPR 89 (55,78 g/100 g de matéria seca).

Observa-se na Figura 4.2 (a) e (b), que a água e a solução tampão Tris-HCl formam cristais redondos e planos, ou seja, o crescimento dos cristais se dá no sentido do eixo basal a . Segundo a literatura, a presença de ISPs modifica a forma dos cristais de gelo, que tendem a crescer também no sentido do eixo c originando formatos menos arredondados tendendo a conformações prismáticas. Comparadas aos cristais formados em água pura (Fig. 4.2a) e em tampão (Fig. 4.2b), os extratos de ISPs de todas as fontes estudadas apresentaram atividade para modificar a forma dos cristais de gelo (Fig. 4.2c, d e e). Os extratos das cultivares IPR 89 (centeio) e BRS Guabiju (trigo de primavera) apresentaram morfologia semelhante, formando cristais tetraédricos planos, enquanto que a cultivar CD 104 tendeu a formação de colunas hexagonais, o que aparentemente ocorreu devido a maior crescimento ao longo do eixo c .

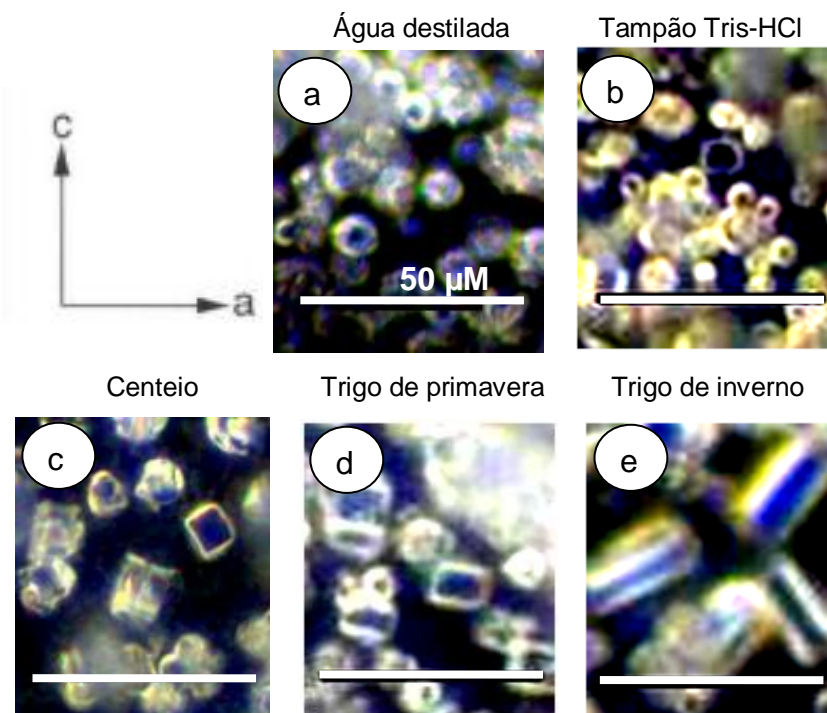


Figura 4.2 – Morfologia dos cristais de gelo: na água destilada (a) e no tampão Tris-HCl (b), o crescimento do gelo ocorre no sentido do plano basal *a*, formando cristais planos e redondos. Nos extratos das plantas aclimatadas ao frio por sete semanas, os cristais de gelo crescem no sentido do eixo *c*, com formatos tetraédricos, tanto para o extrato da cultivar de centeio IPR 89 (c) quanto para as de trigo de primavera BRS Guabiju (d) e de inverno CD 104 (e).

Segundo Hon *et al.* (1994), o nível de atividade anticongelante depende do tipo e concentração de ISPs presentes no extrato. As ISPs apresentam baixa atividade quando os cristais de gelo têm formato hexagonal plano com faces pequenas e bem definidas com crescimento ao longo do eixo *c*, enquanto que em altas concentrações de ISPs os cristais apresentam formato mais complexo, na forma de uma bipirâmide hexagonal. Essa observação sugere que os extratos obtidos neste estudo apresentaram baixa atividade, que ainda assim parecem ser suficientes, visto que quantidades mínimas de ISPs são necessárias para modificar a forma dos cristais de gelo (PAYNE e YOUNG, 1995).

4.4.2 Sinérese nas massas de pão congeladas

Nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 estão apresentados os resultados, frente aos ciclos de congelamento e descongelamento, das massas congeladas com adição de diferentes concentrações de ISPs nos extratos protéicos das cultivares IPR 89, BRS Guabiju e CD 104, respectivamente.

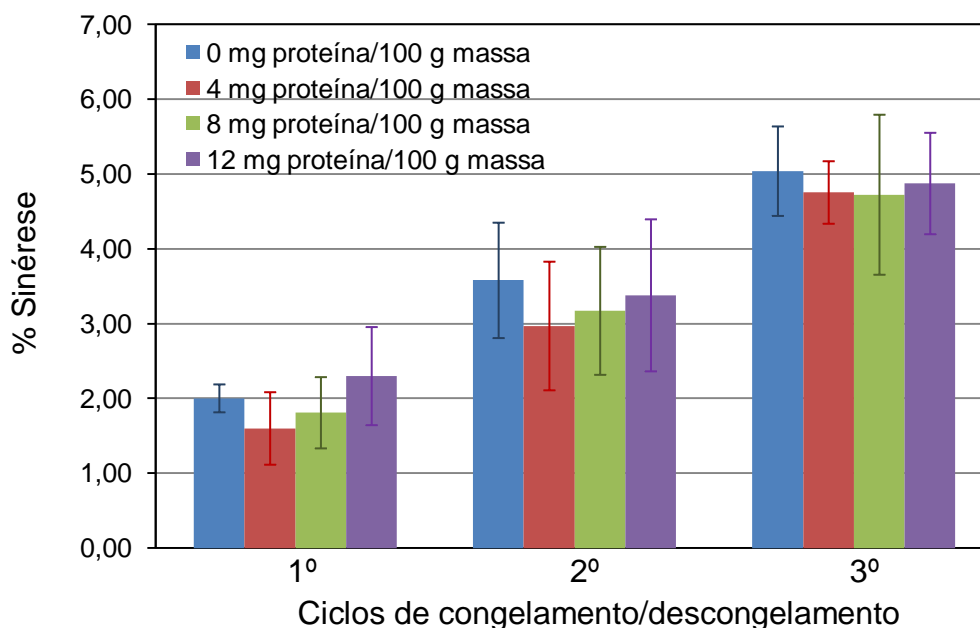


Figura 4.3 – Percentual de sinérese nas massas de pão tipo frances utilizando extrato protéico da cultivar IRP 89 (centeio), durante três ciclos de congelamento (20 h/–18°C) e descongelamento (4 h/20°C). As barras representam o desvio padrão da média.

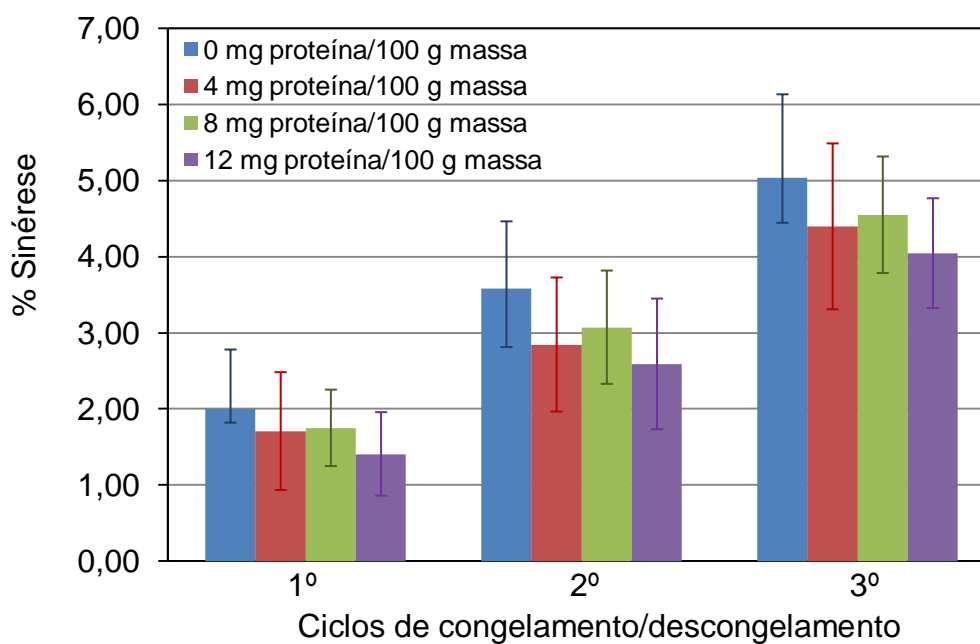


Figura 4.4 – Percentual de sinérese nas massas de pão tipo francês utilizando extrato protéico da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera), durante três ciclos de congelamento (20 h/–18°C) e descongelamento (4 h/20°C). As barras representam o desvio padrão da média.

