

R: Cristóvão Colombo, 2265 – Jd. Nazareth CEP: 15054-000 – FONE (017) 32212250 – FAX
(017) 32212299 – S. J. Rio Preto – SP.

Ana Karla Rebes Gonçalves

**Efeito da adição de CGTase e β -ciclodextrina na qualidade e taxa de
envelhecimento de pães**

São José do Rio Preto
2013

Ana Karla Rebes Gonçalves

Efeito da adição de CGTase e β -ciclodextrina na qualidade e taxa de
envelhecimento de pães

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Heloíza Ferreira Alves do Prado.

São José do Rio Preto
2013

Gonçalves, Ana Karla Rebes.

Efeito da adição de CGTase e β -ciclodextrina na qualidade e taxa de envelhecimento de pães / Ana Karla Rebes Gonçalves. -- São José do Rio Preto, 2013

76 f. : il., tabs.

Orientador: Célia Maria Landi Franco

Coorientador: Heloíza Ferreira Alves do Prado

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Pão – Armazenamento. 3. Alimentos - Conservação. 4. Beta-ciclodextrinas. I. Franco, Célia Maria Landi. II. Prado, Heloíza Ferreira Alves do. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 664.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Ana Karla Rebes Gonçalves

Efeito da adição de CGTase e β -ciclodextrina na qualidade e taxa de
envelhecimento de pães.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração
– Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
São José do Rio Preto.

Comissão examinadora

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco.
UNESP – São José do Rio Preto – SP.
Orientadora.

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Conti e Silva.
UNESP – São José do Rio Preto – SP.

Prof^a. Dr^a. Caroline Joy Steel.
UNICAMP – Campinas – SP.

São José do Rio Preto
29 de novembro de 2013

Dedico

Aos meus pais, Ana Maria e Carlos

Aos meus irmãos, Evelyn e Carlos Murilo

Ao meu namorado, Otávio

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a minha família pelo incentivo, pelo amor, pela paciência e por estarem ao meu lado em todas as minhas decisões.

À Prof^a Dr^a Célia Maria Landi Franco pela oportunidade, pela compreensão, paciência e, principalmente, por todo o aprendizado que adquiri nesses anos de trabalho.

À Prof^a Dr^a Heloíza Ferreira Alves do Prado, pelos esclarecimentos e co-orientação no trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Roberto da Silva por ter permitido a realização de trabalhos em seu laboratório.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Ginaldo, Alana, Luiz e Tânia pela ajuda.

À amizade sincera dos meus companheiros de laboratório, Mariana, Marina, Jefferson, Pedro Lucas e Diego.

Aos meus amigos verdadeiros, que sempre me apoiaram, Monique, André, Juliana Ferreira, Mônica e Juliana Takeda.

Ao meu namorado Otávio Laraia Capusso por ter me apoiado e me dado forças para nunca desistir dos meus sonhos, por me lembrar todos os dias que eu sou capaz.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro à pesquisa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIACÕES	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVO	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 ENVELHECIMENTO DO PÃO.....	9
3.2 FARINHA DE TRIGO.....	12
3.2.1 Amido.....	13
3.2.2 Amilases	16
3.2.3 Proteínas	16
3.2.4 Polissacarídeos não-amiláceos	18
3.3 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM PÃES	19
3.4 CICLODEXTRINAS.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 MATERIAL	25
4.2 MÉTODOS	25
4.2.1 Produção da enzima CGTase	25
4.2.2 Atividade enzimática	25
4.2.3 Determinação de proteína dos extratos enzimáticos.....	26
4.2.4 Caracterização da farinha de trigo.....	26
4.2.4.1 Composição química da farinha de trigo.....	26
4.2.4.2 Propriedades reológicas e térmicas da farinha de trigo	27
4.2.4.2.1 Propriedades farinográficas da farinha de trigo	27
4.2.4.2.2 Propriedades extensográficas da farinha de trigo.....	27
4.2.4.2.3 Propriedades de pasta da farinha de trigo.....	27
4.2.4.2.4 Propriedades térmicas da farinha de trigo	27
4.2.5 Produção do pão.....	28

4.2.6 Avaliação tecnológica.....	29
4.2.6.1 Avaliação do volume e pH da massa	29
4.2.6.2 Avaliação do volume específico dos pães.....	29
4.2.7 Estudo do envelhecimento dos pães.....	29
4.2.7.1 Umidade do miolo e da crosta dos pães.....	29
4.2.7.2 Atividade de água do miolo dos pães.....	30
4.2.7.3 Análise de cor do miolo dos pães	30
4.2.7.4 Avaliação da firmeza do miolo do pão	30
4.2.7.5 Análise térmica do miolo dos pães	30
4.2.7.6 Difracção de raios-X do miolo dos pães	31
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	31
4.4 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
5.1 PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA CGTASE	32
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE TRIGO.....	33
5.2.1 Composição química da farinha de trigo.....	33
5.3 EFEITO DA CGTASE NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DA FARINHA DE TRIGO, QUALIDADE E TAXA DE ENVELHECIMENTO DE PÃES	34
5.3.1 Propriedades farinográficas e extensográficas da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase.....	34
5.3.2 Propriedades de pasta da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase	35
5.3.3 Propriedades térmicas da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase.....	37
5.3.4 Avaliação tecnológica.....	39
5.3.4.1 Avaliação do volume e pH das massas dos pães controle e adicionadas de CGTase	39
5.3.4.2 Avaliação do volume específico dos pães controle e adicionados de CGTase.....	40
5.3.5 Estudo do envelhecimento dos pães controle e adicionadas de CGTase.....	41
5.3.5.1 Umidade e atividade de água dos pães controle e adicionados de CGTase	41
5.3.5.2 Avaliação da firmeza do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase	44
5.3.5.3 Análise térmica do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase	46
5.3.5.4 Difracção de raios-X do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase	47
5.3.5.5 Análise de cor do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase.....	49
5.4 EFEITO DA BCD NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DA FARINHA DE TRIGO, QUALIDADE E TAXA DE ENVELHECIMENTO DE PÃES	51
5.4.1 Propriedades farinográficas e extensográficas da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD	51
5.4.2 Propriedades de pasta da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD.....	52
5.4.3 Propriedades térmicas da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD	53
5.4.4 Avaliação tecnológica.....	55
5.4.4.1 Avaliação do volume e pH das massas dos pães controle e adicionados de β CD	55
5.4.4.2 Avaliação do volume específico dos pães controle e adicionados de β CD.....	56
5.4.5 Estudo do envelhecimento dos pães controle e adicionados de β CD.....	57
5.4.5.1 Umidade e atividade de água dos pães controle e adicionados de β CD	57
5.4.5.2 Avaliação da firmeza do miolo dos pães controle e adicionados de β CD.....	60
5.4.5.3 Análise térmica do miolo dos pães controle e adicionados de β CD	62

5.4.5.4 Difrração de raios-X do miolo dos pães controle e adicionados de β CD	63
5.4.5.5 Análise de cor do miolo dos pães controle e adicionados de β CD	64
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando a estrutura molecular. Fonte: ZOBEL; KULP, 1996.</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2: Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando as ligações entre o amido remanescente e o glúten. Fonte: MARTIN, ZELEZNAK, HOSENEY, 1991.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3: Representação esquemática da amilose e da amilopectina. Fonte: GOESAERT et al., 2005.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4: Representação esquemática da gelatinização e da retrogradação do amido (I) Grânulos de amido nativo; (IIa) Inchamento dos grânulos; (IIb) amilose lixiviada e rompimento dos grânulos; (IIIa) Retrogradação da amilose; (IIIb) Retrogradação da amilopectina. Fonte: GOESAERT et al., 2005.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 5: Representação esquemática da estrutura do glúten. Fonte: BOBBIO; BOBBIO, 2001.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 6: Estrutura e dimensões moleculares das ciclodextrinas. Fonte: SZENTLI, 1990.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7: Formação esquemática da formação de complexos de inclusão. Os círculos pequenos representam moléculas de água, quando são repelidas tanto pela molécula orgânica quanto pela cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Fonte: SZEJTLI, 1997.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 8: Vista da conformação pré-otimizada de duas frações de amilose com uma molécula de βCD ao longo do eixo z (a) e do eixo x (b). Fonte: TIAN et al. 2009a.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 9: Firmeza (N) do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (5, 10 e 20 U/100g de farinha), frescos e armazenados por até 15 dias. Valores seguidos pela mesma letra minúscula no mesmo tempo de armazenamento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).</i>	<i>45</i>
<i>Figura 10: Padrão de difracção de raios-X do miolo de pães controle e adicionados de 5 U de CGTase e armazenados por 3 dias.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 11: Firmeza (N) do miolo dos pães controle e adicionados de 0,25, 0,5 e 1,0 % βCD, frescos e armazenados por 15 dias. Valores seguidos pela mesma letra minúscula no mesmo tempo de armazenamento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).</i>	<i>61</i>
<i>Figura 12: Padrão de difracção de raios-X do miolo de pães controle e adicionados de 1% de βCD e armazenados por 7 dias.....</i>	<i>64</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Volume, teor protéico e atividades dextrinizante e de fenoltaleína dos extratos de enzima bruto e concentrado produzidos a partir da bactéria Bacillus clausii E16.</i>	32
<i>Tabela 2: Composição química da farinha de trigo¹</i>	33
<i>Tabela 3: Propriedades farinográficas e extensográficas (135 min) da farinha de trigo controle e adicionada de 5, 10 ou 20 U/100g de farinha de CGTase (n = 1).</i>	34
<i>Tabela 4: Propriedades de pasta da farinha de trigo sem e com CGTase (U/100g farinha).</i>	36
<i>Tabela 5: Propriedades térmicas de gelatinização da farinha de trigo e do complexo amilose-lipídeo sem e com CGTase (U/100g farinha).</i>	37
<i>Tabela 6: Propriedades térmicas de retrogradação da farinha de trigo* e do complexo amilose-lipídeo sem e com CGTase (U/100 g farinha).</i>	38
<i>Tabela 7: pH da massa antes e depois da fermentação, volume da massa do pão controle e adicionada de CGTase (U/100g farinha).</i>	40
<i>Tabela 8: Volume específico dos pães controle adicionados de CGTase (U/100g farinha) .</i>	40
<i>Tabela 9: Teor de umidade do miolo e da crosta dos pães controle e adicionados de CGTase (U/100g farinha) durante armazenamento.</i>	43
<i>Tabela 10: Atividade de água do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (U/100 g farinha) durante armazenamento.</i>	44
<i>Tabela 11: Variação da entalpia de retrogradação do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (U/ 100 g farinha) durante armazenamento.</i>	46
<i>Tabela 12: Parâmetros de cor instrumental do miolo dos pães* controle e adicionados de CGTase (U/ 100 g farinha).</i>	50
<i>Tabela 13: Parâmetros farinográficos e extensográficos (135 min) da farinha de trigo controle e adicionada de 0,25, 0,5 e 1,0 % de βCD.</i>	51
<i>Tabela 14: Propriedades de pasta da farinha de trigo* sem e com βCD.</i>	52
<i>Tabela 15: Propriedades térmicas de gelatinização da farinha de trigo e do complexo amilose-lipídeo sem e com βCD.</i>	54
<i>Tabela 16: Propriedades térmicas de retrogradação da farinha de trigo e do complexo amilose-lipídeo sem e com βCD.</i>	55
<i>Tabela 17: pH da massa antes e depois da fermentação e volume da massa de pão controle e adicionados de βCD.</i>	56
<i>Tabela 18: Volume específico dos pães controle e adicionados de βCD.</i>	56
<i>Tabela 19: Teor de umidade do miolo e da crosta dos pães controle e adicionados de βCD durante armazenamento refrigerado por 15 dias.</i>	58
<i>Tabela 20: Atividade de água do miolo dos pães controle e adicionados de βCD durante armazenamento refrigerado por 15 dias.</i>	59

<i>Tabela 21: Variação da entalpia de retrogradação do miolo dos pães controle e adicionados de βCD, durante armazenamento refrigerado por 15 dias.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 22: Parâmetros de cor instrumental do miolo do pão sem e com βCD durante armazenamento refrigerado por até 15 dias.</i>	<i>66</i>

LISTA DE ABREVIACES

AG	Arabinoglucanas
A _w	Atividade de gua
AX	Arabinoxilanas
CD	Ciclodextrina
CGTase	Ciclodextrina Glycosiltransferase
DSC	Calorímetro diferencial de varredura
E	Extensibilidade
FN	Falling number
GU	Glúten mido
ITM	ndice de tolerância  mistura
R	Resistência  extensão - Elasticidade
RVA	Rápido viscoanalisador
UB	Unidades Brabender
W	Energia de deformao da massa
WE-AX	Arabinoxilanas extraídas com gua
WE-AX	Arabinoxilanas não extraídas com gua
α CD	α -Ciclodextrina
β CD	β -Ciclodextrina
γ CD	γ -Ciclodextrina
ΔH	Variao da entalpia
ΔT	Faixa de temperatura de gelatinizao

RESUMO

Neste estudo o efeito da CGTase e da β CD nas características reológicas da farinha, na qualidade e no processo de envelhecimento do pão foi investigado. As propriedades farinográficas, extensográficas, viscográficas e térmicas na presença de diferentes concentrações de CGTase (0, 5, 10 e 20 U) e de β CD (0, 0,25, 0,5, 1,0 %) foram analisadas. Pães foram produzidos sem e com CGTase ou β CD e seu volume específico determinado por deslocamento de sementes. Os pães foram armazenados a 5 °C por 15 dias e neste período foram avaliados quanto à umidade, atividade de água, firmeza, retrogradação, cor e difracção de raios-X. A absorção de água da farinha contendo 5U e 10U de CGTase aumentou de 56,5 para 59 %. A elasticidade, o tempo de desenvolvimento e a estabilidade aumentaram, enquanto o índice de tolerância à mistura (ITM) reduziu para todas as amostras contendo CGTase, quando comparadas ao controle. A adição de 5 e 10U de CGTase aumentou o *setback* e reduziu a viscosidade final, enquanto que a presença de 20U de CGTase reduziu as viscosidades de pico e final e o *setback*. A faixa de temperatura de gelatinização (ΔT) do amido presente na farinha de trigo (13,15 °C) e a variação de entalpia (ΔH) foram reduzidas na presença de CGTase, independente da concentração utilizada. O volume específico do pão aumentou 11 % quando 5U de CGTase foi utilizada. A adição de CGTase aumentou significativamente a umidade do miolo dos pães frescos e melhorou a retenção de água do miolo dos pães até o sétimo dia de armazenamento. A firmeza e o ΔH do miolo aumentaram gradualmente para todas as amostras durante o armazenamento, mas a adição de 5U de CGTase reduziu o ΔH até o 3º dia de armazenamento e reduziu a firmeza dos pães frescos em 40 %, quando comparados ao controle. A absorção de água, os tempos de desenvolvimento e de estabilidade não foram afetados pela adição de 0,25 e 0,5 % de β CD. No entanto, a presença de 1,0 % de β CD aumentou a absorção de água e reduziu o tempo de desenvolvimento e a estabilidade da farinha. O ITM aumentou para as amostras contendo β CD, independente da concentração, quando comparadas ao controle. Todas as amostras contendo β CD tiveram sua elasticidade aumentada. A adição de 0,25 % de β CD aumentou o *setback* e reduziu a viscosidade final. A presença de 1,0 % de β CD aumentou a viscosidade de pico e reduziu o *setback*. O ΔT do amido presente na farinha de trigo não foi alterado com a adição de β CD, contudo houve redução significativa no ΔH , independente da concentração de β CD. O volume específico do pão aumentou 9 % quando 1,0 % de β CD foi adicionado. O conteúdo de umidade e a atividade de água do miolo dos pães frescos aumentaram

significativamente com a adição de β CD, independente da concentração utilizada. A presença de 0,25 e 0,5 % de β CD não afetou o ΔH , mas pães contendo 1,0 % de β CD apresentaram aumento significativo no ΔH até o 5º dia de armazenamento. A presença de 1,0 % de β CD reduziu a firmeza do miolo dos pães durante o armazenamento, enquanto que a adição de 0,5 % reduziu a firmeza até 7º dia, quando comparados com o controle. No entanto, a adição de 0,25 % de β CD aumentou a firmeza do miolo dos pães, quando comparados com o controle. Após este período não houve diferença significativa nos valores de ΔH entre as amostras controle e adicionadas de β CD, independente da concentração. De um modo geral, a CGTase e a β CD apresentaram um efeito positivo na qualidade e no processo de envelhecimento dos pães. No entanto, o envelhecimento dos pães pode não estar relacionado apenas à retrogradação da amilopectina, mas outros fatores como distribuição de água no sistema e interações entre moléculas de amido e proteína também podem estar envolvidas neste processo.