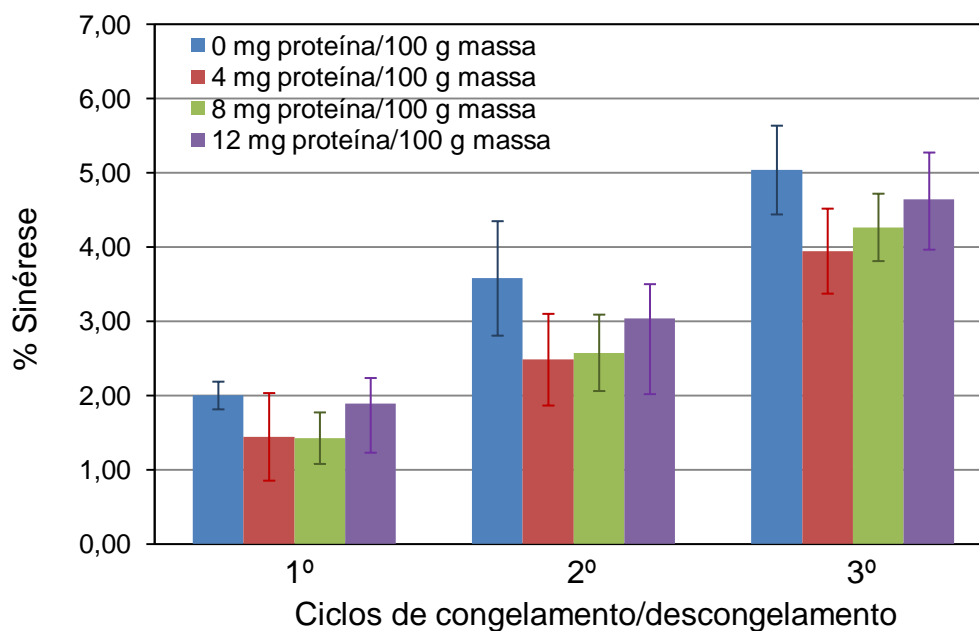


Figura 4.5 – Percentual de sinérese nas massas de pão tipo francês utilizando extrato protéico da cultivar CD 104 (trigo de inverno), durante três ciclos de congelamento (20 h/-18°C) e descongelamento (4 h/20°C). As barras representam o desvio padrão da média.

Uma tendência de aumento na sinérese é observada durante os ciclos de congelamento/ descongelamento da massa podendo estar relacionado à recristalização do gelo na massa congelada. Cristais de gelo maiores crescem às custas de menores e, em seguida, provocam a ruptura da rede de glúten. Quanto maior o tamanho dos cristais de gelo, mais fraca a rede de glúten, e assim mais água, que estava presa na massa, será lançada para fora após o descongelamento aumentando assim a sinérese na massa congelada.

Há em todos os casos uma tendência à diminuição da sinérese quando os extratos foram adicionados nas massas de pão. Isso sugere um menor dano físico na estrutura da massa, uma vez que as ISPs podem ter modificado a morfologia dos cristais de gelo formados durante a estocagem sob congelamento e os repetidos ciclos de gelo-degelo.

São escassos os estudos sobre a perda de água em alimentos com adição de extratos contendo ISPs. Payne e Young (1995) estudaram o efeito da presença de ISPs na carne de cordeiro congelada. Para tal, os autores administraram injeções contendo extrato de ISPs no animal antes do abate e constataram que a presença dessas proteínas na carne reduz a perda de água durante o descongelamento.

Resultados semelhantes foram reportados por Xu *et al.* (2009). Esses autores avaliaram a capacidade de retenção de água (CRA) em massas congeladas contendo ISPs extraídas de grãos de trigo de inverno aclimatados ao frio. Massas de 10 g foram congeladas em um freezer a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 min e após o congelamento rápido, as massas foram armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2, 4, 6, 8 e 10 semanas. Durante 10 semanas, as massas foram submetidas a cinco ciclos de congelamento (num intervalo de duas semanas) e descongelamento (a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h). Após o descongelamento, as massas foram submetidas a centrifugação para a determinação da CRA. Os autores observaram que a CRA diminuiu durante os ciclos de congelamento e descongelamento chegando a 75,2 % após cinco ciclos na massa sem adição de ISP (controle). Comparado ao controle, as massas congeladas contendo 0,3 % e 0,6 % de ISPs apresentaram maior CRA, mostrando uma pequena tendência em ser mais efetiva com o aumento da concentração de ISP. Os autores atribuíram esse comportamento a um aumento na preservação da rede de glúten pelas ISPs.

Embora esses resultados não sejam conclusivos, pode-se supor que a adição de ISPs tende a diminuir os danos causados pelo estresse de congelamento e descongelamento dos alimentos. Estudos mais abrangentes, com um número maior de unidades experimentais e mais ciclos de congelamento e descongelamento, são necessários para investigar tal comportamento.

4.4.3 Identificação e quantificação das proteínas nas massas de pão

Nas Figuras 4.6 e 4.7 estão apresentados os cromatogramas relativos à proteína total (a), extraível (b) e não extraível (c) da massa fresca e congelada de pão tipo francês sem adição de extrato. O perfil cromatográfico foi semelhante ao de uma amostra de farinha de trigo. Uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura com a identificação e quantificação de proteínas do glúten em massas de pão, no presente estudo os mesmos indicadores de avaliação da farinha de trigo foram adotados. De modo geral, os cromatogramas para as massas fresca e congelada, com e sem adição de extrato, apresentaram poucas diferenças entre si.

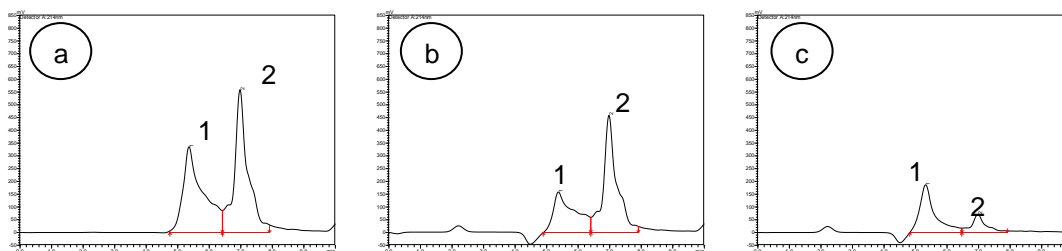


Figura 4.6 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa fresca de pão tipo francês sem adição de extrato

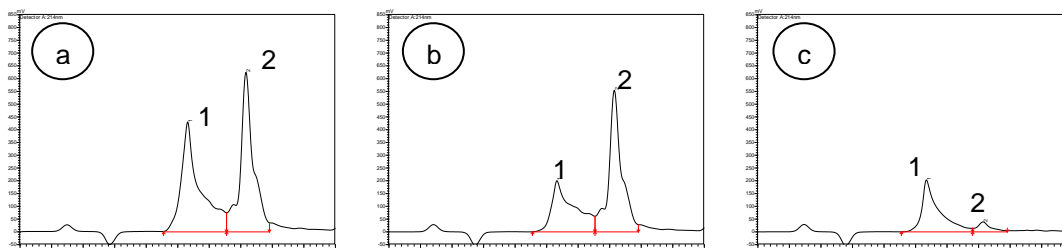


Figura 4.7 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa congelada de pão tipo francês sem adição de extrato.

A Figura 4.8 representa os efeitos da concentração dos extratos de ISPs obtidos da cultivar IPR 89 (centeio) nos teores de PPT e PPNE, respectivamente. O modelo de 1º grau ajustado para essas massas congeladas quanto ao teor de PPT, que explica pelo menos 90,74 % da variação dos dados, está apresentado na Equação 4.2. Para o teor de PPNE, o modelo de 1º grau, que explica 93,78 % dos dados encontra-se na Equação 4.3. Os modelos indicam que o aumento na concentração de proteína, ou seja, o aumento de extrato de ISPs adicionado nas massas diminui os valores de PPT e PPNE.

$$\text{PPT} = -0,12[\text{PT}] + 48,59 \quad (4.2)$$

$$\text{PPNE} = -0,25 [\text{PT}] + 45,48 \quad (4.3)$$

em que, PPT: Proteína polimérica total; PPNE: Proteína polimérica não extraível; PT: Teor de proteína total (mg proteína/100 g massa)

Devido à falta de estudos que relacionem os teores de PPT e PPNE com a qualidade da massa de pão congelada, foi adotada a hipótese de que a adição de extratos contendo ISPs produza massas congeladas com valores semelhantes aos da massa fresca, considerada controle; para tal, foram realizadas comparações qualitativas entre elas.

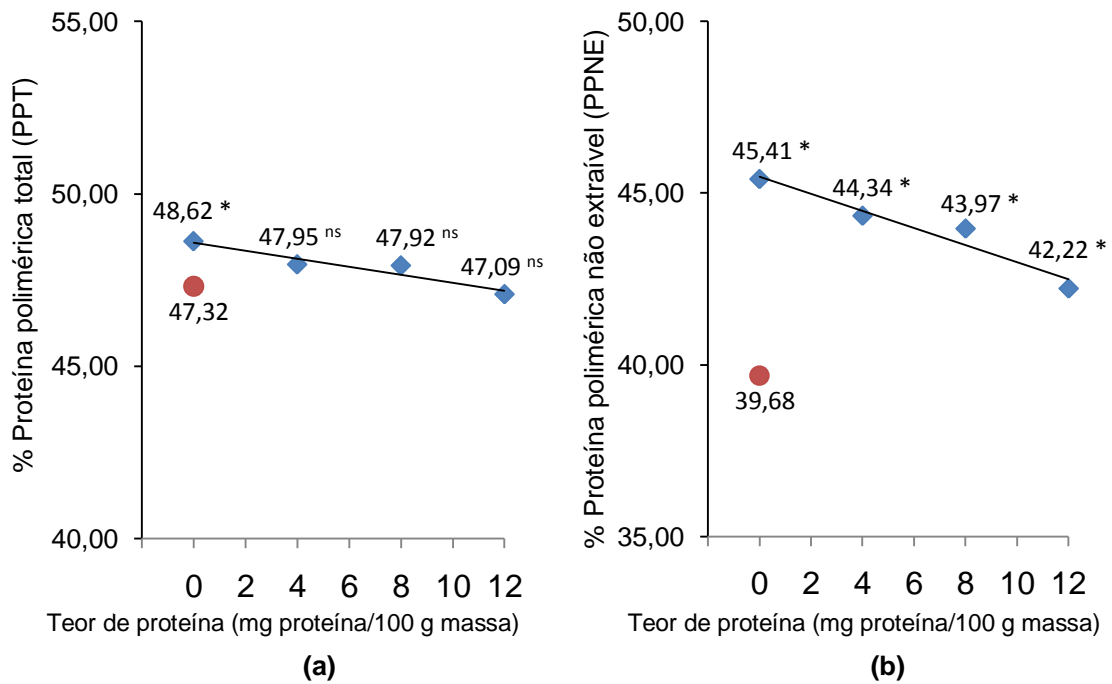


Figura 4.8 – Proteína polimérica total (a) e não extraível (b) das massas de pão tipo francês congeladas utilizando extrato protéico da cultivar IPR 89 (centeio). Nota: ● Valores para massa fresca (controle). * Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Observa-se na Figura 4.8(a) que os valores de PPT das massas com adição de extrato foram iguais ao da massa fresca, o que pode ser um indicativo de que a presença de ISPs nessas massas promoveu um comportamento semelhante ao de massa fresca, embora os teores de PPNE tenham sido diferentes. Desta forma, utilizando o modelo de regressão linear para PPT (Eq. 4.2) pode-se dizer que o teor de proteína a ser adicionado na massa a fim de que ela apresente comportamento de massa fresca após o congelamento é de 10,58 mg proteína/100 g massa.

Não foram encontrados modelos que se ajustassem aos valores de PPT e PPNE das massas obtidas com adição dos extratos das cultivares BRS Guabiju e CD 104, indicando que a concentração de proteína (quantidade de extratos com ISPs) presente nas massas não interfere nos teores de PPT e PPNE.

Nas Tabelas 4.1 e 4.2 podem ser observados que os valores de PPT das massas congeladas, elaboradas com extratos das cultivares BRS Guabiju e CD 104, respectivamente, com 8 e 12 mg proteína/100 g massa, não foram diferentes dos valores encontrados para massa fresca. Conforme mencionado, não se pode afirmar que o comportamento destas massas congeladas foi semelhante à fresca, uma vez que pela análise de regressão,

a adição desses extratos não afetou os valores de PPT durante o congelamento. Também para PPNE, os valores observados não permitem qualquer relação entre o comportamento das massas congeladas com e sem extratos de ISPs, frente à amostra fresca. Dessa forma, sugerem-se estudos futuros utilizando outras concentrações de proteínas na elaboração de massas de pão.

Tabela 4.1 – Proteína polimérica total e não extraível das massas de pão tipo francês congeladas utilizando extrato protéico da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera) e da massa fresca sem adição de extrato (controle)

Amostras	PPT ¹	PPNE ²
Controle: Massa fresca sem adição de extrato	47,32 ± 0,41	39,68 ± 0,42
Massa congelada com 0 mg proteína/100 g massa	48,62* ± 0,68	45,41* ± 0,85
Massa congelada com 4 mg proteína/100 g massa	48,46* ± 0,51	41,50* ± 0,58
Massa congelada com 8 mg proteína/100 g massa	48,28 ^{ns} ± 0,68	42,75* ± 0,78
Massa congelada com 12 mg proteína/100 g massa	48,12 ^{ns} ± 0,19	41,75* ± 0,67
Valor de p	0,0283	< 0,001
DMS ³	1,0145	1,3072

¹ PPT: Proteína polimérica total; ² PPNE: Proteína polimérica não extraível;

³ DMS: Diferença mínima significativa para o teste de Dunnett a 5 % de probabilidade.

Tabela 4.2 – Proteína polimérica total e não extraível das massas de pão tipo francês congeladas utilizando extrato protéico da cultivar CD 104 (trigo de inverno) e da massa fresca sem adição de extrato (controle)

Amostras	PPT ¹	PPNE ²
Controle: Massa fresca sem adição de extrato	47,32 ± 0,41	39,68 ± 0,42
Massa congelada com 0 mg proteína/100 g massa	48,62* ± 0,68	45,41* ± 0,85
Massa congelada com 4 mg proteína/100 g massa	48,46* ± 0,29	41,50* ± 0,26
Massa congelada com 8 mg proteína/100 g massa	48,28 ^{ns} ± 0,54	42,75* ± 0,91
Massa congelada com 12 mg proteína/100 g massa	48,12 ^{ns} ± 0,16	41,75* ± 0,66
Valor de p	0,0064	< 0,001
DMS ³	0,8726	1,2885

¹ PPT: Proteína polimérica total; ² PPNE: Proteína polimérica não extraível;

³ DMS: Diferença mínima significativa para o teste de Dunnett a 5 % de probabilidade.

4.4.4 Microestrutura das massas de pão

Foi observada, por microscopia eletrônica de varredura – MEV (500x e 5 000 x de ampliação), que a massa fresca (Fig. 4.9 a e b) apresenta uma estrutura característica, ou seja, a massa é formada por uma matriz contínua

(rede de glúten) onde os grânulos de amido parecem estar dispersos (ROJAS *et al.*, 2000). A desuniformidade observada na rede de glúten na massa congelada, com os grânulos de amido aparentemente menos “ligados” a matriz protéica (Fig. 4.9 c e d) sugere que a cristalização do gelo provocou a ruptura da estrutura do glúten.

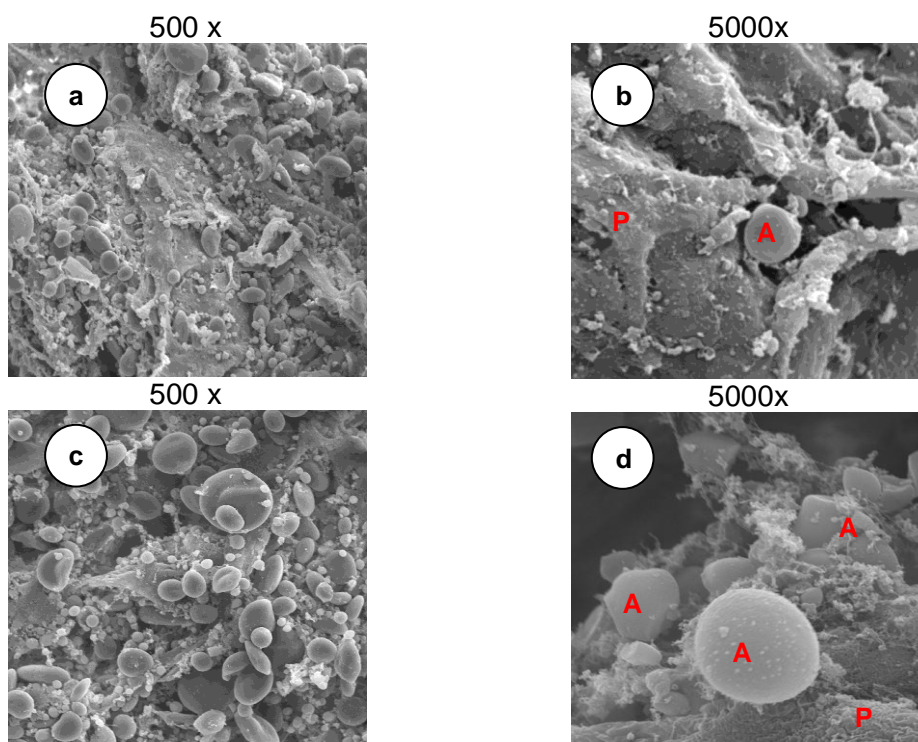


Figura 4.9 – Microscopia eletrônica de varredura da massa de pão tipo francês (a) e (b) fresca e (c) e (d) congelada, ambas sem adição de extrato. P: Matriz protéica; A: Grânulo de amido.