Palavras-chave: pão, firmeza, volume, armazenamento, retrogradação.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the effect of CGTase and β CD on the rheological properties of the wheat flour, and quality and staling rate of the bread. The farinographic, extensographic, pasting, and thermal properties of the flour without (control) and with different concentrations of CGTase (0, 5, 10 and 20 U) or β CD (0, 0.25, 0.5, 1.0 % m/m) were analyzed. Breads were produced with and without β CD or CGTase and their specific volume were determined by seed displacement. Breads were stored at 5 °C for 15 days and during this period were evaluated for moisture and water activity, firmness, retrogradation, color and X-ray diffraction. The water absorption of the flour containing 5 and 10U CGTase increased from 56.5 to 59 %. The elasticity, development time and stability increased while the mixing tolerance index (ITM) reduced for flour containing CGTase, as compared to control. The addition of 5 and 10U of CGTase increased setback and reduced final viscosity whereas the presence of 20U CGTase reduced the peak and final viscosities and setback. The range of the gelatinization temperature (ΔT) of the starch present in the flour (13.15 °C) and enthalpy change (ΔH) were reduced in the presence of CGTase. The specific volume of bread increased 11 % when 5U CGTase was used. The addition of CGTase significantly increased crumb moisture of the fresh bread and improved water retention of the bread crumb until the seventh day of storage. The firmness and ΔH of the bread crumb gradually increased for all samples during storage, but the addition of 5U CGTase reduced the ΔH until the 3rd day of storage and reduced 40% of the firmness when compared to the control. The water absorption, development time and stability were not affected by the addition of 0.25 and 0.5 % β CD. However, the presence of 1.0 % β CD increased water absorption and reduced development time and stability of the flour. The ITM increased for samples containing β CD independent of concentration as compared to control. All samples containing β CD had their elasticity increased. The addition of 0.25 % β CD increased setback and reduced final viscosity. The presence of 1.0 % β CD increased the peak viscosity and reduced setback. ΔT of the starch was not altered by the addition of β CD, however, significant reduction in ΔH , independent of concentration of β CD was observed. The specific volume of bread increased 9 % when 1.0 % β CD was added. The moisture content and water activity of the bread crumb increased with the addition of β CD, independent of concentration. The presence of 0.25 and 0.5% β CD did not affect the ΔH , but breads containing 1.0 % β CD showed a significant increase in ΔH until the 5th day of storage. After this period there was

no significant difference in the values of ΔH between the control sample and added βCD , independent of concentration. CGTase and βCD showed a positive effect on the quality and staling of bread. However, the aging of bread may not be related only to the retrogradation of amylopectin, but other factors such as water distribution and the interactions between protein and starch molecules may also be involved in this process.

Keywords: bread, firmness, volume, storage, retrogradation.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de panificação passou por uma revolução nos últimos 150 anos. Diferentes tecnologias de panificação têm sido desenvolvidas para responder melhor às novas exigências do mercado, do mesmo modo que novos ingredientes têm sido introduzidos na fabricação de pães. A melhoria contínua na tecnologia de panificação tem sido investigada, principalmente, para melhorar a qualidade e o valor nutricional do produto.

O envelhecimento do pão é um processo complexo e ainda não entendido completamente que se inicia logo após o forneamento, com alterações nos pães que incluem aumento da umidade da crosta (perda da crocância), cristalinidade do amido e firmeza do miolo; perda das propriedades sensoriais (aroma e sabor) do pão e da capacidade de hidratação do miolo. Vários ingredientes, equipamentos e processos industriais têm sido utilizados para minimizar perdas resultantes do endurecimento, esfarelamento e alterações de sabor com o armazenamento de pães.

Estudos mostram que, atualmente, as enzimas são muito usadas em panificação por serem capazes de preservar o frescor e a cor do miolo do pão, aperfeiçoar propriedades de elasticidade, extensibilidade e tolerância da massa, aumentar o volume do pão e, desta forma, aumentar a vida de prateleira sem comprometer a qualidade do produto final. As enzimas produzem precursores direta ou indiretamente envolvidos no processo de formação de aromas, enquanto que a fermentação promovida pelas leveduras é responsável pela formação de álcoois, ácidos e ésteres. Além disso, as enzimas são alternativas seguras aos compostos químicos, pois são proteínas capazes de catalisar reações químicas, não apresentando efeitos negativos sobre a saúde associados ao seu consumo excessivo, sendo desnaturadas durante o forneamento e, portanto, não são detectadas no produto final.

Dentre as enzimas utilizadas para melhorar as características de qualidade de pães, as transglutaminases, amilases, ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), xilanases, proteases e hemicelulases têm sido utilizadas.

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é a única enzima capaz de converter o amido e seus substratos em ciclodextrinas. O efeito antienvelhecimento da CGTase pode ser atribuído à hidrólise suficiente do amido evitando a cristalização da amilopectina. As ciclodextrinas liberadas pela ação da CGTase podem formar complexos com lipídeos, presentes na farinha, diminuindo a retrogradação da amilose. Alternativamente, podem, ainda, interferir nas interações amido-glúten, que também são apontadas como responsáveis pelo envelhecimento do pão.

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por 6, 7 ou 8 ligações α -(1-4), chamadas de α CD, β CD e γ CD, respectivamente. Todas as CGTases produzem uma mistura de α , β e γ -ciclodextrinas por meio da reação de ciclização. A produção de diferentes ciclodextrinas e suas proporções depende das condições de reação e principalmente da fonte microbiana da enzima.

Entre os três tipos de ciclodextrinas, a β CD é a de maior interesse devido ao tamanho da sua cavidade apolar. Os resíduos de glicose no anel são organizados em uma cavidade interna hidrofóbica e uma região externa hidrofílica. Isto permite que as ciclodextrinas formem complexos de inclusão com diversas moléculas orgânicas e inorgânicas, tais como compostos aromáticos e medicamentos. Este fenômeno provoca mudanças nas propriedades físicas e químicas das moléculas como a estabilização de componentes voláteis, melhoria da solubilidade, melhoria de odores e sabores. Essas interações, em indústrias alimentícias, levaram à remoção de colesterol em cremes, redução de sabores indesejáveis e também à extensão da vida útil de alimentos, exceto a contaminação microbiológica.

As β CDs modificam as propriedades físico-químicas de amidos. Estudos mostram que a β CD aumenta o fator de expansão, a solubilidade, a lixiviação da amilose e a viscosidade do amido de trigo devido à ruptura de complexos amilose-lipídio presentes neste amido. A desestabilização do complexo amilose-lipídeo sugere que a β CD pode produzir outro complexo amilose-lipídeo- β CD, quando interage com o lipídio e amido, o que pode trazer benefícios para os produtos de panificação.

Assim, esforços têm sido feitos no sentido de minimizar os efeitos negativos do processo de envelhecimento, visando diminuir as perdas causadas durante o armazenamento dos pães, mas os efeitos da CGTase e da β CD na fabricação de pães ainda são inconclusivos, no que diz respeito ao melhoramento da qualidade da massa e ao processo de envelhecimento durante o armazenamento.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi analisar o efeito da adição de CGTase e de β CD na qualidade tecnológica e taxa de envelhecimento dos pães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da adição da CGTase e da β CD, em diferentes concentrações, nas propriedades térmicas e reológicas da farinha de trigo;
- Analisar o efeito da adição de CGTase e da β CD, em diferentes concentrações, no volume e pH da massa dos pães e no volume específico dos pães;
- Analisar o efeito da adição de CGTase e da β CD, em diferentes concentrações, na taxa de envelhecimento dos pães.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENVELHECIMENTO DO PÃO

O pão é um dos alimentos mais consumidos na dieta humana e pode ser definido como um produto perecível resultante do cozimento de uma massa obtida pela mistura de farinha de trigo, água potável e sal comestível (cloreto de sódio) fermentada por espécies de microrganismos próprios da fermentação do pão (HOSENEY, 1991). Além do seu aspecto apetitoso, o pão apresenta importante valor nutricional, uma vez que é fonte de carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais (CAUVAIN; YOUNG, 2009). Outros ingredientes como gordura, enzimas exógenas, melhoradores, emulsificantes, leite e outros produtos lácteos, além de glúten podem ser adicionados (HOSENEY, 1991). Outros tipos de farinha também podem ser utilizados na produção de pão, como farinha de centeio, farinha de trigo integral, farinha de glúten, entre outras (BRASIL, 2000).

A qualidade sensorial é um critério fundamental para aceitação de produtos de panificação (JENSEN et al., 2011). Geralmente, as técnicas para avaliação da qualidade do pão se ajustam a três categorias: características externas, nas quais estão incluídas as dimensões, o volume, a aparência, a cor e a formação da casca do produto; características internas, que se limitam ao tamanho, à quantidade e à distribuição das células do miolo (granulação) e à cor do miolo; e qualidade de textura/sensorial e sabor, que se refere à avaliação da textura do miolo do pão, voltada para as suas propriedades mecânicas, como firmeza e resiliência, e análise de sabor baseada em avaliações subjetivas de indivíduos ou grupos (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

O envelhecimento se inicia logo após o forneamento, com uma série de mudanças que levam a redução gradual da qualidade do pão. Essas mudanças incluem todos os processos que ocorrem durante a estocagem exceto a contaminação microbiológica. O consumidor detecta o envelhecimento sensorial, pelas mudanças na textura, no aroma e no sabor (ELIASSON; LARSSON, 1993). As perdas resultantes do envelhecimento do pão têm grande importância econômica, principalmente sob condições de produção industrializada. Assim, muitas iniciativas de pesquisa estão sendo empreendidas para a compreensão dos mecanismos pelos quais certos grupos de ingredientes retardam o processo de envelhecimento ou reduzem ao mínimo o seu efeito (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

O envelhecimento do pão é associado principalmente à firmeza do miolo. Em geral, no armazenamento, o miolo se torna seco, farelento e mais duro. Frequentemente, essas modificações são atribuídas somente ao ressecamento do miolo. No entanto, o mecanismo de

aumento da firmeza do miolo durante o armazenamento é muito mais do que uma simples redistribuição da umidade do miolo para a casca. O processo geral de envelhecimento é parte principalmente de dois subprocessos distintos: o efeito da firmeza causado pela transferência de umidade do miolo para a casca, e a firmeza intrínseca do material da parede celular, que está associada à recristalização do amido durante o armazenamento (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

Há concordância entre os autores de que o envelhecimento do pão é um processo complexo e ainda não entendido completamente. Muitos modelos têm sido propostos para explicar esse fenômeno.

A retrogradação do amido é um processo em que as moléculas gelatinizadas do amido se reassociam, formando uma estrutura cristalina de dupla hélice (CAUVAIN; YOUNG, 2009). No pão a retrogradação da amilose ocorre nas primeiras horas após o forneamento. A retrogradação da amilopectina ocorre em longo prazo e parece ser um dos principais fenômenos responsável pela firmeza do miolo durante o armazenamento (RIBOTTA; BAIL, 2007).

Zobel e Kulp (1996) propuseram um modelo para o envelhecimento do pão, que enfatizava o papel do amido. Na massa, a amilopectina existe na sua forma cristalina dentro do grânulo. Durante o processo de panificação, mais especificamente durante a etapa de forneamento, a cristalinidade da amilopectina é perdida em função da gelatinização do grânulo de amido. Com o intumescimento do grânulo de amido, as moléculas de amilopectina têm uma maior liberdade para expandir dentro do espaço intergranular. No pão fresco, durante o forneamento, as moléculas de amilose e algumas de amilopectina são lixiviadas para o exterior do grânulo de amido e é neste momento que algumas moléculas de amilose formam complexos de inclusão com lipídios. Durante o envelhecimento do pão a amilopectina se reorganiza dentro de uma estrutura mais cristalina e esta reorganização (retrogradação) confere rigidez ao grânulo intumescido e ao material intergranular (Figura 1) (ZOBEL; KULP, 1996).

No entanto, a retrogradação do amido (amilose e amilopectina) da farinha é insuficiente para explicar as alterações de paladar e textura ocorridas em produtos de panificação logo após a cocção e durante o armazenamento (aumento de dureza, amolecimento da crosta, esfarelamento do miolo e ressecamento da massa) (D'APPOLONIA, 1984; HOSENEY; HE, 1990, MARTIN; ZELEZNAK; HOSENEY, 1991, LEE; SWANSON; BAIK, 2001).