Segundo Kontogiorgos; Goff e Kasapis (2008), a natureza da estrutura do glúten e massa tem sido extensivamente investigada usando microscopia. A utilização da MEV em glúten e massa indicam que as proteínas formam estruturas tridimensionais entrelaçados de características fibrilar numa microescala. Esse apontamentos corroboram as observações feitas na massa fresca sem adição de ISPs.

Num estudo desenvolvido por Ribotta *et al.* (2004) sobre o efeito de emulsificantes e goma guar na micro estrutura de massa de pão congelada, os autores observaram que após 60 dias de estocagem a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, a matriz de glúten ficou bastante danificada na massa (com e sem aditivos). Os fios de glúten apareceram mais porosos, menos uniformes e mais finos. Além

disso, a massa congelada tende a quebrar em pedaços pequenos, talvez, devido ao rompimento do cordão de glúten.

Na Figura 4.10 estão apresentadas as imagens obtidas no MEV para as massas congeladas com adição do extrato protéico da cultivar IPR 89 em três níveis de concentração de proteína. Pode-se notar que o congelamento provocou danos físicos a matriz protéica quando comparada a massa fresca (Fig. 4.9 a e b). No entanto, a matriz protéica se apresentou mais íntegra nas massas congeladas com adição de extrato, principalmente com 4 mg proteína/100 g massa, do que sem adição (Fig. 4.9 c e d).

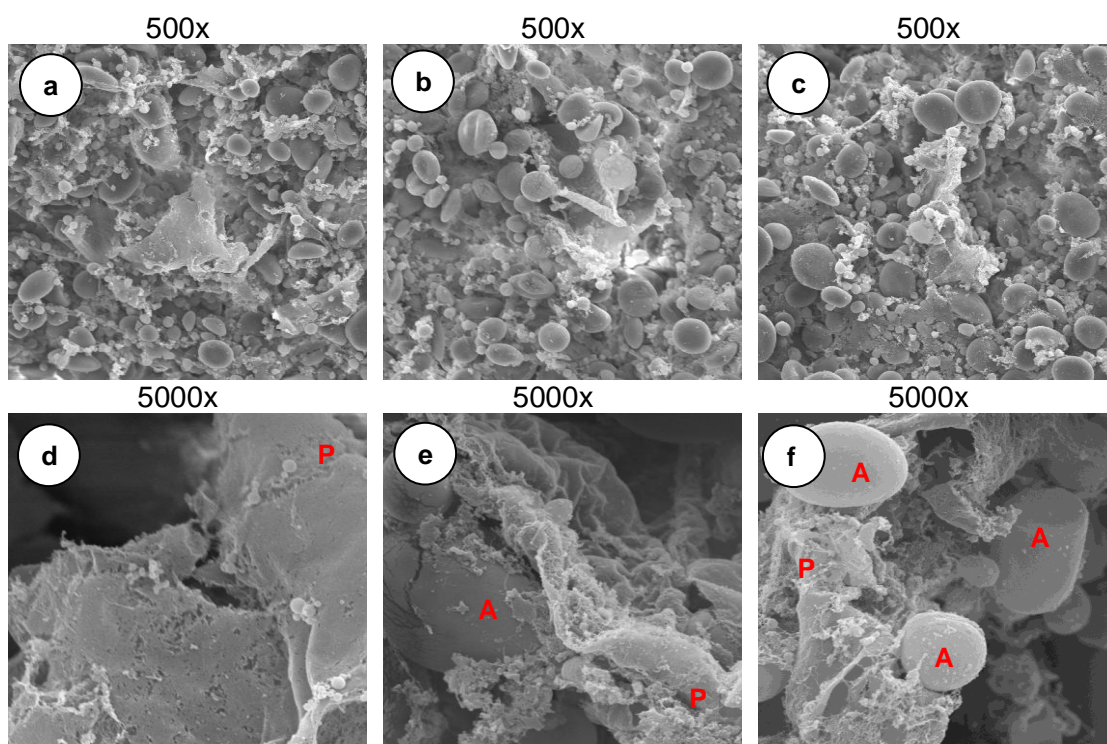


Figura 4.10 – Microscopia eletrônica de varredura (5000x) da massa de pão tipo francês congelada utilizando extrato de ISPs da cultivar IPR 89 (centeio) com (a) e (d) 4 mg proteína/100 g massa; (b) e (e) 8 mg proteína/100 g massa; (c) e (f) 12 mg proteína/100 g massa. P: Matriz protéica; A: Grânulo de amido.

As imagens obtidas para as massas preparadas com o extrato da cultivar BRS Guabiju encontram-se na Figura 4.11. As três concentrações de proteína estudadas proporcionaram maior preservação da rede de glúten após o congelamento em relação a massa congelada sem adição do extrato (Fig. 4.9 c e d). Diferente do observado para o centeio, no entanto, o aumento da concentração de proteína do extrato de trigo de primavera parece melhorar a estrutura do glúten. Nota-se que a massa com 4 mg

proteína/100 g massa apresenta rede de glúten mais fina e menos lisa e que a medida que se aumentou a concentração de proteína do extrato, esta ficou mais uniforme, com uma matriz protéica mais lisa e contínua, envolvendo mais firmemente os grânulos de amido.

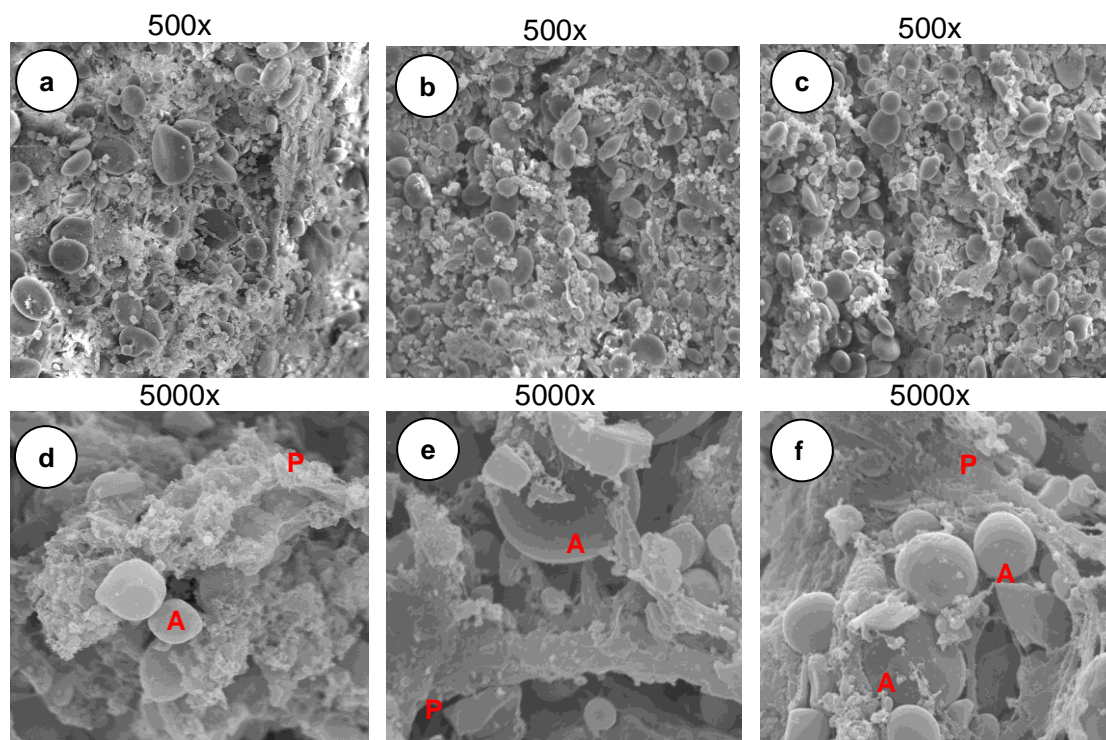


Figura 4.11 – Microscopia eletrônica de varredura da massa de pão tipo francês congelada utilizando extrato de ISPs da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera) com (a) e (d) 4 mg proteína/100 g massa; (b) e (e) 8 mg proteína/100 g massa; (c) e (f) 12 mg proteína/100 g massa. P: Matriz protéica; A: Grânulo de amido.