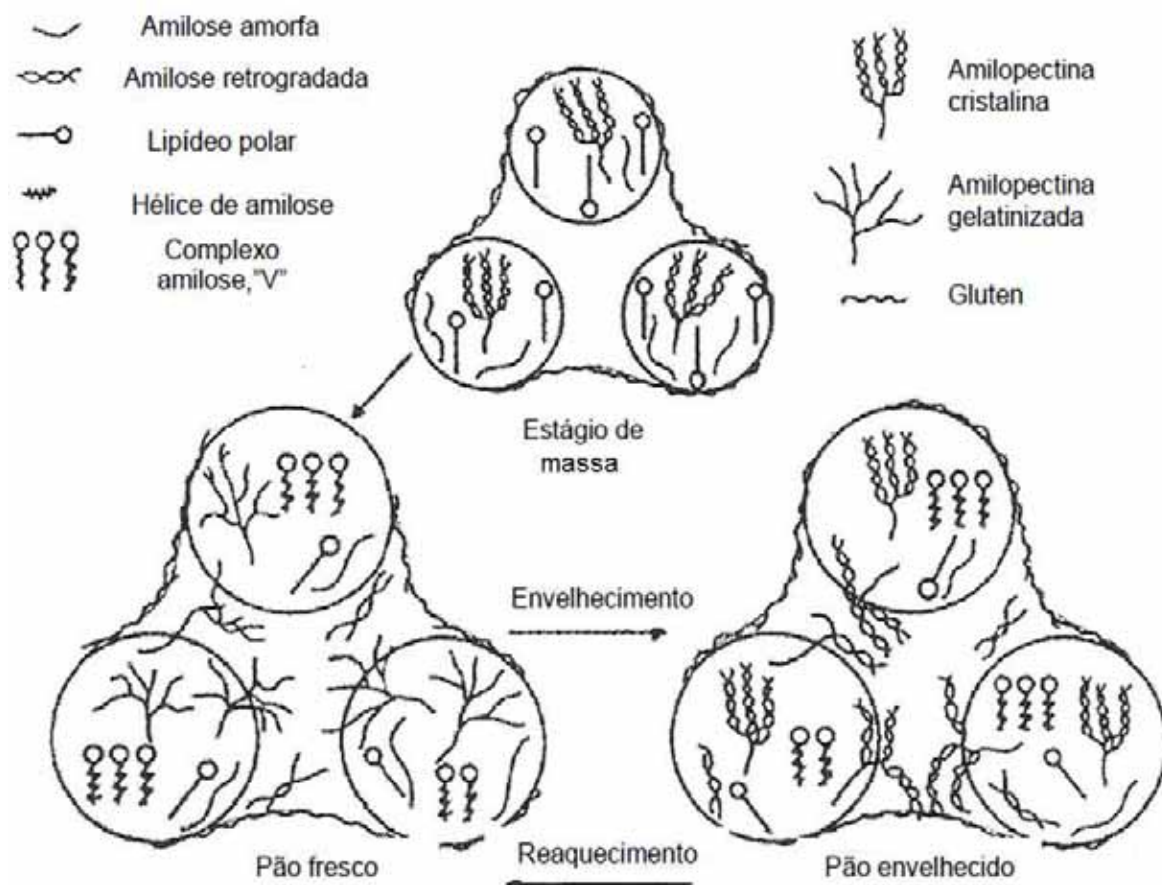


Figura 1: Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando a estrutura molecular. Fonte: ZOBEL; KULP, 1996.

Martin, Zeleznak e Hosney (1991) propuseram um modelo de envelhecimento (Figura 2), onde a firmeza do miolo tem causas nas interações entre as moléculas de amilose e amilopectina dos grânulos de amido remanescentes da gelatinização (fase descontínua) e o glúten (fase contínua) devido à diminuição da capacidade de hidratação do miolo (desidratação). De acordo com esse modelo, grânulos de amido menos intumescidos teriam uma área exposta menor, portanto, menos ligações ou ligações mais fracas ocorreriam com o glúten (fibrila de proteína). Esses pesquisadores sugerem que essas ligações entre o amido e o glúten conferem a firmeza do miolo, e, portanto, o envelhecimento do pão.

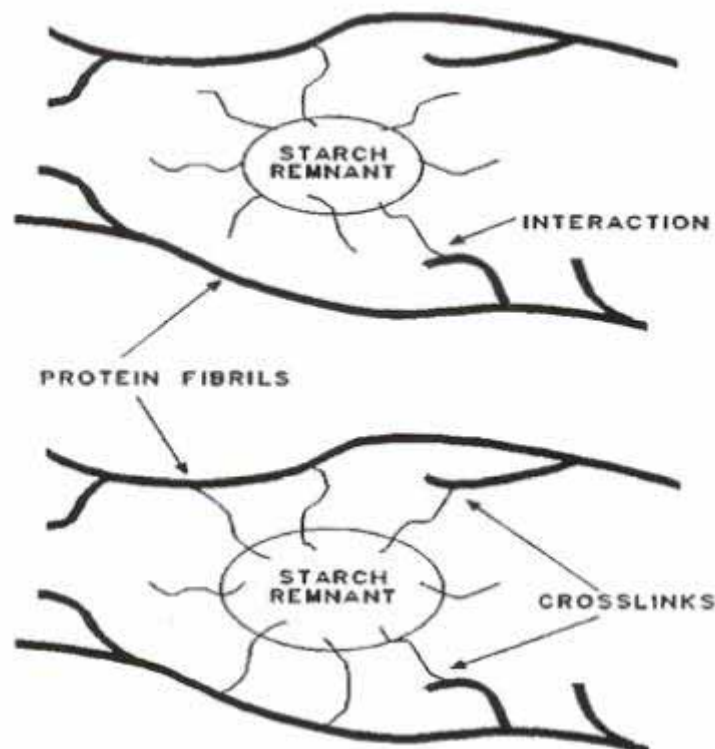


Figura 2: Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando as ligações entre o amido remanescente e o glúten. Fonte: MARTIN, ZELEZNAK, HOSENEY, 1991.

Segundo Cauvain e Young (2009), no armazenamento do pão, o conteúdo de umidade da casca cresce como resultado da migração de umidade do miolo para a casca. A redistribuição de água afeta profundamente o envelhecimento do pão. Em geral, quanto maior a quantidade de água no produto assado, mais lento é o envelhecimento. A quantidade de umidade do produto assado é profundamente influenciada pela quantidade de água adicionada durante a mistura e pelo processamento subsequente da massa em pão.

3.2 FARINHA DE TRIGO

Alimento comercial primário, a farinha resulta da moagem de grãos cereais. O objetivo da moagem é quebrar o grão cereal, retirar o máximo de endosperma (livre de farelo e germe) e reduzi-lo à farinha. Esta separação é possível em função das diferentes propriedades físicas do farelo, do germe e do endosperma. O farelo é resistente devido a seu alto conteúdo de fibra, enquanto o endosperma é friável. O germe, em função do seu alto conteúdo de óleo, forma flocos ao passar entre os rolos de redução. Além destas diferenças

físicas, as partículas das várias partes do grão diferem em densidade. Isto torna possível sua separação pelo emprego de correntes de ar. O grau de separação do endosperma é refletido pelo rendimento de moagem da farinha, geralmente referido como taxa de extração. A farinha padrão apresenta em torno de 74 % de extração. Taxas de extração de 80% têm sido usadas para preservar os nutrientes do trigo para o uso alimentar, sem causar grandes alterações na cor da farinha ou na qualidade de panificação (GUTKOSKI; ANTUNES; ROMAN, 1999).

A farinha de trigo é o ingrediente mais importante em panificação, devido à presença de glúten, que forma e mantém a estrutura da massa até a gelatinização do amido no cozimento, quando é formada a estrutura final do pão (PARK; BAIK, 2004). Para a fabricação de produtos de panificação, a combinação da quantidade e qualidade das proteínas presente no trigo deve ser avaliada. Muitas vezes uma variedade de trigo apresenta alta quantidade de proteína, mas esta é de baixa qualidade (baixa força), o que pode expressar baixo potencial de panificação. O contrário também pode ser verificado, ou seja, baixa quantidade de proteína, mas de alta qualidade, e, neste caso, o potencial de panificação também pode ser reduzido em função da presença de menor teor proteico (GUARIENTI, 1996).

A composição química do grão de trigo afeta suas características funcionais e tecnológicas e, juntamente com as propriedades estruturais e a população microbiológica, define a qualidade da farinha de trigo (MOUSIA et al., 2004).

De forma geral, a farinha de trigo é composta principalmente por amido (70 a 75 %), água (12 a 14 %), proteínas (8 a 16 %) e outros constituintes menores, como polissacarídeos não amiláceos (2 a 3 %), lipídeos (2 %) e cinzas (1 %) (SCHEUER et al., 2011).

3.2.1 Amido

O amido é o mais abundante componente da farinha de trigo, de 74 a 90 % em base seca, dependendo da sua taxa de extração, e é composto principalmente de amilose e amilopectina (SAHAA; JORDANA; BOTHAST, 2009). Amido é o polissacarídeo de reserva mais importante e o constituinte mais abundante em muitas plantas, incluindo cereais. Ele tem propriedades únicas que determinam sua funcionalidade em muitos alimentos, em particular na panificação. Ocorre na forma de grânulos semicristalinos compostos por uma mistura de dois polímeros de glicose, amilose e amilopectina (GOESAERT et al., 2005).

A amilose é uma molécula essencialmente linear, contendo de 500 – 6000 unidades de glicose ligadas em α -1,4. A amilopectina é um polissacarídeo altamente ramificado com grau de polimerização de 3×10^5 a 3×10^6 unidades de glicose, composta por ligações α -1,4 e α -1,6. O modelo de *clusters* da amilopectina é, hoje, altamente aceito. Neste modelo, pequenas

cadeias formam duplas hélices que são organizados em grupos distintos, enquanto que longas cadeias estendem a 2, 3 ou 4 grupos (Figura 3) (GOESAERT et al., 2005).

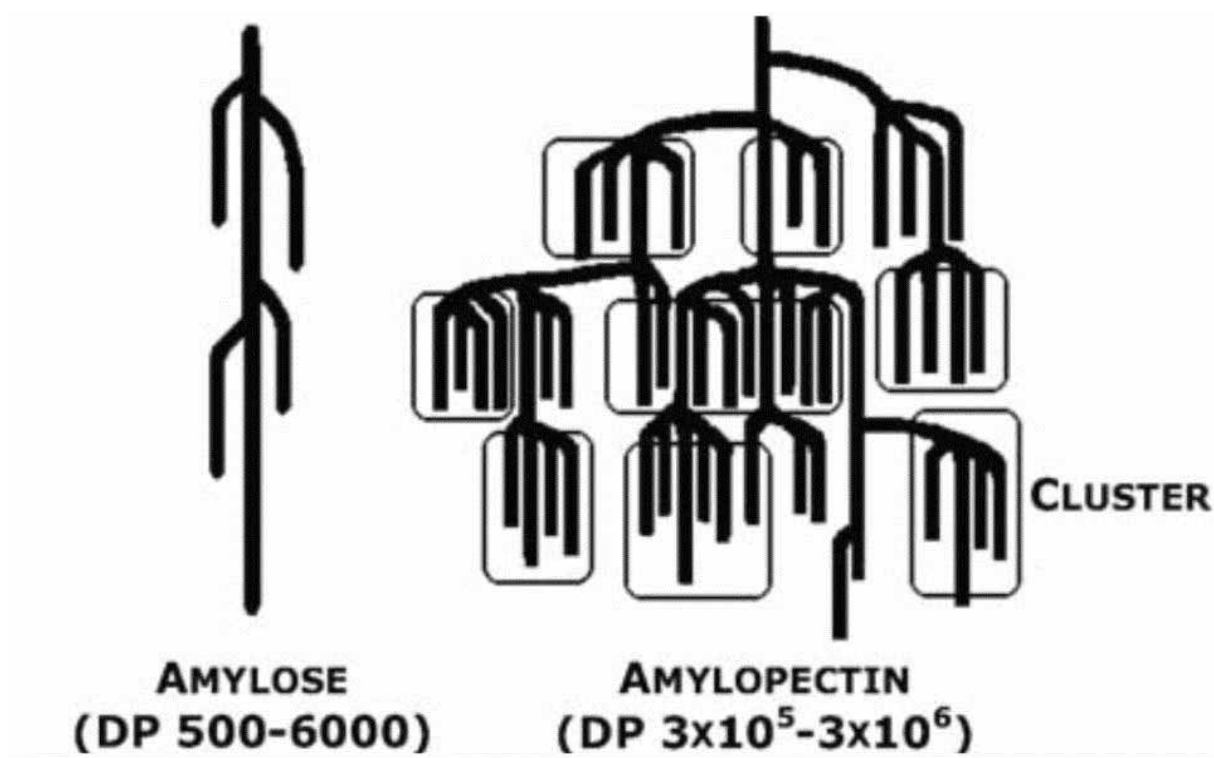


Figura 3: Representação esquemática da amilose e da amilopectina. Fonte: GOESAERT et al., 2005.

À temperatura ambiente e na presença de água, os grânulos de amido absorvem cerca de 50 % de água em relação ao seu peso seco. Assim, eles incham de forma limitada. Abaixo de uma temperatura característica (temperatura de gelatinização) esse processo é reversível. Quando a suspensão de amido é aquecida acima dessa temperatura, ele sofre uma série de mudanças, podendo eventualmente, causar danos irreversíveis nas propriedades do amido. Este processo é denominado gelatinização (Figura 4) (GOESAERT et al., 2005). Durante o aquecimento do amido em excesso de água, ocorre a penetração da água no interior do grânulo. A água penetra inicialmente nas regiões amorfas, pois as ligações de hidrogênio nessas regiões são mais fracas e mais facilmente rompidas, permitindo a hidratação e inchamento do grânulo de amido. Com o aumento da temperatura, o inchamento do grânulo aumenta, assim como a absorção de água, resultando na perda da ordem cristalina e, por esse motivo, da birrefringência, pois há a dissociação de duplas hélices da região cristalina, e também a lixiviação da amilose (BILIADERIS, 1991; HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003).

A retrogradação ocorre durante o resfriamento e armazenamento dos géis de amido, quando se inicia a reassociação das moléculas de amido em uma estrutura mais ordenada de

duplas hélices e consequentemente menos solúvel. Sob condições favoráveis, esta estrutura pode ser desenvolvida em forma cristalina, com partículas maiores que podem precipitar. Durante esse processo ocorre a separação das fases polímero e solvente, com perda da água ligada às cadeias de amilose, fenômeno conhecido como sinérese (Figura 4) (LOBO; SILVA, 2003; ELFSTRAND et al., 2004).

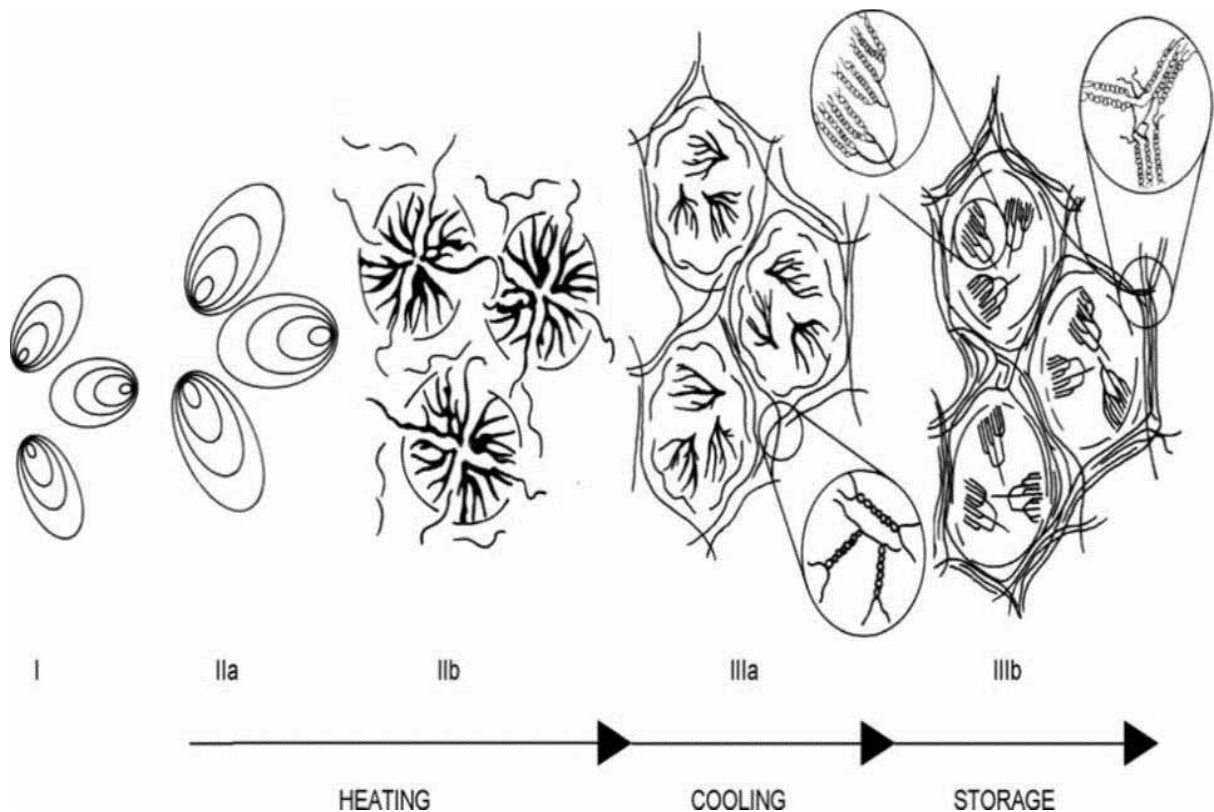


Figura 4: Representação esquemática da gelatinização e da retrogradação do amido (I) Grânulos de amido nativo; (IIa) Inchamento dos grânulos; (IIb) amilose lixiviada e rompimento dos grânulos; (IIIa) Retrogradação da amilose; (IIIb) Retrogradação da amilopectina. Fonte: GOESAERT et al., 2005.

Em panificação o amido começa a exercer o seu papel nas temperaturas entre 54 °C e 63 °C. Nesta faixa de temperatura os grânulos de amido gelatinizam e como resultado, o grânulo perde a sua cristalinidade, tornando-se amorfo. Nesta fase, a estrutura do grânulo é rompida e uma pequena quantidade de amido, principalmente amilose, é lixiviada para a fase intergranular. Após o resfriamento, a amilose solubilizada forma uma rede contínua, em que os grânulos de amido inchados e deformados são incorporados. Devido à sua rápida retrogradação, a amilose é um elemento estrutural essencial no pão e é um fator determinante para a textura inicial do pão (GOESAERT et al., 2005). Alguns autores concordam que a firmeza do miolo durante o envelhecimento do pão é atribuída principalmente à retrogradação

da amilopectina, em particular à formação de duplas estruturas helicoidais e regiões cristalinas (GRAY; BEMILLER, 2003; ZOBEL; KULP, 1996; GOESAERT et al., 2005).

3.2.2 Amilases

Amilases são enzimas, constituintes naturais das farinhas, que catalisam a hidrólise das ligações entre as unidades de glicose da amilose e da amilopectina (ATWELL, 2001). A α -amilase ataca a amilose e a amilopectina nas ligações $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ao acaso, deixando as ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$ intactas, iniciando o ataque pelas extremidades não redutoras. A β -amilase ataca a cadeia de amido nas extremidades, formando sempre resíduos de maltose. Do mesmo modo que a α -amilase, a β -amilase não rompe as ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$ e ataca pelas extremidades não redutoras (FRANCO et al., 2001).

Cada vez que uma cadeia de amido é quebrada pela α -amilase, surgem dois locais, nos quais a β -amilase pode agir. Portanto, o nível da α -amilase é que determina a velocidade enzimática do sistema. O elevado teor de amilase resulta na elevada produção de dextrinas durante o forneamento, acarretando em uma massa pegajosa e em pães com casca escura cuja superfície interna de corte parecerá úmida ao toque (CAUVAIN; YOUNG, 2009). Consequentemente, farinhas com baixo teor de amilase terão baixa produção de dextrina, a produção de gás a partir da fermentação é pobre e o volume do pão é pequeno.

As β -amilases podem produzir quantidades relativamente pequenas de maltose para ajudar na fermentação na ausência de α -amilase. Por essa razão, α -amilase, algumas vezes em conjunto com proteases, são comumente utilizadas em panificação. Amilases de cereais permanecem inalteradas até temperaturas aproximadas de 70 °C (QUAGLIA; GENNARO, 2003), enquanto que as α -amilases fúngicas possuem temperatura ótima de 50 a 55 °C e para as α -amilases bacterianas essa temperatura está entre 65 e 70 °C (GRAY; BEMILLER, 2003).

3.2.3 Proteínas

Osborne (1924) classificou as proteínas segundo a solubilidade em quatro categorias: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. No trigo, as proteínas são divididas em proteínas solúveis (albuminas e globulinas) e proteínas de reserva (gliadina e glutenina) (SCHEUER et al., 2011).

Do ponto de vista funcional as proteínas do trigo classificam-se em dois grupos: as proteínas formadoras do glúten (gliadina e glutenina) que apresentam um papel fundamental em panificação e as proteínas “não glúten” ou “proteínas solúveis” que são aquelas que não

fazem parte da formação da rede de glúten durante a mistura da farinha de trigo com água. As proteínas “não glúten” representam cerca de 20 % das proteínas totais e estão localizadas principalmente nas camadas externas do grão, com baixa concentração no endosperma e tem como função serem proteínas estruturais (constituente de membranas). As proteínas do glúten (entre 80 e 85 % do total das proteínas do trigo), gliadina e glutenina, são usualmente encontradas na mesma proporção no endosperma dos grãos maduros onde elas formam uma matriz contínua ao redor do grânulo de amido (GOESAERT et al., 2005).

Os teores de gliadinas e gluteninas são importantes para a qualidade do trigo e a relação de proporção entre essas proteínas determina as diferentes características do glúten dos diversos tipos de trigo. As gliadinas apresentam estrutura globular e as gluteninas, uma estrutura fibrosa. O glúten é constituído pelas frações hidratadas de gliadinas e gluteninas e pelo resíduo proteico. As gliadinas conferem extensibilidade enquanto as gluteninas e o resíduo proteico são responsáveis pela elasticidade da massa. A elasticidade é uma propriedade característica do glúten de trigos próprios para a panificação (MANDARINO, 1993).

As gliadinas e gluteninas são denominadas proteínas do glúten por formarem uma rede capaz de reter o gás carbônico responsável pelo crescimento da massa e do pão (OLIVEIRA, 2010). Quando a farinha de trigo e os demais ingredientes da massa são misturados com água para homogeneização mecânica, há hidratação das proteínas do trigo e as gliadinas e gluteninas formam um complexo protéico pela sua associação através de pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e pontes dissulfeto que se denomina glúten (Figura 5) (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

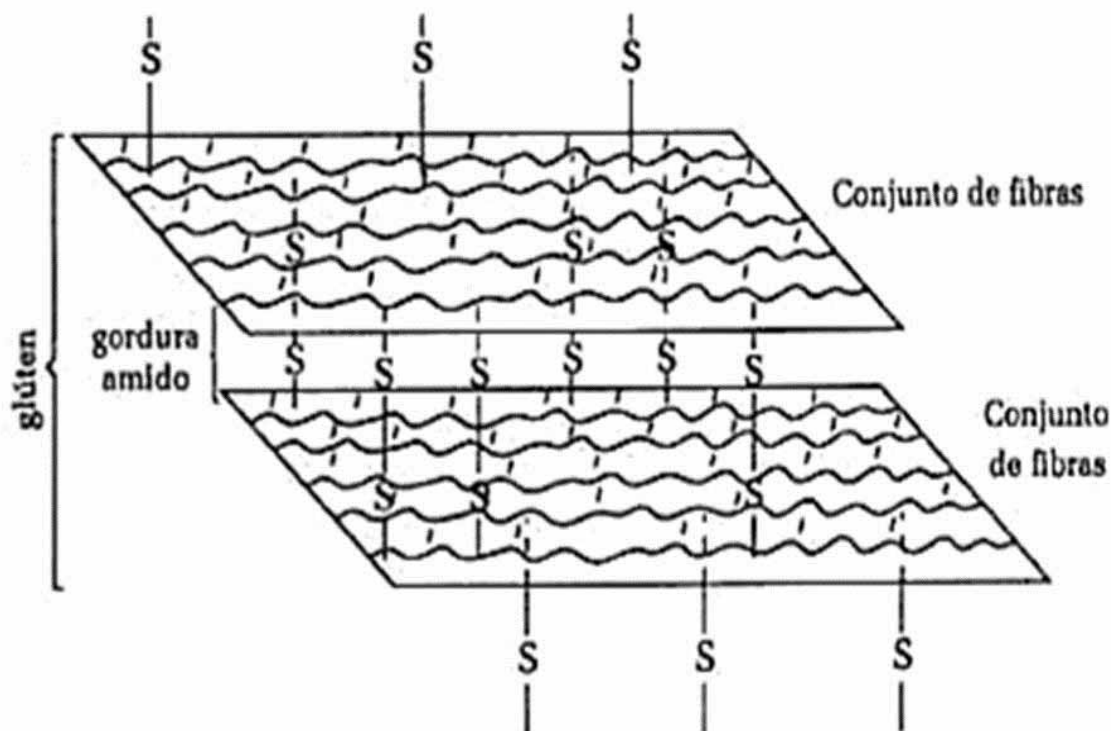


Figura 5: Representação esquemática da estrutura do glúten. Fonte: BOBBIO; BOBBIO, 2001.

3.2.4 Polissacarídeos não-amiláceos

Outros constituintes presentes nas paredes das células do endosperma e no farelo do trigo são os polissacarídeos não-amiláceos, termo genérico utilizado para arabinoxilanas (AX), β -glucanas, celulose e arabinogalactanas (AG). São polissacarídeos que diferem da amilose e da amilopectina quanto à natureza de sua composição em monossacarídeos e/ou pela natureza de suas ligações (GOESAERT et al., 2005).

As arabinoxilanas presentes nos cereais estão localizadas na parede celular do farelo e do endosperma e na matriz que mantém as células unidas no grão (OLIVEIRA, 2010). A concentração de arabinoxilanas (AX) na farinha de trigo varia entre 1,5-2,5 %, sendo que 0,4-0,8 % são de arabinoxilanas extraídas com água (WE-AX), constituídas por xilose e arabinose, e 1,1-1,9 % são de arabinoxilanas não extraídas com água (WU-AX), que são compostas por xilose, arabinose e glicose (COURTIN; DELCOUR, 2002). Embora as arabinoxilanas sejam consideradas constituintes menores da farinha de trigo, são importantes para a funcionalidade dos cereais nos processos biotecnológicos. As arabinoxilanas (WE-AX) apresentam um impacto significativo sobre as propriedades do pão, como volume, textura do miolo e taxa de envelhecimento (HOSENEY, 1984).

3.3 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM PÃES

As enzimas são proteínas biologicamente ativas sintetizadas no interior das células e que desempenham importante papel no processamento e deterioração dos alimentos. Têm uma estrutura química muito especial, contém um centro ativo denominado de apoenzima e, algumas vezes, um grupo não proteico chamado coenzima, o conjunto dessas duas partes é chamado de holoenzima (NUNES, 2008).

As enzimas, na panificação, são usadas com o objetivo de melhorar as características reológicas da massa, afetando o resultado final do pão em relação ao volume, sabor, aroma, estrutura da casca e do miolo, maciez e vida de prateleira (NUNES, 2008).

Segundo Nunes (2008), as enzimas para panificação são capazes de produzir os efeitos tecnológicos desejados na panificação, modificando os componentes da massa, como o amido, as proteínas, a hemicelulose, os açúcares, etc.. Têm sido testados como agentes melhoradores enzimas como transglutaminases (ONYANGO, et al. 2010, STEFFOLANI, et al. 2010, SERAVALLI et al. 2011), amilases (PATEL et al. 2012), xilanases (OLIVEIRA et al., 2014), proteases (KAWAMURA-KONISHI et al. 2013), hemicelulases (HU et al., 2009, PHIMOLSIRIPOL; MUKPRASIRT; SCHOENLECHNER, 2012), ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (JEMLI et al. 2007, GUJRAL et al. 2003, OLIVEIRA, 2010), bem como ácido ascórbico (JENSEN et al. 2011) e emulsificantes (RAVI; MONOHAR; RAO, 2000, COLAKOGLU; OZKAYA, 2012).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é a única enzima capaz de converter o amido e seus substratos em ciclodextrinas (CDs) por meio de reação de ciclização (TONKOVA, 1998). Esta enzima catalisa quatro reações diferentes: ciclização, acoplamento, desproporção e hidrólise. A ciclização é uma reação intramolecular onde ciclodextrinas são sintetizadas a partir do amido. Na reação de acoplamento, a reação reversa da ciclização, a ciclodextrina é acoplada a um receptor, geralmente um glicosídeo linear, enquanto que a reação de desproporção (intermolecular) é uma reação em que resíduos de monossacarídeos são transferidos entre dois carboidratos ou glicosídeos lineares. As duas últimas reações são de grande interesse, pois elas podem ser usadas para adicionar resíduos de glicose a receptores, e assim, alterar suas propriedades, como por exemplo, aumentar a sua solubilidade em água ou mesmo reduzir a sua citotoxicidade (SVENSSON; ADLERCREUTZ, 2011).

A CGTase é produzida por uma variedade de bactérias, incluindo *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus ohbensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *B. stearothermophilus*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *B.*

circulans, *B. halophilus* (TONKOVA, 1998), sendo detectada predominantemente em *Bacillus spp* (ALVES-PRADO, 2005).

Todas as CGTases produzem uma mistura de α , β e γ -ciclodextrinas por meio da reação de ciclização e a produção de diferentes ciclodextrinas e suas proporções dependem das condições de reação e principalmente da fonte microbiana da enzima. Deste modo, as CGTases podem ser classificadas de acordo com sua principal ciclodextrina produzida, α , β ou γ -ciclodextrina (BLACKWOOD; BUCKE, 2000; VENTURINI et al., 2008).

A aplicação de CGTase parcialmente purificada de *Bacillus clausii* E16 em panificação produziu alterações nas propriedades das massas como o aumento da estabilidade e elasticidade, aumento do volume das massas e dos pães, redução na retrogradação da amilopectina e na firmeza do miolo (OLIVEIRA, 2010). O mecanismo de ação da CGTase está relacionado com a produção de glicose, maltose e maltooligossacarídeos pela degradação das moléculas de amilose e amilopectina. A produção de ciclodextrina também influenciou positivamente as características de qualidade de pães, possivelmente pela desestabilização dos complexos amilose-lipídeos e consequente formação de complexos amilose-lipídeos- β CD, proporcionando uma maior maciez aos pães adicionados da enzima (TIAN et al. 2009b; OLIVEIRA, 2010).

De acordo com Jemli et al. (2007), a adição de β -CGTase US132 provocou um aumento de 11 % no volume específico dos pães e preveniu o aumento da firmeza durante o armazenamento dos pães durante 10 dias. Para esses autores, o efeito antienvelhecimento da CGTase pode ser atribuído a hidrólise suficiente do amido, prevenindo a cristalização da amilopectina.

A CGTase demonstrou ser um melhorador de boa qualidade para pães produzidos a partir de farinha de arroz, obtendo um produto com melhor volume específico e uma textura macia do miolo, sugerindo que os produtos da reação enzimática podem formar complexos com as proteínas e também com os lipídeos e outros compostos presentes no processo de panificação (GUJRAL et al., 2003).

Gujral e Rosell (2004) verificaram que a presença da CGTase reduziu a viscosidade de pico, a viscosidade final e o *setback*, reduzindo, portanto, a tendência a retrogradação da amilose e aumentou a viscosidade de quebra das pastas de amido de trigo. Para os autores, esses resultados podem ser atribuídos a capacidade de hidrólise da CGTase e à formação de complexos entre as ciclodextrinas produzidas pela enzima e os lipídeos.