Comportamento semelhante foi observado para as massas elaboradas com o extrato da cultivar CD 104 (Fig.4.12). A adição de mais extrato à massa promoveu maior proteção na rede de glúten.

Numa avaliação global, tem-se a impressão de que as massas preparadas com o extrato da cultivar BRS Guabiju, mantiveram mais intacta a rede de glúten, sugerindo sua potencial utilização na elaboração de pães congelados.

Berglund, Shelton e Freeman (1991) estudaram o efeito do tempo de congelamento na estrutura da massa de pão e suas conseqüências nas propriedades reológicas no pão depois de assado. Eles verificaram por MEV que a matriz de glúten estava mais rompida e os grânulos de amido e as fibras do glúten ficaram mais finas após 24 semanas de estocagem da

massa sob congelamento. Os autores sugerem que por este motivo, os pães apresentaram uma pequena retenção de gás, ou seja, depois de assado resultaram em baixo volume quando comparados a pão não congelado.

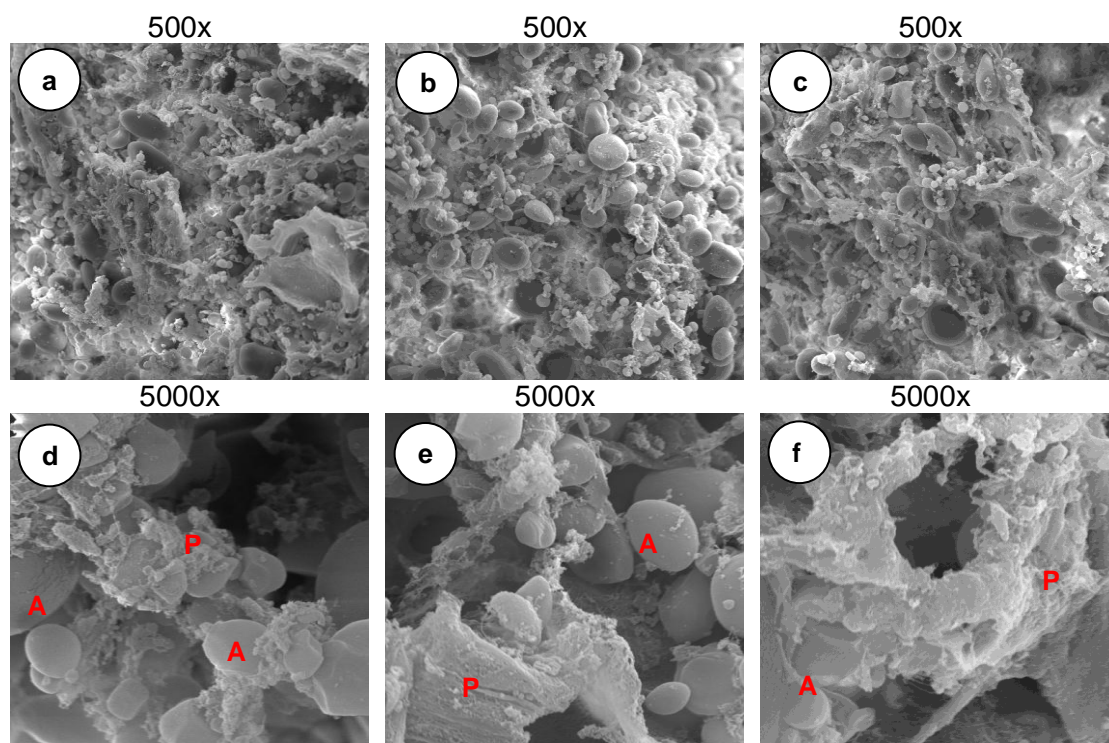


Figura 4.12 – Microscopia eletrônica de varredura da massa de pão tipo francês congelada utilizando extrato de ISPs da cultivar CD 104 (trigo de inverno) com (a) e (d) 4 mg proteína/100 g massa; (b) e (e) 8 mg proteína/100 g massa; (c) e (f) 12 mg proteína/100 g massa; P: Matriz protéica; A: Grânulo de amido.

Em um estudo sobre as propriedades bioquímicas e físicas dos extratos de folha de trigo de inverno aclimatados ao frio, Kontogiorgos *et al.* (2007) sugeriram que os extratos podem ser eficazes na recristalização do gelo, e que mesmo após seu tratamento térmico, mantêm a atividade de ISP. Um estudo anterior sobre o efeito do ISP (0,1 % p/p) sobre a morfologia da rede de glúten hidratado e congelado mostrou que as ISPs são capazes de retardar a recristalização e melhorar as propriedades mecânicas desse sistema (KONTOGIORGOS; GOFF e KASAPIS, 2007).

Kontogiorgos, Goff e Kasapis (2008) investigaram o efeito do envelhecimento e de ISPs, concentradas a partir do extrato de folhas de trigo de inverno aclimatadas, sobre as propriedades físicas da mistura de farinha e água submetidas ao congelamento com uma temperatura constante e com flutuações de temperatura. A análise das microestruturas das massas em MEV, mostraram que após o congelamento houve formação de duas fases

distintas com a matriz glúten-amido homogênea e contínua cercada por áreas irregulares (“vazios”) que supostamente se devem a presença de cristais de gelo ou ar incorporados durante a preparação da massa. Após 30 dias de congelamento, essas áreas se tornaram mais intensas nas amostras sem adição de ISP. A adição de 0,1 % de ISPs proporcionou rendimentos ligeiramente distintos nos padrões de formação e cristalização do gelo com o envelhecimento da massa, embora tenha havido uma descontinuidade da matriz proteína.

4.5 CONCLUSÕES

Os extratos produzidos a partir das cultivares brasileiras de trigo e centeio exibiram atividade de ISPs, uma vez que modificaram a forma dos cristais de gelo. A aplicação do extrato da cultivar de centeio (IRP 89) nas massas de pão provocou uma redução nos teores de PPT e PPNE durante o congelamento, exibindo comportamento semelhante ao de massa fresca. O estudo da microestrutura das massas congeladas permitiu concluir que as massas formuladas com extratos de ISPs, preservaram mais a rede de glúten que a massa sem extrato, após o congelamento. Esses resultados sugerem a viabilidade de aplicação de ISPs em alimentos, uma vez que essas proteínas exibiram um efeito crioprotetor em massas de pão submetidas ao congelamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A caracterização dos extratos de ISPs obtidos das folhas de centeio e das cultivares de trigo aclimatadas ao frio permitiu constatar que diferentes proteínas com propriedades de ISPs são sintetizadas ao longo de sete semanas de cultivo, não tendo sido identificadas em amostras de plantas que cresceram sob condições naturais.

A observação da microestrutura das massas congeladas com e sem adição de extratos de ISPs pela microscopia eletrônica de varredura possibilitou concluir que as ISPs são capazes de preservar a rede de glúten. A aplicação desses extratos mostrou uma tendência em reduzir a perda de água durante os ciclos de congelamento/descongelamento nas massas congeladas. Com estes resultados é possível inferir que a aplicação dessas proteínas pode diminuir os danos físicos causados pelos cristais de gelo formados durante os processos de congelamento.

A diversidade das ISPs e suas várias atividades mostram que essas proteínas são candidatas potenciais para uso na preservação da qualidade dos alimentos durante o armazenamento, refrigeração e congelamento. Mas as concentrações e tipos de ISPs utilizados deverão ser selecionados com cuidado. Será essencial, por exemplo, escolher ISPs que sejam estáveis ao longo da faixa de temperatura utilizada no processamento.

Sugerem-se outros estudos a fim de elucidar os mecanismos de proteção das ISPs contra os danos causados pelo estresse ao frio, como por exemplo:

- Examinar a composição dos extratos quanto a sua atividade de ISP através de outras metodologias e mecanismos, como por exemplo, pela capacidade de nucleação e recristalização do gelo.
- Verificar a composição aminoacídica e a atividade das ISPs após serem isoladas por técnica de eletroforese.
- Identificar a presença de ISPs em extratos de plantas aclimatadas ao frio de outras fontes (cereais e tubérculos), assim como em outras partes da planta (caule e raiz), uma vez que essas proteínas estão presentes em várias partes dos vegetais que são submetidos a situações de estresse pelo frio.

- Adicionar maiores quantidades de extratos de ISPs (relação proteína: massa) e aumentar o número de níveis de proteína, durante a elaboração das massas congeladas para reproduzir resultados mais abrangentes e conclusivos.
- Verificar a estabilidade das ISPs quanto a pH, temperatura e outras condições que reproduzam o processamento de alimentos.
- Aumentar o número de ciclos de congelamento/descongelamento e o número de unidades experimentais para avaliar com maior precisão se há menor sinérese em massas congeladas preparadas com extrato de ISPs.
- Analisar a microestrutura da massa congelada em tempos menores de estocagem como 15, 30, 45 e 60 dias, a fim de obter mais informações quanto ao comportamento da rede de glúten durante a armazenagem.
- Verificar as propriedades tecnológicas e sensoriais nos pães de massas congeladas após assados tais como, características externas (cor da crosta, quebra e simetria) e internas (cor do miolo, estrutura das células do miolo e espessura da crosta), volume específico e textura.
- Realizar ensaios toxicológicos nos extratos de ISPs e nas massas preparadas com eles, a fim de obter subsídios que fundamentem sua utilização no consumo humano.

O isolamento, caracterização e clonagem de um número de ISPs distintas de peixes tornou possível obter grandes quantidades de ISPs e introduzir essas proteínas em alimentos congelados, como sorvetes, por exemplo. O que se espera agora, é que os resultados do presente estudo possam contribuir para divulgar a utilização dessas proteínas de origem vegetal no Brasil, e sugerir novas pesquisas que permitam um melhor entendimento sobre o assunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods**. 10th ed. St. Paul, Minnesota, 2000.

ABIP. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE PANIFICAÇÃO. **Perfil do Setor de Panificação no Brasil**, fevereiro de 2009. Disponível em: http://www.abip.org.br/perfil_internas.aspx?cod=35. Acesso em 24 de fevereiro de 2011.

ANTIKAINEN, M.; GRIFFITH, M. **Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals**. *Physiologia Plantarum*, v.99, p. 423–432, 1997.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**. 16a. ed. 3a. rev. Gaithersburg, MD: AOAC International, 1997.

ATICI, O.; NALBANTOGLU, B. **Antifreeze proteins in higher plants**. *Phytochemistry*, v.64, p.1187–1196, 2003.

AUTIO, K.; SINDA, E. **Frozen doughs: rheological changes on yeast viability**. *Cereal Chemistry*, v.69, n.4, p.409–413, 1992.

BARRET, J. **Thermal hysteresis proteins – Review**. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.33, p.105–117, 2001.

BERGLUND, P.T.; SHELTON, D.R.; FREEMAN, T.P. **Frozen bread dough ultra-structure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycles**. *Cereal Chemistry*, v. 68, n. 1, p. 105–107, 1991.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pão** – RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>. Acesso em 25 de fevereiro de 2011.

CHENG, C.C. **Evolution of the diverse antifreeze proteins**. *Current Opinion in Genetics and Development*, v.8, p.715–721, 1998.

CHUN, J.U.; YU, X.M.; GRIFFITH, M. **Genetic studies of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat**. *Euphytica*, v.102, p. 219–226, 1998.

CLEMMINGS, J.F.; ZOERB, H.F.; ROSENWALD, D.R.; HUANG, V.T. **Method of making frozen compositions**. US Patent 08/472500, 1997.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.. **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining**. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 299–306, 2001.

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

DAVIES, P.L.; SYKEST, B.D. **Antifreeze proteins**. Current Opinion in Structural Biology, v.7, p.828–834, 1997.

EMBRAPA. CNPT – Embrapa Trigo. **Cultura Trigo**. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em 21 de Janeiro de 2011.

FEENEY, R.E.; YEH, Y. **Antifreeze proteins: current status and possible food uses**. Trends in Food Science e Technology, v.9, p.102–106, 1998.

FEENEY, R.E.; YEH, Y. **Antifreeze proteins: properties, mechanism of action, and possible applications**. Food Technology, v.47, p.82–90, 1993.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. **Abscisic acid signaling in seeds and seedlings**. Plant Cell, v.14: (suppl.), p S15–S45, 2002.

FULLINGTON, J.G.; COLE, E.W.; KASARDA, D.D. **Quantitative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins extracted from different wheat varieties: Effect of protein content**. Cereal Chemistry, v.60, p.65–71, 1983.

FUNCK, L.G.; FRANCISCO, A. **Efeitos do congelamento e dos ciclos de gelo-degelo em massas de pão**. Boletim do CEPPA, v. 24, n. 1, p. 163–190, 2006.

GIANIBELLI, M.C.; LARROQUE, O.R.; MACRITCHIE, F.; WRIGLEY, C.W. **Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits**. Cereal Chemistry. v.78, n.6, p. 635–646, 2001.

GRIFFITH, M. **Cold Tolerance in Plants**. US Patent 5.972.679, 1999.

GRIFFITH, M.; ALA, P.; YANG, D.S.C.; HON, W.C.; MOFFATT, B.A. **Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves**. Plant Physiology, v.100, p.593–596, 1992.

GRIFFITH, M.; ANTIKAINEN, M.; HON, W.C.; PIHAKASKI-MAUNSBACH, K.; YU, X.M.; CHUN, J.U.; YANG, D.S.C. **Antifreeze protein in winter rye**. Physiologia Plantarum, v.100, p.327–332, 1997.

GRIFFITH, M; EWART, V. **Antifreeze proteins and their potential use in frozen food**. Biotechnology Advances, v 13, n 3, p 375–402, 1995.

GRIFFITH, M; YAISH, M. **Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities**. Trends in Plant Science, v.9, n 8, 2004.

GUTKOSKI, L.C.; SANTOS, E. **Estudo de formulação na produção de pão francês congelado não fermentado**. Revista Brasileira Agrociência, v.10, n.3, p.347–352, 2004.

- HEW, C.; XIONG, F.; MOFFATT, B.A.; GRIFFITH, M. **Antifreeze proteins, DNA and expression systems**. US Patent WO 99/06565, 1999.
- HON, W.C.; GRIFFITH, M.; CHONG, P.; YANG, D.S.C. **Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins**. *Plant Physiology*, v.109, p.879–889, 1995.
- HON, W.C.; GRIFFITH, M.; MLYNARZ, A., KWOK, Y.C. YANG, D.S.C. **Extraction and Isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves**. *Plant Physiology*, v.104, p.971–980, 1994.
- HOSENEY, R.C. **Principios de ciencia y tecnología de los cereales**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 321p
- JACKMAN, J.; NOESTHEDEN, M.; MOFFAT, D.; PEZACKI, J.P.; FINDLAY, S.; BEN, R.N. **Assessing antifreeze activity of AFGP 8 using domain recognition software**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.354, p.340–344, 2007.
- JUNIOR, A.N.; BAIER, A.C. **Cultivo de centeio**. Embrapa Trigo. Sistema de Produção 1–2^a Ed. 2006. Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Centeio/CultivodeCenteio_2ed/index.htm. Acesso em 08 de janeiro de 2011.
- KENT, N.L. **Technology of cereals; with special reference to wheat**. Oxford: Pergamon Press, 1975. 306p.
- KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.; KASAPIS, S. **Effect of aging and ice structuring proteins on the morphology of frozen hydrated gluten networks**. *Biomacromolecules*, v.8, p.1293–1299, 2007.
- KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.; KASAPIS, S. **Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical properties of frozen flour-water mixtures**. *Food Hydrocolloids*, v.22, p.1135–1147, 2008.
- KONTOGIORGOS, V.; REGAND, A.; YADA, R.Y.; GOFF, H.D. **Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods**. *Journal of food Biochemistry*, v.31, p.139–160, 2007.
- LAEMMLIS, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, v.227, p.680–685, 1970.
- LEE, M.H.; BACK, M.H.; CHA, D.S.; PARK, H.I.; LIM, S.T. **Freeze-thaw stabilization of sweet potato starch gel by polysaccharide gums**. *Food Hydrocolloids*, v. 16, p.345–352, 2002.
- LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. **Abscisic acid signal transduction**. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, v. 49, p. 199–222, 1998.
- LILLFORD, P.J.; HOLT, C.B. **Antifreeze proteins**. *Journal of Food Engineering*, v.22, p.475–482, 1994.

MISHRA, V.; PATTNAIK, P. **Anti-freeze proteins: prospects and perspectives in food sector.** Indian Food Industry, v.18, p. 238–244, 1999.

MODESTO, E.C.; SANTOS, G.T.; FILHO, P.S.V.; ZAMBOM, M.A.; VILELA, D.; JOBIM, C.C.; FARIAS, K.P.; DETMANN, E. **Composição química das folhas de cinco cultivares de mandioca (Manihot esculenta Crantz.) em diferentes épocas de colheita.** XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002, Recife. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/publicacoes/recife-2002/recife-722.pdf>. Acesso em 14 de fevereiro de 2011.