3.4 CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por 6, 7 ou 8 ligações α -1,4, chamadas de α CD, β CD e γ CD, respectivamente. As ciclodextrinas apresentam cavidade hidrofóbica e superfície externa hidrofílica, devido à presença dos grupos hidroxila. O número de unidades de glicose determina a dimensão e o tamanho da cavidade (Figura 6). Esta estrutura permite a formação de complexos de inclusão estáveis, com grande diversidade de substâncias orgânicas, sais e halogênios (SZENTE; SZEJTLI, 2004), além de formar complexos com substâncias de massa molecular típica de 80 a 250 Daltons (CARDELLO; CELESTINO, 1996, LINDNER; SZENTE; SZEJTLI, 1981).

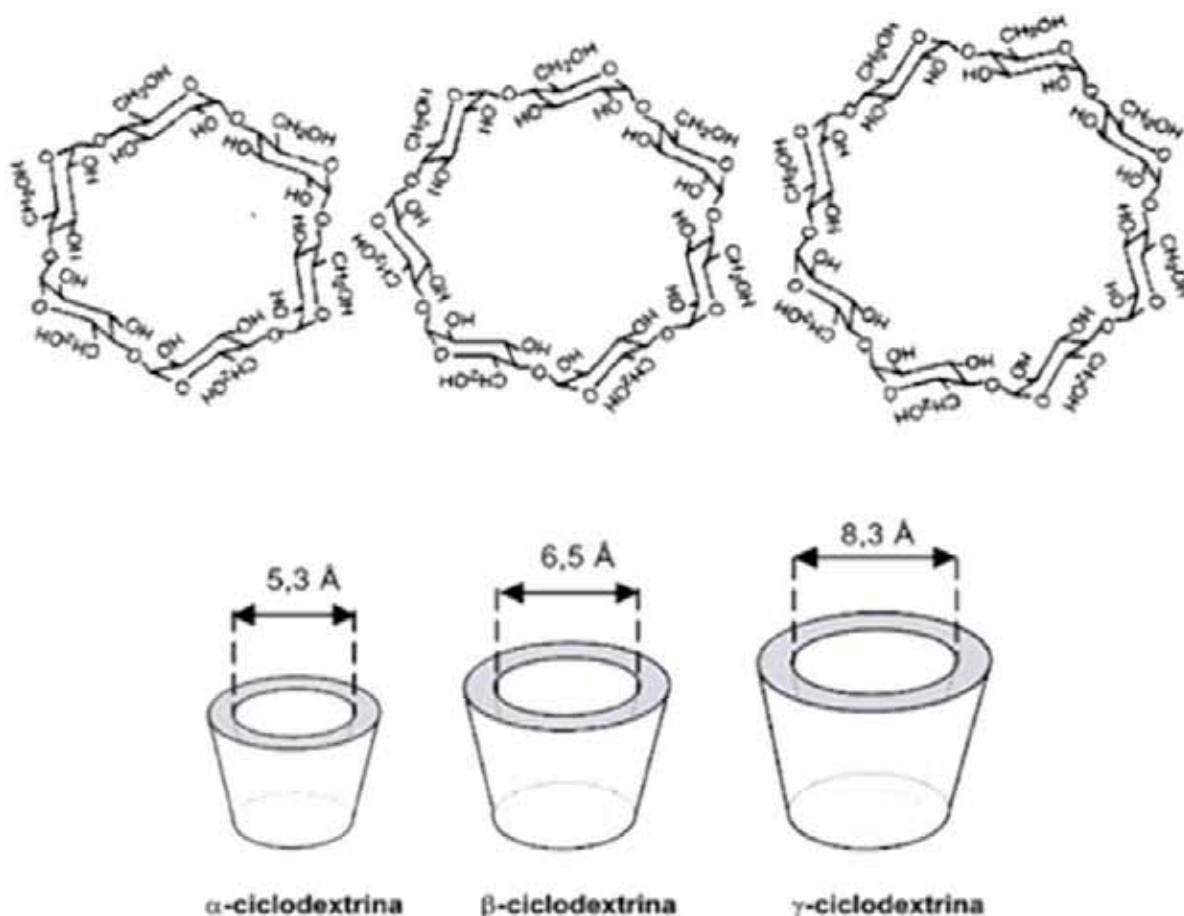


Figura 6: Estrutura e dimensões moleculares das ciclodextrinas. Fonte: SZENTLI, 1990.

Compostos hidrofóbicos de cadeias longas formam complexos mais fortes do que compostos hidrofílicos de cadeias curtas (GUTKOSKI; ANTUNES; ROMAN, 1999). Segundo os seus respectivos tamanhos, as moléculas complexadas são encapsuladas de maneira total ou parcial, cabendo à ciclodextrina o papel de molécula “hospedeira” ou receptora (Figura 7) (LINDNER, SZENTE, SZEJTLI, 1981). Em muitos casos, adições são

formadas mesmo quando o tamanho molecular do componente a incluir não permite a completa inserção dentro da cavidade central. Esses fenômenos são explicados pela formação de uma “tampa” para a cavidade da ciclodextrina ou a inserção de alguns grupos funcionais no interior da cavidade (LINDNER; SZENTE; SZEJTLI, 1981).

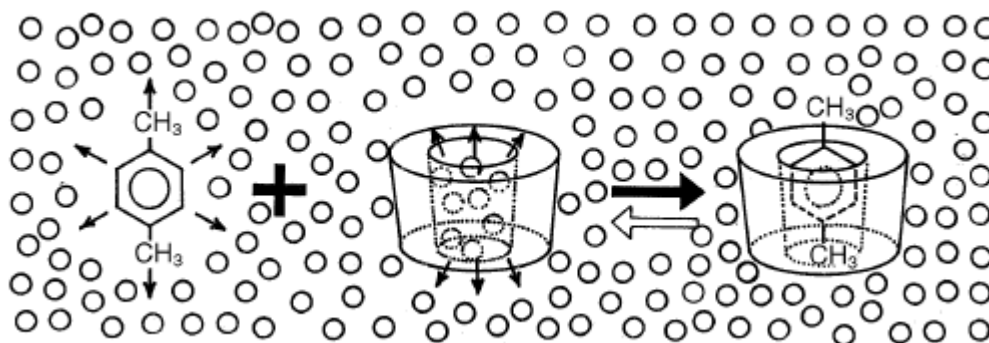


Figura 7: Formação esquemática da formação de complexos de inclusão. Os círculos pequenos representam moléculas de água, quando são repelidas tanto pela molécula orgânica quanto pela cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Fonte: SZEJTLI, 1997.

A interação de aromas com as CDs é ainda de especial interesse para a indústria de alimentos (TOBITSUKA; MIURA; KOBAYASHI, 2005). As CDs são aprovadas para uso na indústria alimentícia em vários países como Bélgica, França, Alemanha, Japão, Holanda, Espanha, África do Sul, Coreia do Sul e Hungria. O uso de CD em indústria de alimentos tem aumentado significativamente sendo o Japão o maior consumidor do mundo. No Brasil a β CD é considerada um aditivo (INS 459) e até a conclusão dessa pesquisa não foi encontrado limites para o seu uso (ANVISA).

Os principais campos de aplicação das CDs, em escala industrial, são a encapsulação de substâncias do sabor e aroma e a extração do colesterol de leite e gemas de ovos, mas outras aplicações na indústria alimentícia são também realizadas (SZENTE; SZEJTLI, 2004).

Os agentes aromatizantes ou flavorizantes são geralmente substâncias voláteis, normalmente hidrofóbicas e facilmente degradadas quando não protegidas. A microencapsulação é o processo pelo qual pequenas quantidades de líquidos, sólidos ou gases são cobertas com material que se constituem em barreiras para o ambiente e/ou reações químicas, como aquecimento, oxidações e outras (GREEBLATT et al., 1993).

Uma das mais promissoras possibilidades de estabilização do aroma é a formação de complexos de inclusão com a β CD. Centenas de componentes aromáticos do café, quimicamente diferentes, têm sido isolados e identificados. São compostos cíclicos, acíclicos e heterocíclicos, sendo a maioria inteiramente volátil e alguns quimicamente instáveis

(DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999). Os complexos de encapsulação formados permitiriam a redução da volatilidade do aroma dos pães, aumentando o tempo de armazenamento e reduzindo as perdas, o que poderia afetar diretamente no processo de envelhecimento de pães (SZEJTLI, 1997).

A gelatinização é uma importante característica do amido. A β CD modifica consideravelmente a gelatinização da farinha de trigo. A presença de 1,5 % de β CD aumentou o poder de inchamento e a solubilidade dos grânulos de amido de trigo, enquanto que a viscosidade da pasta aumentou cerca de quatro vezes na presença de β CD (KIM; HILL, 1984).

Tian et al. (2009a) analisaram o efeito da β CD em amido de arroz. O aumento da concentração de β CD reduziu proporcionalmente a retrogradação do amido. Esses autores propuseram a existência de uma interação entre a β CD e a amilose com a formação de um novo complexo amilose- β CD (Figura 8), o qual reduziu a capacidade de rearranjo da molécula, provocando, assim, redução na taxa de retrogradação da amilose.

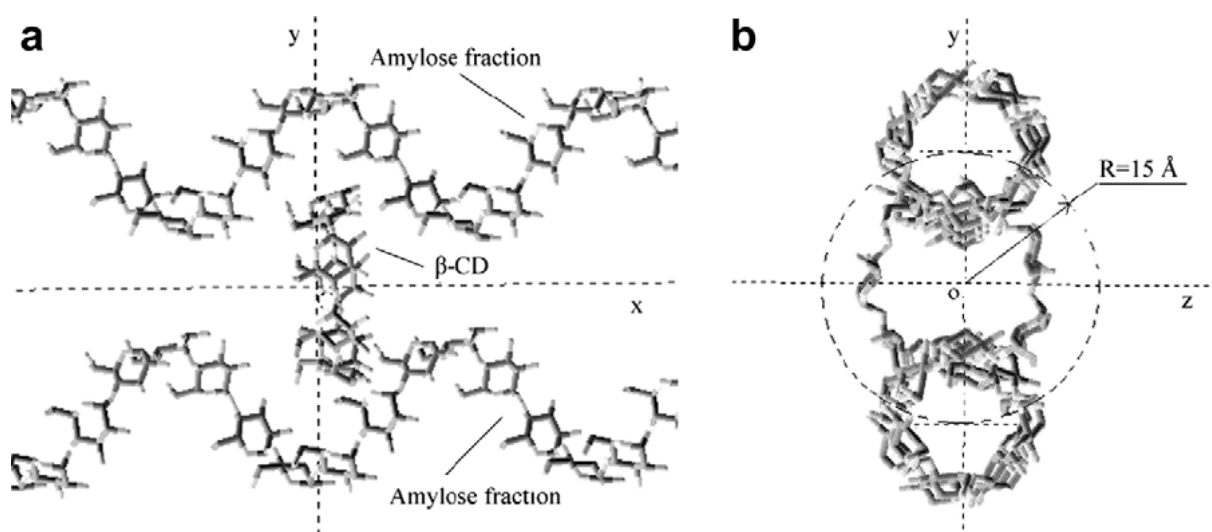


Figura 8: Vista da conformação pré-otimizada de duas frações de amilose com uma molécula de β CD ao longo do eixo z (a) e do eixo x (b). Fonte: TIAN et al. 2009a.

Tian et al. (2009b), estudaram o impacto da adição de β CD na taxa de envelhecimento de pães armazenados por até 35 dias. A adição de 1,5 % de β CD provocou redução na firmeza, na coesividade e na elasticidade do pão, e também na taxa de recristalização da amilopectina. Para esses autores, a redução da firmeza do miolo dos pães durante todo o armazenamento pode estar associada à formação de uma rede melhorada resultante da interação da β CD com o amido. Os miolos dos pães frescos apresentaram padrão tipo A, com

picos em 3,9, 4,9 e 5,2 Å e a adição da β CD aumentou este padrão com o aumento desses picos e aumento da cristalinidade relativa em 7,5 %. Durante o armazenamento, o padrão de raios-X mudou do tipo A para um padrão mais estável do tipo B representado por um estado mais amorfo. No entanto, essa transformação foi retardada na presença de β CD, reduzindo a cristalinidade relativa e apresentando um padrão do tipo V + B, indicando que uma cristalinidade adicional foi formada devido à interação das hidroxilas externas da β CD com a amilose e os lipídeos. Durante o armazenamento a adição de β CD reduziu a entalpia de retrogradação indicando que a quantidade de água presente no miolo dos pães favoreceu as interações entre a β CD e o amido da farinha.

A presença de 1 % de β CD reduziu a variação da entalpia, em amido de arroz, sugerindo que o complexo amilose-lipídeo foi parcialmente rompido pela β CD, mostrando a competição da β CD com a amilose pelo lipídeo. No entanto, a presença de 3 % de β CD aumentou a variação da entalpia sugerindo que a β CD não apenas interagiu com os lipídeos, mas também com a amilose de modo a formar complexos amilose- β CD-lipídeo (TIAN et al. 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Farinha de trigo, gentilmente doada pela empresa Castelo Comércio de Alimentos Ltda., foi utilizada neste trabalho. Os parâmetros alveográficos e de índice de glúten constantes do laudo técnico da farinha de trigo foram: energia de deformação da massa ($W = 297.10^{-4}J$), índice de configuração da curva ($P/L = 1,34$), *Falling number* ($FN = 349s$) e glúten úmido ($GU = 28\%$), caracterizando-a como uma farinha adequada para panificação.

A CGTase utilizada foi produzida a partir da bactéria *Bacillus clausii* E16 pertencente ao banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista (São José do Rio Preto - SP, Brasil). A β -ciclodextrina usada foi adquirida da *Sigma Co*, USA. Os demais ingredientes utilizados na confecção de pães foram obtidos do comércio local. Todos os outros reagentes utilizados foram puros para análise.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção da enzima CGTase

A bactéria, *Bacillus clausii* E16, que pertence ao banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista (São José do Rio Preto-SP, Brasil), foi inoculada em tubos teste com meio de cultura proposto por Alves-Prado et al. (2007) composto de 1,34 % de amido solúvel (Synth), 0,49 % de peptona (BioBrás), 0,59 % de extrato de levedura (Oxoid), 0,1 % de K_2HPO_4 (Dinâmica), 0,02 % de $MgSO_4.7H_2O$ (Nuclear), 1,25 % de Na_2CO_3 (Synth) (esterilizado separadamente e adicionado ao meio após resfriado), e incubados a 35 °C por 72 horas para seu crescimento completo. A fermentação submersa foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio de cultura e 1 mL do pré-inóculo e incubados a 35 °C por 48 horas sob agitação de 130 rpm. O extrato enzimático bruto foi obtido pela centrifugação a 10.000g/20 minutos a 4 °C e o sobrenadante contendo a CGTase foi recuperado e concentrado por ultrafiltração pelo sistema Benchtop (QuixStand®) em coluna de 10000 NMWC (Amersham Biosciences).

4.2.2 Atividade enzimática

A atividade da CGTase foi determinada pelo método proposto por Mäkelä et al. (1988), modificado por Alves-Prado et al. (2007), pela incubação de 0,1 mL da solução

enzimática, devidamente diluída, com 0,8 mL de solução de maltodextrina (Sigma Co., USA) 1,0 % em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5. Após a incubação a 55 °C por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4 mL de solução de Na₂CO₃ 0,25 M. Posteriormente, 0,1 mL de solução fenolftaleína 1mM foi adicionada aos tubos de reação. Os controles receberam solução enzimática apenas no momento da leitura. A absorbância foi determinada em 550 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de βCD por minuto. A curva padrão foi plotada utilizando diferentes concentrações de βCD.

A taxa de hidrólise do amido pela CGTase foi determinada pelo método de iodo ou dextrinizante proposto por Fuwa (1954) e Pongsawasdi e Yagisawa (1987), com modificações. Uma alíquota de 0,1 mL da solução enzimática, convenientemente diluída, foi adicionada a 0,3 mL de solução de amido solúvel a 0,5 % em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5. Após a incubação a 55 °C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4 mL de solução de HCl 0,2 M. Em seguida a reação recebeu 0,5 mL de reativo de iodo (0,3 % de KI e 0,03 % de I₂). A mistura de reação foi diluída em 10 mL de água destilada. O controle recebeu a solução enzimática apenas no momento da leitura. A absorbância foi determinada a 700 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10 % a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido, por minuto.

4.2.3 Determinação de proteína dos extratos enzimáticos

O teor de proteína do extrato bruto e do extrato concentrado foi determinado pelo método de Hartree-Lowry (1972) usando soro albumina bovina como padrão.

4.2.4 Caracterização da farinha de trigo

4.2.4.1 Composição química da farinha de trigo

Para determinação de umidade, lipídeos, proteínas e cinzas foram seguidos os métodos 44-40, 30-10, 46-12 e 08-12, respectivamente, descritos no “Approved Methods of American Association of Cereal Chemists” (AACC, 2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de carboidratos totais foi calculado por diferença.

4.2.4.2 Propriedades reológicas e térmicas da farinha de trigo

4.2.4.2.1 Propriedades farinográficas da farinha de trigo

As propriedades farinográficas da farinha de trigo controle e das adicionadas de 5, 10 e 20 U/100 g de farinha de trigo de CGTase e de 0,25, 0,5 e 1,0 % (m/m em relação ao peso da farinha) de β CD foram determinadas, em duplicata para as amostras contendo β CD e uma única vez para as amostras contendo CGTase, em farinógrafo Brabender (Brabender, Duisburg, Alemanha) de acordo com o método 54-21 (AACC, 2000). Os parâmetros obtidos a partir do farinograma foram absorção de água (%), tempo de desenvolvimento (min), estabilidade (min) e índice de tolerância à mistura (UB).

4.2.4.2.2 Propriedades extensográficas da farinha de trigo

As propriedades extensográficas da farinha de trigo controle e adicionadas de 5, 10 e 20 U/100 g de farinha de trigo de CGTase e de 0,25, 0,5 e 1,0 % (m/m em relação ao peso da farinha) de β CD foram determinadas, em duplicata para as amostras contendo β CD e uma única vez para as amostras contendo CGTase, em extensógrafo Brabender (Brabender, Duisburg, Alemanha) de acordo com o método 54-10 (AACC, 2000). Os parâmetros obtidos do extensograma foram resistência à extensão (R_{50} – UB), extensibilidade (E – mm) e a taxa entre a resistência a extensão e a extensibilidade (R_{50}/E).

4.2.4.2.3 Propriedades de pasta da farinha de trigo

As propriedades de pasta da farinha de trigo controle e das adicionadas de 5, 10 e 20 U/100 g de farinha de trigo de CGTase e de 0,25, 0,5 e 1,0 % (m/m em relação ao peso da farinha) de β CD foram determinadas, em triplicata, utilizando um Rápido Viscoanalisador (Rapid Visco Analyser – RVA-4, Newport Scientific, Austrália), de acordo com o método 76-21 (AACC, 2000). O programa Termoclines for Windows foi utilizado para o processamento dos dados.

4.2.4.2.4 Propriedades térmicas da farinha de trigo

As propriedades térmicas da farinha de trigo controle e das adicionadas de 5, 10 e 20 U/100 g de farinha de trigo de CGTase e de 0,25, 0,5 e 1,0 % (m/m em relação ao peso da farinha) de β CD foram determinadas utilizando um Calorímetro Exploratório de Varredura (Differential Scanning Calorimeter – DSC, Pyris 1 Perkin Elmer, USA) de acordo com método descrito por Oliveira et al. (2010). Índio foi utilizado para calibração do equipamento.

Amostras de 2 mg em base seca da farinha foram pesadas em recipientes de alumínio próprios para o equipamento (Perkin Elmer), misturadas com 6 μ L de água deionizada com e sem CGTase e β CD e seladas em aparelho acessório do DSC. Depois de selados, os recipientes foram mantidos por 2 horas em temperatura ambiente e colocados no equipamento. Os recipientes foram aquecidos a uma razão de 5 °C/minuto de 25 °C a 125 °C. Um recipiente vazio foi utilizado como referência. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia da farinha de trigo foram determinadas utilizando o software Pyris 1 da Perkin Elmer, USA. As panelinhas com as amostras gelatinizadas foram armazenadas a 4 °C por 14 dias para estudo da influência da CGTase e da β CD sobre a retrogradação da amilopectina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5 Produção do pão

A fórmula da massa do pão utilizada foi aquela descrita por Oliveira (2010) com modificações. A formulação consistiu de farinha de trigo (100 %), levedura desidratada (2 %), sal (1,5 %), açúcar (3 %), gordura vegetal hidrogenada (3 %) e água. A quantidade de água adicionada foi aquela determinada nas análises farinográficas da farinha de trigo sem e com CGTase e β CD. As porcentagens foram calculadas em relação ao peso da farinha de trigo. A CGTase (5, 10 e 20 U/100g de farinha de trigo), assim como a β CD (0,25, 0,5 e 1,0 % m/m em relação à massa da farinha) foram solubilizadas na água a ser usada na formulação. A farinha, o açúcar, a gordura vegetal foram adicionados e misturados por 1 minuto em batedeira planetária (Lieme, BP-12SL). Em seguida foi adicionada parte da água e o fermento e misturados por mais 1 minuto. Por último foi adicionado o sal diluído em pequena quantidade de água para facilitar o seu acesso por toda a massa, e a mesma foi misturada de acordo com o tempo de desenvolvimento obtido nas análises farinográficas da farinha, sem e com CGTase e β CD. A massa permaneceu em descanso por 15 minutos, a 32 °C e 80 % de UR. Após este período, a massa foi dividida em porções de 100 g, boleadas e submetidas ao descanso por mais 15 min. As massas foram mecanicamente laminadas, enroladas (Universo, MQ, Brasil) e enformadas, em formas de 15 x 8 cm. O descanso final foi realizado a 32 °C e 80 % UR por 60 minutos para os pães controle e daqueles contendo 5 U de CGTase e 90 minutos para os pães contendo β CD e 10 e 20 U de CGTase. Os pães foram forneados a 150 °C por 15 minutos, em seguida, esfriados por duas horas a temperatura ambiente. Após o esfriamento, os pães foram embalados em filme plástico e armazenados a 5 °C por 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias para estudo de envelhecimento. Para cada formulação foram feitos 21 pães.

4.2.6 Avaliação tecnológica

4.2.6.1 Avaliação do volume e pH da massa

O aumento do volume das massas de pão adicionadas ou não de CGTase (5, 10 e 20 U/100 g de farinha de trigo) e de β CD (0,25, 0,5 e 1,0 % m/m) durante a fermentação foi determinado de acordo com o método 22-14 descrito na AACC (2000), usando-se um cilindro graduado, e foi calculado pela diferença entre o volume final e o volume inicial da massa. As análises foram realizadas em triplicata para cada formulação.

O pH das massas foi determinado potenciometricamente (Marconi, Brasil). Aproximadamente 10 g de massa foi diluída em 100 mL de água destilada e o pH foi medido imediatamente.

4.2.6.2 Avaliação do volume específico dos pães

O volume dos pães foi determinado, após 2 horas do término do forneamento, de acordo com o método 10-05 da AACC (2000) por deslocamento de sementes. O volume específico foi calculado como a relação volume/peso (cm^3/g). Foram utilizados 3 pães de cada formulação (com e sem CGTase e com e sem β CD) e a análise foi realizada em triplicata para cada pão.

4.2.7 Estudo do envelhecimento dos pães

Os pães adicionados ou não de CGTase e de β CD e armazenados por 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias à 5 °C, foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem analisados.

4.2.7.1 Umidade do miolo e da crosta dos pães

A umidade do miolo e da crosta dos pães foi determinada, em triplicata, de acordo com o método 44-40 AACC (2000). As amostras para determinação da umidade foram obtidas seguindo o método 62-05 da AACC (2000). As amostras, retiradas de três pães de cada formulação, foram, primeiramente, fatiadas, pesadas e dispostas em uma bandeja para secagem a temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Em seguida as amostras foram pesadas novamente e a perda de umidade durante esse período foi calculada pela diferença de peso. Então, as fatias parcialmente secas foram finamente trituradas em um multiprocessador para determinação da umidade em estufa, a 105 °C até peso constante.

4.2.7.2 Atividade de água do miolo dos pães

Atividade de água do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase e de β CD foi medida, em triplicata, usando-se o equipamento Aw Sprint (Novasina), modelo TH-500, à temperatura constante ($25,0 \pm 0,3$ °C).

4.2.7.3 Análise de cor do miolo dos pães

Os parâmetros L^* a^* b^* C^* e h da cor instrumental do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase e β CD foram analisados utilizando um colorímetro ColorFlex (Hunter lab) e software universal com fonte de iluminação D65 e ângulo de visão de 10°, ajustado para refletância especular incluída. Fatias de 25 mm de espessura foram analisadas em triplicata. A análise foi realizada nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15. De acordo com El-Dash; Camargo; Diaz (1982), a avaliação da cor do miolo deve ser feita num mesmo ponto porque a granulidade é raramente uniforme na massa, sendo geralmente mais fina e uniforme nas extremidades que no meio da massa. Além disso, a análise de cor deve ser feita em superfícies recentemente cortadas, pois o miolo tende à escurecer um pouco após exposição prolongada da superfície cortada.

4.2.7.4 Avaliação da firmeza do miolo do pão

A firmeza do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase e β CD e armazenados nos diferentes tempos (0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias), foi determinada com o uso de um texturômetro (modelo – TA – XT plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) de acordo com método 74-09 da AACC (2000). A força (Newton) máxima requerida para comprimir a 40 % da altura original de uma fatia do miolo com 25 mm de espessura e com diâmetro maior que 36 mm, utilizando velocidade de teste de 1,70 mm/s e uma sonda circular de alumínio (probe 36 – 36 mm de diâmetro), foi determinada e usada como o valor da firmeza do miolo. O programa Exponent foi utilizado para o processamento dos dados. Todas as determinações foram realizadas com seis repetições.

4.2.7.5 Análise térmica do miolo dos pães

As propriedades térmicas do miolo dos pães controle e dos adicionados de CGTase e β CD e armazenados nos diferentes tempos (0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias) foram determinadas utilizando um Calorímetro Exploratório de Varredura (Differential Scanning Calorimeter – DSC, Pyris 1 Perkin Elmer, USA), seguindo o método utilizado por Oliveira (2010) com modificações. Índio foi utilizado para calibração do equipamento. As amostras frescas e

armazenadas foram trituradas, liofilizadas e maceradas e 2 mg de miolo foram pesados em recipientes de alumínio próprios para o equipamento, misturadas com 6 μ L de água deionizada e seladas em aparelho acessório do DSC. Os recipientes selados foram mantidos a temperatura ambiente por no mínimo 12h para equilíbrio e aquecidas a uma razão de 5 °C/min de 25 °C a 100 °C. Um recipiente vazio foi utilizado como referência. A variação de entalpia foi determinada utilizando o software Pyris 1 da Perkin Elmer, USA. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.7.6 Difrração de raios-X do miolo dos pães

As umidades do miolo dos pães, controle e contendo CGTase e β CD, liofilizados, foram equilibradas em dessecador contendo solução de BaCl₂ saturada (25 °C, a_w = 0,9) durante 5 dias. Os padrões de difração de raios-X do miolo dos pães foram determinados utilizando um difractômetro de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan), com radiação de Cu, linha K, λ = 1,542 Å. A velocidade de varredura utilizada foi de 2° por minuto e as condições de uso foram 30 kV e 15 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas seguindo o método de Nara e Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram analisados através de gráficos, tabelas e análises estatísticas, adotando para os experimentos o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram avaliados através do programa Statistica 7.0, abrangendo a análise descritiva dos dados pela análise de variância do teste F (ANOVA), comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS

Os resíduos passíveis de destruição foram descartados e aqueles não passíveis de destruição foram devidamente separados, embalados e rotulados, encaminhados para o entreposto do Instituto. Ambos os procedimentos foram realizados de acordo com critérios estabelecidos pela Comissão Interna de Segurança Química do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ UNESP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA CGTASE

Os dados da produção da CGTase estão resumidos na Tabela 1. A atividade da CGTase é comumente verificada usando a propriedade que a β CD sintetizada pela ação da CGTase tem de formar complexos de inclusão coloridos com a fenolftaleína em pH básico. Assim a concentração de β CD é estimada espectrofotometricamente. Os tubos contendo os complexos de inclusão apresentam uma coloração mais clara com relação aos tubos onde não há formação do complexo, onde a fenolftaleína assume sua cor característica em pH básico (vermelho intenso) (Oliveira 2010).

O extrato bruto foi concentrado por ultrafiltração aproximadamente 8 vezes apresentando uma atividade de 41 U/mL. As unidades enzimáticas da CGTase concentrada aumentaram cerca de 59 vezes quando comparada com o extrato bruto.

Tabela 1: Volume, teor protéico e atividades dextrinizante e de fenolftaleína dos extratos de enzima bruto e concentrado produzidos a partir da bactéria *Bacillus clausii* E16.

		Extrato Bruto	Extrato Bruto Concentrado
	Volume (mL)	700	90
	Proteína inicial (mg/mL)	0,13	0,11
	Proteína total (mg)	92,67	9,81
Atividade Dextrinizante	U/mL	9,60	295
	U total	6723	26517
	Atividade específica (U/mg)	72,54	2702
	Fator de purificação	1	37,25
	Rendimento (%)	100	395
Atividade Fenolftaleína	U/mL	0,70	41
	U total	490	3690
	Atividade específica (U/mg)	5,3	4,5
	Fator de purificação	1	71,08
	Rendimento (%)	100	753

Jemli et al. (2007) produziu CGTase a partir da *Paenibacillus pabuli* US132 e obteve uma enzima purificada com atividade específica de 4000 U/mg. Oliveira (2010) trabalhando com CGTase parcialmente purificada, a partir da ultrafiltração do extrato bruto, obteve uma atividade específica de 9,6 U/mg, um rendimento de 94,2 % e um fator de purificação de 6,6.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE TRIGO

5.2.1 Composição química da farinha de trigo

A composição química da farinha de trigo está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição química da farinha de trigo¹.

Componentes	Porcentagem
<i>Umidade</i>	15,1 ± 0,2
<i>Proteínas*</i>	12,8 ± 0,6
<i>Lipídeos</i>	1,3 ± 0,0
<i>Cinzas</i>	0,7 ± 0,0
<i>Carboidratos Totais**</i>	70,1

¹Média de três replicatas seguida do desvio-padrão. **Determinado por diferença. *fator N x 5,7.