MOSKIN, J. **Sorvete cremoso e mais saudável? Qual é o truque?** In: The New York Times, 2006. Disponível em: http://www.guiavegano.com.br/vegan/index.php?option=com_fireboard&func=view&catid=29&id=546&Itemid=86. Acesso em: 15 de dezembro de 2008.

PAYNE, S.R.; YOUNG, O.A. **Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality.** Meat Science, v.41, p.147–155, 1995.

PIROZI, M.R.; MARGIOTTA, B.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. **Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines.** Journal of Cereal Science, v.48, n.1, p. 117-122, 2008.

PYLER, E.J. **Baking – Science and Technology.** 3.ed. v.II. Kansas: Sosland Publishing Company, 1988. 1346p.

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

RÄSÄNEN, J.; HÄRKÖNEN, H.; AUTIO, K. **Freeze-thaw stability of prefermented frozen lean wheat doughs: effect of flour quality and fermentation time.** Cereal Chemistry, 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.

RIBOTTA, P.D.; PÉREZ, G.T.; LEÓN, A.E.; AÑÓN, M.C. **Effect of emulsifier and guar gum on micro-structural, rheological and baking performance of frozen bread dough.** Food Hydrocolloids, v.18, p.305–313, 2004.

ROJAS, J.A.; ROSELL, C.M.; BENEDITO DE BARBER, C.; PÉREZ-MUNERA, I.; LLUNCH, M.A. **The banking process of wheat rolls followed by cryo scanning electron microscopy.** US Patent WO 99/06565, 2000.

ROMEU, C.C.; TADINI, C.C.; MATUDA, T.T. **Influência do congelamento na estrutura da massa do pão francês.** PIC-EPUSP N°3, 2006.

SANTOS, L. S. **Perfil protéico e qualidade de panificação em linhagens de trigo desenvolvidas para a região do cerrado brasileiro**. 2008. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

SASSAKI, R.M.; MACHADO, E.C. **Trocas gasosas e condutância estomática em duas espécies de trigo em diferentes teores de água no solo**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.34, n.9, p.1571–1579, 1999.

SILVA, E. P.; CUNHA, G.R.; PIRES, J.L.F.; DALMAGO, G.A.; PASINATO, A. **Fatores abióticos envolvidos na tolerância de trigo à geadas**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, n.10, p. 1257–1265, 2008.

SILVA, S.A. CARVALHO, F.I.F.; NEDEL, J.L.; VASCONCELLOS, N.J.S.; CRUZ, P.J.; SIMIONI, D.; SILVA, J.A.G. **Composição de subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW) em trigos portadores do caráter "stay-green"**. Ciência Rural, v. 34, n. 3, p. 679–683, 2004.

SMALLWOOD, K. **Frozen food product**. International Patent nº WO 98/41107: Unilever N.V. Vlaardingen, NL, 1998.

TEDRUS, G.A.S.; ORMENESE, R.C.S.C.; SPERANZA, S.S.; CHANG, Y. K.; BUSTOS, F.M. **Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade de pães**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.1, p. 20–25, 2001.

THOMASHOW, M.F. **Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance**. Plant Physiology, p. 118:1–7, 1998.

WATANABE, E.; BENASSI, V.T. **O uso de massa congelada na produção de pão**. Boletim do CEPPA, v. 18, n.1, p.71–84, 2000.

WRIGLEY, C.W. **Giant proteins with flour power**. Nature. v.38, p.738–739, 1996.

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

YEH, Y.; FENNEY, R.E. **Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function**. Chemical Reviews, v.96, n.2, 1996

ZACHARIASSEN, K.E.; KRISTIANSEN, E. **Ice nucleation and antinucleation in nature**. Cryobiology, v 41, p 257–279, 2000.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L. **Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough**. Food Research International, v.40, p.763–769, 2007.

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

ANEXOS

ANEXO 1: Análises de sólidos totais, proteína e cinzas nos extratos de ISPs das cultivares BRS Guabiju, Ônix, LD 062212, IPR 89, IPR 84 e CD 104 – Capítulo 2.

Tabela A.1 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de sólidos totais nos extratos de ISPs

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	5	0,002493 ^{ns}
Tratamento	1	0,705600 *
Cultivar vs Tratamento	5	0,018247 *

* Significativo a 5 % de probabilidade (p<0,05). Coeficiente de variação: 4,91 %.

Tabela A.2 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de proteína nos extratos de ISPs

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	5	38,453557*
Tratamento	1	522,351025*
Cultivar vs Tratamento	5	23,066805*

* Significativo a 5 % de probabilidade (p<0,05). Coeficiente de variação: 8,74 %.

Tabela A.3 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de cinzas nos extratos de ISPs

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	5	0,263916*
Tratamento	1	60,088336*
Cultivar vs Tratamento	5	0,078409 ^{ns}

* Significativo a 5 % de probabilidade (p<0,05). Coeficiente de variação: 9,92 %.

**ANEXO 2: Identificação e quantificação das proteínas na massa de pão:
Cromatogramas para as massas congeladas elaboradas com adição de
extrato de ISPs – Capítulo 4.**

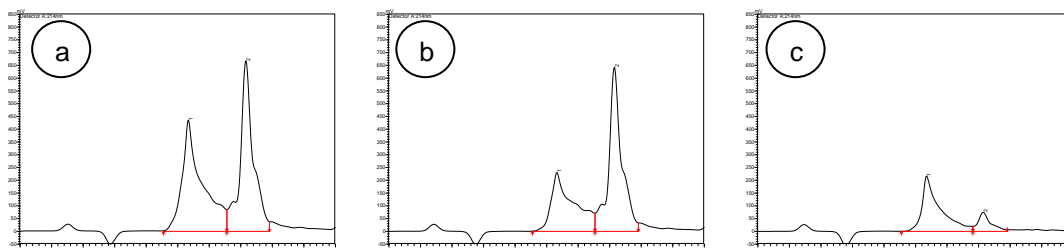


Figura A.1 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar IPR 89 (centeio) ao nível de 4 mg de proteína/100 g massa.

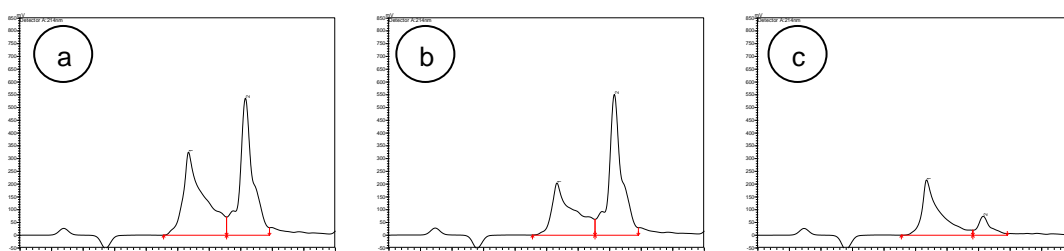


Figura A.2 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar IPR 89 (centeio) ao nível de 8 mg de proteína/100 g massa.

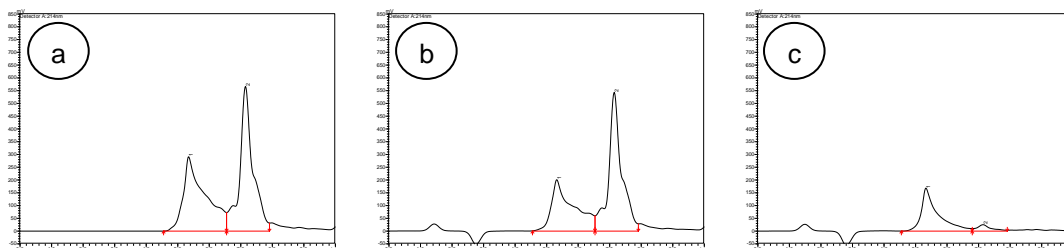


Figura A.3 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar IPR 89 (centeio) ao nível de 12 mg de proteína/100 g massa.

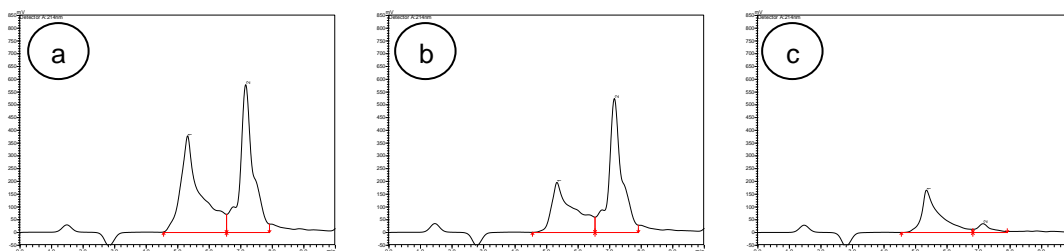


Figura A.4 – Cromatogramas de proteína total – PPT (A), extraível – PPE (B) e não extraível – PPNE (C) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera) ao nível de 4 mg de proteína/100 g massa.