Os componentes da farinha de trigo podem ser classificados em seis grupos: amido, proteínas de reserva (glúten), proteínas solúveis em água, polissacarídeos não-amiláceos, lipídeos e compostos inorgânicos (cinzas) (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

Da proteína total na farinha de trigo, cerca de um sexto é proteína solúvel (albuminas e globulinas). De acordo com Guarienti (1996), para fabricação de pão francês, o teor de proteína ideal situa-se na faixa de 10,5 a 13,0 %, calculado em base seca. O conteúdo de proteínas encontrado na farinha de trigo utilizada neste trabalho foi de 12,8 %, portanto, teor de proteína ideal para produção de pães. Valor semelhante foi encontrado por Oliveira (2010), para uma farinha de trigo usada em panificação.

Neste trabalho, o teor de lipídeos encontrado na farinha de trigo foi de 1,3 %. De acordo com Guarienti (1996), apesar do conteúdo de lipídeos em farinha de trigo ser baixo, eles têm uma participação importante na formação da estrutura da massa, pois interagem tanto com as proteínas quanto com o amido. Quando a farinha é hidratada, ocorre a ligação dos lipídeos com as proteínas o que auxilia na estruturação da massa e, consequentemente, na retenção de gás carbônico. As farinhas desengorduradas não devem ser utilizadas para produção de pães.

O teor de cinzas da farinha de trigo está diretamente relacionado à taxa de extração. Farinhas com alto teor de cinzas apresentam uma alta taxa de extração, estando esta última relacionada à qualidade dos produtos de panificação (OLIVEIRA, 2010). O conteúdo de cinzas é um dado extremamente importante quando há a necessidade de se conhecer a pureza da farinha, com relação à presença de farelo, pois o resíduo remanescente após moagem representa o conteúdo de minerais na amostra (ATWELL, 2001). A farinha de trigo contém

cerca de 0,5 % de cinzas (CAUVAIN; YOUNG, 2009), próximo ao valor encontrado para a farinha utilizada neste trabalho, que foi de 0,7 %.

Com os dados da composição química, baseado na Instrução Normativa nº 8, de 2 de junho de 2005, pode-se afirmar que a farinha de trigo utilizada neste trabalho é do tipo 1, com teor de cinzas menor que 0,8 %, conteúdo de proteínas maior que 7,5 % e umidade máxima de 15 %.

5.3 EFEITO DA CGTASE NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DA FARINHA DE TRIGO, QUALIDADE E TAXA DE ENVELHECIMENTO DE PÃES

5.3.1 Propriedades farinográficas e extensográficas da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase

As propriedades farinográficas e extensográficas da farinha de trigo controle e daquelas adicionadas de CGTase (5, 10 e 20 U/100g de farinha) estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Propriedades farinográficas e extensográficas (135 min) da farinha de trigo controle e adicionada de 5, 10 ou 20 U/100g de farinha de CGTase (n = 1).

Parâmetros	Concentração de CGTase (U/100g farinha)			
	Controle	5	10	20
<i>Farinógrafo</i>				
Absorção de água (%)	56,5	59,0	59,0	57,2
Desenvolvimento (min)	9,3	10,3	10,5	10,0
Estabilidade (min)	11,4	12,5	12,3	13,3
ITM (UB*)	48	30	30	30
<i>Extensógrafo (135 min)</i>				
Extensibilidade (mm)	102	102	94	97
R ₅₀ (UB*)	518	920	792	897
Taxa (R ₅₀ /E)	5	9	9	9

*UB – Unidades Brabender; ITM - Índice de tolerância à mistura; R₅₀ – resistência à extensão; E – extensibilidade.

A presença de CGTase, independente da concentração utilizada, aumentou a absorção de água, o tempo de desenvolvimento e o tempo de estabilidade da massa, enquanto reduziu o índice de tolerância à mistura (ITM). Valores semelhantes foram encontrados por Oliveira (2010) ao estudar o efeito da adição de 15 e 30 U de CGTase parcialmente purificada sobre as características farinográficas da farinha de trigo.

De acordo com Atwell (2001), uma farinha com boas características de panificação possui alta absorção de água, e altos tempos de desenvolvimento e estabilidade. O ITM e o tempo de estabilidade indicam o quanto uma farinha ainda pode ser trabalhada depois do tempo de desenvolvimento. Altos tempos de estabilidade e baixos valores de ITM representam uma farinha boa para panificação (ATWELL, 2001). De acordo com Pizzinato (1997), farinhas com ITM entre 15 e 50 UB são consideradas farinhas fortes.

A adição de CGTase, independente da concentração, não afetou a extensibilidade da massa, porém o aumento da concentração de CGTase aumentou a resistência à extensão e a taxa R_{50}/E . De acordo com Pizzinato (1997), farinhas com R_{50}/E acima de 2,5 são consideradas fortes. As características extensográficas estão relacionadas à qualidade e quantidade das proteínas formadoras do glúten presentes na farinha de trigo (PUPPO et al., 2005). Quando hidratada, a gliadina é viscosa e pode ser esticada formando um fio fino, conferindo extensibilidade à massa. Já a glutenina proporciona elasticidade e resistência à extensão da massa (ATWELL, 2001).

De acordo com Stampfli, Nersten e Molteberg (1996), o aumento da resistência à extensão (R_{50}) melhora a manipulação da massa e aumenta a tolerância à fermentação, especialmente durante a etapa final de fermentação. A farinha ideal para produção de pão apresenta um equilíbrio entre a resistência à extensão e a extensibilidade para suportar a pressão exercida pelo gás carbônico produzido durante a fermentação, e para que a massa sofra deformação adequada para a formação da estrutura do miolo dos pães (OLIVEIRA, 2010).

A adição de CGTase, independente da concentração, melhorou as características reológicas da farinha.

5.3.2 Propriedades de pasta da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase

O RVA mede o comportamento durante a gelatinização e as propriedades de pasta do amido por meio do controle da resistência ao torque de uma mistura de farinha e água, durante o aquecimento e o resfriamento (SCHEUER et al., 2011).

As propriedades de pasta da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase (5, 10 e 20 U/100g de farinha de trigo) estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Propriedades de pasta da farinha de trigo sem e com CGTase (U/100g farinha).

Amostra	T. pasta (°C)	Viscosidade (RVU)			
		Pico	Quebra	Final	Setback
<i>Controle</i>	94,1 ± 0,5 ^a	245,6 ± 3,1 ^a	63,1 ± 1,4 ^b	304,0 ± 2,9 ^{bc}	121,5 ± 2,8 ^c
<i>5U</i>	92,9 ± 1,5 ^a	250,7 ± 4,8 ^a	80,2 ± 6,4 ^a	316,9 ± 8,1 ^{ab}	146,4 ± 4,1 ^{ab}
<i>10U</i>	93,6 ± 0,1 ^a	249,5 ± 3,5 ^a	81,9 ± 2,9 ^a	318,1 ± 4,6 ^a	150,5 ± 2,1 ^a
<i>20U</i>	94,0 ± 0,5 ^a	227,6 ± 5,9 ^b	70,1 ± 5,3 ^b	294,3 ± 7,1 ^c	139,8 ± 8,1 ^b

*Média de três replicatas, seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p > 0,05).

A temperatura de pasta da farinha não foi significativamente alterada na presença de CGTase, independente da concentração utilizada. A viscosidade de pico e final foram reduzidas na presença de 20 e 10 U de CGTase, respectivamente, enquanto que para as demais concentrações não houve diferença significativa quando comparadas ao controle. Os valores do *setback* foram aumentados com a adição de CGTase, independente da concentração.

De acordo com Oliveira (2010), a CGTase é uma enzima amilolítica que quebra as ligações α -1,4 do amido produzindo moléculas com menor massa molecular como as dextrinas e os oligossacarídeos, reduzindo a viscosidade de pico. No entanto, para as concentrações utilizadas neste estudo, pode-se notar a redução da viscosidade de pico e final apenas quando 20U de CGTase foi utilizada.

Gujral et. al (2003) verificaram que a adição de CGTase nas concentrações de 20 e 40 μ L/100g de farinha de arroz reduziu as viscosidades de pico e final e aumentou a viscosidade de quebra, indicando que a pasta tornou-se menos resistente ao calor e ao cisalhamento porque o amido foi mais hidrolisado pela CGTase.

Gujral e Rosell (2004) mostraram que a presença da CGTase, nas concentrações de 20 e 40 μ L/100g de amido de trigo, reduziu as viscosidades de pico e final e também o *setback*, e aumentou a viscosidade de quebra das suspensões de amido de trigo, quando comparadas ao controle. Para esses autores, esses resultados podem ser atribuídos a capacidade que a CGTase tem de hidrolisar o amido e produzir dextrinas e ciclodextrinas. Resultados semelhantes eram esperados neste estudo, no entanto, apenas a amostra contendo 20U de CGTase apresentou redução nas viscosidades de pico. Em concentrações menores, a quantidade de CGTase pode não ter sido suficiente para reduzir as viscosidades de pico e final, quando comparadas ao controle. Além disso, a presença de proteínas também justificaria os resultados encontrados, uma vez que as análises foram realizadas com farinha de trigo e não com amido de trigo.

5.3.3 Propriedades térmicas da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase

As propriedades térmicas da farinha de trigo controle e adicionadas de CGTase (5, 10 e 20U) estão apresentadas na Tabela 5.

A faixa de temperatura de gelatinização do amido presente na farinha de trigo controle esteve entre 61,88 e 74,03 °C. Os lipídeos polares presentes nos cereais podem formar complexos com a amilose, no momento em que o amido é aquecido. A amilose forma uma hélice e no eixo desta hélice – onde se encontram os radicais hidrofóbicos do polímero – se inclui a cadeia graxa, formando ligações com estes radicais. Em realidade, muitas moléculas podem formar complexos com a amilose, desde que apresentem uma parte hidrofóbica (FRANCO et al., 2001). A faixa de temperatura de dissociação deste complexo esteve entre 89,23 a 102,96 °C.

Tabela 5: Propriedades térmicas de gelatinização da farinha de trigo e do complexo amilose-lipídeo sem e com CGTase (U/100g farinha).

Concentração de CGTase	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g)
<i>Controle</i>	61,88 ± 0,34 ^a	67,92 ± 0,34 ^a	74,03 ± 0,73 ^a	8,03 ± 0,34 ^a
<i>5U</i>	58,70 ± 0,14 ^b	62,78 ± 0,20 ^b	67,43 ± 0,10 ^b	6,01 ± 0,22 ^b
<i>10U</i>	58,17 ± 0,22 ^b	62,92 ± 0,38 ^b	67,56 ± 0,11 ^b	6,29 ± 0,13 ^b
<i>20U</i>	61,82 ± 2,30 ^a	63,10 ± 0,18 ^b	67,13 ± 0,50 ^b	6,16 ± 0,16 ^b
Complexo amilose-lipídeo				
	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔH _{comp.} (J/g)
<i>Controle</i>	89,23 ± 0,27 ^b	96,84 ± 0,51 ^a	102,96 ± 0,44 ^a	1,17 ± 0,02 ^b
<i>5U</i>	89,70 ± 0,63 ^b	92,82 ± 1,70 ^b	97,38 ± 1,07 ^b	0,79 ± 0,02 ^c
<i>10U</i>	89,41 ± 0,07 ^b	90,81 ± 0,09 ^b	92,99 ± 1,11 ^c	1,43 ± 0,07 ^a
<i>20U</i>	91,14 ± 0,30 ^a	92,09 ± 1,78 ^b	94,25 ± 1,91 ^c	1,23 ± 0,06 ^b

*T₀, T_p, T_f = temperaturas inicial, de pico e final, respectivamente; ΔH = variação de entalpia. Média de três replicatas seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p > 0,05).

A adição de CGTase, independente da concentração, reduziu significativamente as temperaturas de gelatinização e variação da entalpia (ΔH) do amido e também a temperatura e entalpia de dissociação dos complexos amilose-lipídeo, quando comparadas ao controle. Essa redução pode estar relacionada com a temperatura ótima de atuação da enzima. A faixa de temperatura de gelatinização do amido presente na farinha de trigo, na presença de CGTase, esteve entre 58,17 e 67,56 °C, próximo da temperatura ótima de atividade enzimática encontrada por Oliveira (2010) ao trabalhar com CGTase produzida a partir de *Bacillus clausii* E16, que foi de 55 °C. Nessas condições, a enzima atuou sobre o amido liberando

dextrinas de menor massa molecular que contribuíram para a redução nas propriedades térmicas da farinha.

Todas as farinhas gelatinizadas foram armazenadas durante 14 dias à temperatura de 4 °C para avaliação da retrogradação da amilopectina (Tabela 6). As temperaturas de transição e a variação de entalpia de todas as amostras retrogradadas foram menores que aquelas apresentadas na Tabela 5. Com o resfriamento, as moléculas de amilose e amilopectina se reorganizam novamente através de pontes de hidrogênio, formando uma estrutura mais organizada, semelhante à estrutura predominante antes da gelatinização (ATWELL, 2001). Essa recristalização, que ocorre durante longos períodos de estocagem, é devido principalmente a reassociação das cadeias de amilopectina. Os cristais formados durante a retrogradação tem um nível de organização menor do que no amido nativo, dessa forma as temperaturas de transição e variação de entalpia são reduzidas.

Tabela 6: Propriedades térmicas de retrogradação da farinha de trigo* e do complexo amilose-lipídeo sem e com CGTase (U/100 g farinha).

Concentração de CGTase	T₀ (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	ΔH_{ret} (J/g)
<i>Controle</i>	49,10 ± 0,48 ^a	58,82 ± 0,84 ^a	65,36 ± 0,58 ^a	1,28 ± 0,04 ^a
<i>5U</i>	46,48 ± 0,28 ^b	53,62 ± 0,06 ^b	58,91 ± 0,38 ^b	1,03 ± 0,07 ^b
<i>10U</i>	45,62 ± 0,78 ^b	54,05 ± 0,54 ^b	58,61 ± 0,31 ^b	1,18 ± 0,08 ^{ab}
<i>20U</i>	49,84 ± 1,36 ^a	53,90 ± 0,58 ^b	58,82 ± 0,09 ^b	1,09 ± 0,07 ^{ab}
Complexo amilose-lipídeo				
	T₀(°C)	T_p(°C)	T_f(°C)	ΔH_{comp.}(J/g)
<i>Controle</i>	86,59 ± 1,08 ^b	98,70 ± 0,39 ^a	104,58 ± 0,22 ^a	2,31 ± 0,02 ^a
<i>5U</i>	87,63 ± 0,23 ^{ab}	94,93 ± 0,79 ^b	99,41 ± 0,47 ^b	1,39 ± 0,11 ^b
<i>10U</i>	88,15 ± 0,64 ^{ab}	94,89 ± 0,67 ^b	98,67 ± 0,36 ^{bc}	1,17 ± 0,06 ^c
<i>20U</i>	90,94 ± 2,91 ^a	94,35 ± 0,16 ^b	96,94 ± 1,84 ^c	1,09 ± 0,06 ^c

*T₀, T_p, T_f = temperaturas inicial, de pico e final, respectivamente; ΔH_{ret} = variação de entalpia. Média de três replicatas seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p > 0,05).