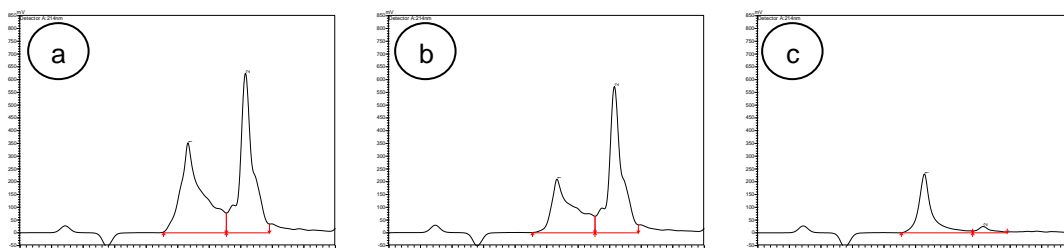


Figura A.5 – Cromatogramas de proteína total – PPT (A), extraível – PPE (B) e não extraível – PPNE (C) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera) ao nível de 8 mg de proteína/100 g massa.

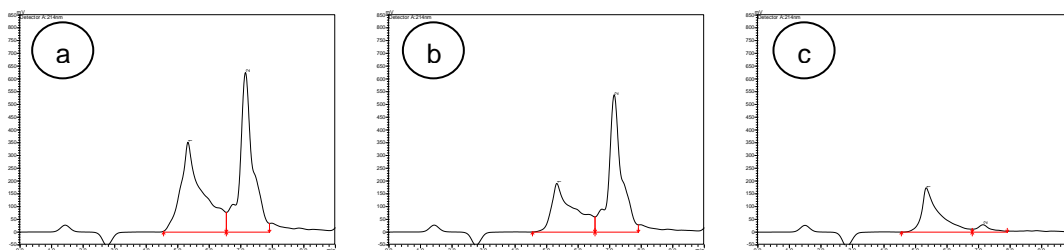


Figura A.6 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PE (b) e não extraível – PNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar BRS Guabiju (trigo de primavera) ao nível de 12 mg de proteína/100 g massa.

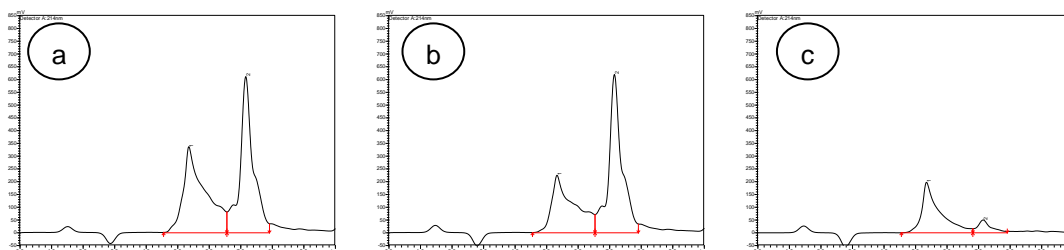


Figura A.7 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar CD 104 (trigo de inverno) ao nível de 4 mg de proteína/100 g massa.

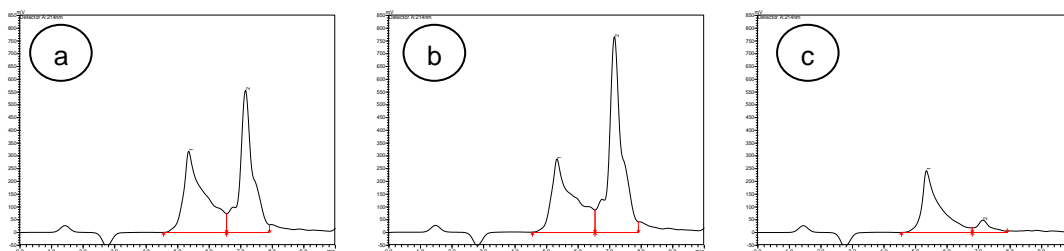


Figura A.8 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar CD 104 (trigo de inverno) ao nível de 8 mg de proteína/100 g massa.

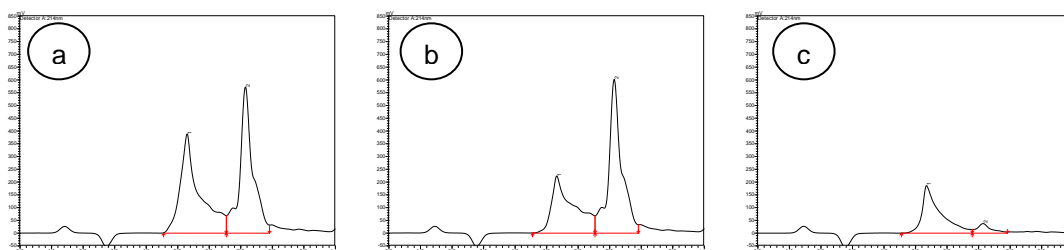


Figura A.9 – Cromatogramas de proteína total – PPT (a), extraível – PPE (b) e não extraível – PPNE (c) da massa congelada de pão tipo francês com adição de extrato da cultivar CD 104 (trigo de inverno) ao nível de 12 mg de proteína/100 g massa.

ANEXO 3: Análises de sólidos totais e proteína nos extratos de ISPs das cultivares BRS Guabiju, CD 104 e IPR 89 – Capítulo 4.

Tabela A.4 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de sólidos totais nos extratos de ISPs

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	2	0,765700 *
Erro puro	9	0,003292
Total	11	

* Significativo a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Coeficiente de variação: 3,63 %.

Tabela A.5 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de proteína nos extratos de ISPs

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	2	27,204233 *
Erro puro	9	3,831744
Total	11	

* Significativo a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Coeficiente de variação: 3,33 %.

ANEXO 4: Testes de ajustamento do modelo linear para os valores de PPT e PPNE das massas congeladas com adição de extrato de ISPs da cultivar IPR 89 – Capítulo 4.

Tabela A.6 – Resultado do teste de ajustamento do modelo linear para as coordenadas teor de proteína total (mg proteína/100g massa) e proteína polimérica total (PPT) em massas congeladas com adição do extrato da cultivar IPR 89 aclimatada ao frio

Modelo	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	(R²)¹
Linear	1	4,2874	0,9074
Resíduo de regressão	14	0,4827	
Falta de Ajuste	2	0,2187	
Erro puro	12	0,2640	

¹ Coeficiente de determinação = Soma de quadrados da regressão/Soma de quadrados do tratamento.

Tabela A.7 – Resultado do teste de ajustamento do modelo linear para as coordenadas teor de proteína total (mg proteína/100g massa) e proteína polimérica não extraível (PPNE) em massas congeladas com adição do extrato da cultivar IPR 89 aclimatada ao frio

Modelo	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	(R²)¹
Linear	1	19,8702	0,9378
Resíduo de regressão	14	1,0815	
Falta de Ajuste	2	0,6590	
Erro puro	12	0,4225	

¹ Coeficiente de determinação = Soma de quadrados da regressão/Soma de quadrados do tratamento.

ANEXO 5: Teor de proteína polimérica total (PPT) e proteína polimérica não extraível (PPNE) em massas congeladas com adição dos extratos das cultivares BRS Guabiju, CD 104 e IPR 89 aclimatadas ao frio – Capítulo 4.

Tabela A.8 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de PPT e PPNE no extrato da cultivar BRS Guabiju

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
PPT	4	1,014343 *
Erro puro	15	0,276702
Total	19	
PPNE	4	17,690680 *
Erro puro	15	0,459400
Total	19	

* Significativo a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Coeficiente de variação: PPT: 1,09 %; PPNE: 1,61 %

Tabela A.9 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de PPT e PPNE no extrato da cultivar CD 104.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
PPT	4	1,120433 *
Erro puro	15	0,204702
Total	19	
PPNE	4	18,466595 *
Erro puro	15	0,446387
Total	19	

* Significativo a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Coeficiente de variação: PPT: 0,94 %; PPNE: 1,56 %

Tabela A.10 – Resumo do quadro de análise de variância para o teor de PPT e PPNE no extrato da cultivar IPR 89.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
PPT	4	1,439988 *
Erro puro	15	0,245562
Total	19	
PPNE	4	20,145020 *
Erro puro	15	0,373038
Total	19	

* Significativo a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Coeficiente de variação: PPT: 1,04 %; PPNE: 1,42 %