A presença de CGTase reduziu o ΔH_{ret} da farinha, independente da concentração utilizada, quando comparado com o controle (Tabela 6). Oliveira (2010) ao estudar o efeito da adição de 15 e 30U de CGTase sobre a entalpia de retrogradação da farinha de trigo também observou redução significativa do ΔH_{ret} das amostras contendo a enzima. De acordo com Jemli et al. (2007), Shim et al. (2007) e Oliveira (2010) a capacidade da CGTase de hidrolisar a amilose e a amilopectina em frações menores pode reduzir a retrogradação dessas moléculas. Além disso, as ciclodextrinas formadas pela ação da CGTase podem formar

complexos com os lipídeos nativos da farinha de trigo, reduzindo, assim, a retrogradação do amido.

5.3.4 Avaliação tecnológica

5.3.4.1 Avaliação do volume e pH das massas dos pães controle e adicionadas de CGTase

O pH e o volume das massas, controle e adicionadas de CGTase (5, 10 e 20 U/100 g farinha), durante o período de fermentação estão apresentados na Tabela 7.

A fermentação das massas foi realizada à temperatura de 32°C por 60 minutos para os pães controle e daqueles adicionados de 5 U de CGTase. Já para os pães contendo 10 e 20 U de CGTase foram necessários 90 minutos para a fermentação ideal. De acordo com Almeida (2011) a fermentação da massa deve ser otimizada para a produção de produtos assados de boa qualidade. Tempo de fermentação insuficiente resulta em volume reduzido e estrutura pobre do miolo, enquanto que tempo de fermentação excessivo produzirá massa de baixa viscosidade e pegajosa.

O pH das massas foi medido no início e após o término da fermentação. A massa fresca deve ter um pH inicial entre 5,5 e 5,8, o que foi observado para as massas controle e contendo 10 e 20 U de CGTase. No entanto, massas contendo 5 U de CGTase apresentaram uma redução significativa de pH inicial e final (5,3 e 5,2, respectivamente), quando comparadas ao controle. A principal mudança do pH na massa durante o processo é causada pela produção de CO₂ durante a fermentação. As moléculas de CO₂ se associam às moléculas de água para formar ácido carbônico que por sua vez se dissocia parcialmente para formar íons H⁺ e HCO₃⁻. Além disso, pode ocorrer a produção de ácido acético e ácido lático a partir de pequenas quantidades de bactérias presentes na farinha e no fermento. A produção de ácidos orgânicos influenciam na redução do pH da massa ao final da fermentação, que deve se encontrar entre 4,7 e 5,0 (SLUIMER, 2005), como foi observado para todas as massas estudadas.

Tabela 7: pH da massa antes e depois da fermentação, volume da massa do pão controle e adicionada de CGTase (U/100g farinha).

Massa	pH _{inicial}	pH _{final}	Volume (mL)
<i>Controle</i>	5,5 ± 0,0 ^b	5,4 ± 0,0 ^b	450 ± 27 ^{ab}
<i>5U</i>	5,3 ± 0,1 ^c	5,2 ± 0,0 ^c	490 ± 7 ^a
<i>10U</i>	5,8 ± 0,0 ^a	5,4 ± 0,0 ^b	420 ± 7 ^{bc}
<i>20U</i>	5,8 ± 0,0 ^a	5,6 ± 0,0 ^a	370 ± 20 ^c

*Média de três replicatas seguida do desvio-padrão. **CGTase (U/100g de farinha de trigo). Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p>0,05).

O volume das massas contendo 5 e 10 U de CGTase não apresentou diferença significativa quando comparadas ao controle, enquanto que a presença de 20U de CGTase provocou uma redução no volume das massas em relação ao volume da massa controle. A CGTase converte o amido em dextrinas cíclicas não redutoras, além da produção de dextrinas de baixo peso molecular e oligossacarídeos. Os oligossacarídeos liberados pela ação da CGTase podem ser transformados em maltose pela ação da β -amilase endógena da farinha e esse dissacarídeo pode ser metabolizado pela levedura (OLIVEIRA, 2010). A produção excessiva de dextrinas aumenta a capacidade de ligação do amido com a água, já que as dextrinas são mais solúveis do que as longas cadeias de amilose e amilopectina, podendo produzir um xarope viscoso, resultando em uma massa pegajosa e densa (ATWELL, 2001). Sendo assim, concentrações elevadas de CGTase apresentam uma ação negativa sobre o volume e o aspecto da massa por produzirem dextrinas em excesso, o que pode ter ocorrido com as massas contendo 10 e 20 U de CGTase/100g de farinha neste trabalho.

5.3.4.2 Avaliação do volume específico dos pães controle e adicionados de CGTase

Os volumes específicos dos pães controle e adicionados de CGTase (5, 10 e 20 U/100g farinha) estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Volume específico dos pães controle adicionados de CGTase (U/100g farinha) .

Pão	Volume específico (cm ³ /g)
<i>Controle</i>	4,9 ± 0,1 ^b
<i>5U CGTase</i>	5,5 ± 0,2 ^a
<i>10U CGTase</i>	4,7 ± 0,2 ^b
<i>20U CGTase</i>	3,7 ± 0,2 ^c

*Média de nove replicatas seguida do desvio-padrão. **CGTase (U/100g de farinha de trigo). Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p>0,05).

A presença de 5U de CGTase aumentou significativamente o volume específico do pão (11 %) quando comparado ao pão controle. A adição de 10U de CGTase não alterou o volume específico dos pães, enquanto o uso de 20U de CGTase provocou redução de 26 %. Esses resultados acompanharam aqueles obtidos para os volumes das massas durante a fermentação (Tabelas 7).

De acordo com Jemli et al. (2007) a adição de 0,4 g de CGTase/100g de farinha de trigo aumentou em 11 % o volume dos pães quando comparados ao controle. Para esses autores, o aumento do volume do pão, na presença de CGTase, não está exclusivamente ligado às condições de fermentação, mas depende das interações entre as ciclodextrinas produzidas durante a ação da enzima e a matriz protéica da massa.

Gujral et al. (2003) mostraram que a adição de CGTase (20 µL/100g de farinha de arroz) aumentou o volume específico do pão de arroz em 73 %. Para esses autores, a CGTase atua de forma similar a α -amilase, hidrolisando o amido e liberando açúcares fermentáveis, provocando, assim, o aumento do volume específico dos pão.

Neste trabalho, o aumento do volume específico do pão com a adição de 5U de CGTase pode estar relacionado à maior viscosidade de pico (Tabelas 4) e maior capacidade de absorção de água pela farinha de trigo. Nessas concentrações, as massas contendo CGTase tornaram-se mais elásticas (Tabelas 3), tornando-as, portanto, capazes de reter mais CO₂ durante a fermentação aumentando assim os volumes das massas e dos pães. No entanto, para os pães adicionados de concentrações maiores de CGTase (10U e 20U de CGTase/100g de farinha), a produção excessiva de dextrinas pela CGTase pode ter prejudicado o volume dos pães.

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2010) que verificou um aumento no volume de pães de 3,8 e 13,2 % quando 15U e 30U de CGTase/100g de farinha foram adicionadas, respectivamente, mas houve uma redução de 26 % do volume específico quando 75 U/100g de farinha foram adicionadas.

5.3.5 Estudo do envelhecimento dos pães controle e adicionadas de CGTase.

5.3.5.1 Umidade e atividade de água dos pães controle e adicionados de CGTase

O conteúdo de água no pão está diretamente relacionado à sua maciez. A redistribuição da água, tanto em nível macroscópico como microscópico, afeta o envelhecimento do pão. Em geral, quanto maior a quantidade de água no pão fresco, mais lento será o envelhecimento (CAUVAIN; YOUNG, 2009). Os teores de umidade do miolo e

da crosta dos pães controle e adicionados de CGTase (5, 10 e 20 U/100g farinha), frescos e armazenados por 15 dias, estão apresentados na Tabela 9.

A adição de CGTase aumentou significativamente a umidade do miolo dos pães frescos e na concentração de 5U melhorou a retenção da água do miolo dos pães até o sétimo dia de armazenamento.

A presença de 5 e 10 U/100 g farinha de CGTase reduziu a umidade da crosta dos pães frescos e aumentou quando 20 U de CGTase foi utilizada, quando comparado ao controle.

A CGTase produz, além de ciclodextrinas não redutoras, dextrinas lineares e oligossacarídeos que são carboidratos higroscópicos e podem ajudar na retenção de umidade dos pães contendo a enzima. Além disso, a presença da CGTase aumentou a absorção de água nas farinhas (Tabela 3) o que poderia explicar o aumento de umidade do miolo dos pães contendo CGTase.

De acordo com Cauvain; Young (2009), durante o resfriamento do pão, um gradiente de umidade é formado. Diferenças nas pressões de vapor entre a crosta e a região interna resultam na migração de umidade do miolo para a crosta. Com uma quantidade de umidade inicial baixa, a crosta facilmente absorve água do miolo. Este fenômeno pode ser observado para as amostras controle e adicionados de CGTase independente da concentração utilizada.

De acordo com Cauvain e Young (2009) a quantidade de água ligada aumenta ligeiramente com o envelhecimento do pão, enquanto a quantidade de água livre diminui. O amido muda do estado amorfo para o estado cristalino mais estável, enquanto as moléculas de água se imobilizam conforme são incorporadas na estrutura cristalina, resultando na diminuição da mobilidade da água durante o processo de envelhecimento.

Tabela 9: Teor de umidade do miolo e da crosta dos pães controle e adicionados de CGTase (U/100g farinha) durante armazenamento.

Tempo de Armazenamento (dias)	Amostras			
	Miolo			
	<i>Controle</i>	<i>5U</i>	<i>10U</i>	<i>20U</i>
0	39,56 ± 0,38 ^{Ad}	40,27 ± 0,13 ^{Ac}	43,37 ± 0,02 ^{Aa}	42,69 ± 0,12 ^{Ab}
1	36,50 ± 0,08 ^{Bd}	40,33 ± 0,11 ^{Aa}	39,84 ± 0,02 ^{Bb}	39,53 ± 0,05 ^{Bc}
3	35,95 ± 0,10 ^{Cb}	36,03 ± 0,16 ^{Cb}	38,67 ± 0,03 ^{Ca}	38,83 ± 0,08 ^{Ca}
5	34,21 ± 0,05 ^{Dd}	36,40 ± 0,14 ^{Bc}	37,02 ± 0,02 ^{Eb}	37,52 ± 0,05 ^{Da}
7	33,73 ± 0,08 ^{Ed}	35,39 ± 0,07 ^{Dc}	37,24 ± 0,04 ^{Da}	36,33 ± 0,04 ^{Eb}
10	33,16 ± 1,14 ^{Eb}	33,44 ± 0,12 ^{Eb}	36,10 ± 0,14 ^{Fa}	36,51 ± 0,14 ^{Ea}
15	33,17 ± 0,18 ^{Fc}	30,49 ± 0,12 ^{Fd}	35,60 ± 0,07 ^{Ga}	35,01 ± 0,07 ^{Fb}
	Crosta			
	<i>Controle</i>	<i>5U</i>	<i>10U</i>	<i>20U</i>
0	19,00 ± 0,09 ^{Gc}	18,25 ± 0,05 ^{Fd}	19,53 ± 0,09 ^{Gb}	20,71 ± 0,09 ^{Ga}
1	22,20 ± 0,04 ^{Fb}	21,78 ± 0,04 ^{Ec}	23,34 ± 0,09 ^{Fa}	23,24 ± 0,03 ^{Fa}
3	25,35 ± 0,11 ^{Cc}	24,63 ± 0,32 ^{Dd}	27,50 ± 0,05 ^{Ea}	26,16 ± 0,07 ^{Db}
5	24,61 ± 0,06 ^{Dd}	25,22 ± 0,34 ^{Cc}	29,60 ± 0,13 ^{Da}	25,79 ± 0,06 ^{Eb}
7	23,59 ± 0,06 ^{Ed}	27,75 ± 0,16 ^{Bb}	31,49 ± 0,04 ^{Ca}	26,97 ± 0,05 ^{Cc}
10	27,41 ± 0,21 ^{Bd}	30,27 ± 0,03 ^{Ac}	32,71 ± 0,06 ^{Ba}	31,30 ± 0,14 ^{Bb}
15	29,39 ± 0,03 ^{Ac}	27,54 ± 0,17 ^{Bd}	33,44 ± 0,01 ^{Aa}	32,47 ± 0,07 ^{Ab}

*Média de três replicatas seguidas do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p > 0,05).

A atividade de água do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase está apresentada na Tabela 10.

Não houve diferença significativa entre as atividade de água dos pães frescos (tempo zero) controle e daqueles contendo CGTase. Durante o armazenamento, os pães controle tiveram a atividade de água significativamente reduzida, enquanto que os pães contendo CGTase, independente da concentração, praticamente não sofreram mudanças nesse valor durante o armazenamento (Tabela 10). Esses resultados confirmam a capacidade da CGTase de reter água, provavelmente devido a produção de oligossacarídeos mais higroscópicos pela ação da enzima.

Tabela 10: Atividade de água do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (U/100 g farinha) durante armazenamento.

<i>Tempo de Armazenamento</i>	<i>Amostras</i>			
	<i>Controle</i>	<i>5U</i>	<i>10U</i>	<i>20U</i>
0	0,938 ± 0,001 ^{Aa}	0,934 ± 0,006 ^{Aa}	0,938 ± 0,004 ^{Aa}	0,928 ± 0,003 ^{Aa}
1	0,928 ± 0,006 ^{ABb}	0,939 ± 0,003 ^{Aa}	0,931 ± 0,004 ^{ABab}	0,916 ± 0,002 ^{Bc}
3	0,937 ± 0,005 ^{Aa}	0,932 ± 0,002 ^{Aab}	0,929 ± 0,001 ^{Bb}	0,931 ± 0,003 ^{Aab}
5	0,923 ± 0,002 ^{BCb}	0,930 ± 0,003 ^{Aab}	0,931 ± 0,005 ^{ABab}	0,933 ± 0,002 ^{Aa}
7	0,924 ± 0,003 ^{BCa}	0,933 ± 0,003 ^{Aa}	0,932 ± 0,004 ^{ABa}	0,927 ± 0,005 ^{Aa}
10	0,921 ± 0,004 ^{BCb}	0,929 ± 0,005 ^{Aab}	0,937 ± 0,000 ^{ABa}	0,933 ± 0,003 ^{Aa}
15	0,914 ± 0,005 ^{Cb}	0,931 ± 0,004 ^{Aa}	0,932 ± 0,004 ^{ABa}	0,926 ± 0,007 ^{ABab}

*Média de três replicatas seguidas do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.3.5.2 Avaliação da firmeza do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase

A firmeza do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (5,10 e 20 U/100g de farinha) está apresentada na Figura 9.

De acordo com Eliasson e Larsson (1993), a firmeza do miolo aumenta ao longo do tempo, sendo que as alterações mais pronunciadas ocorrem durante o primeiro dia de estocagem, como aconteceu com todas as amostras estudadas. A firmeza do miolo aumentou gradualmente para todas as amostras, controle e com CGTase, durante o armazenamento.

A adição de 5 U de CGTase reduziu aproximadamente 61 % da firmeza do miolo dos pães frescos (tempo zero). Após este período não houve diferença significativa entre a firmeza do pão controle e com 5 U CGTase. A firmeza dos pães contendo 10 U de CGTase não diferiu significativamente dos pães controle, até o 3º dia de armazenamento, sofrendo um aumento significativo após esse período. A presença de 20 U de CGTase aumentou significativamente a firmeza do miolo dos pães quando comparado ao pão controle, durante todo o tempo de armazenamento.

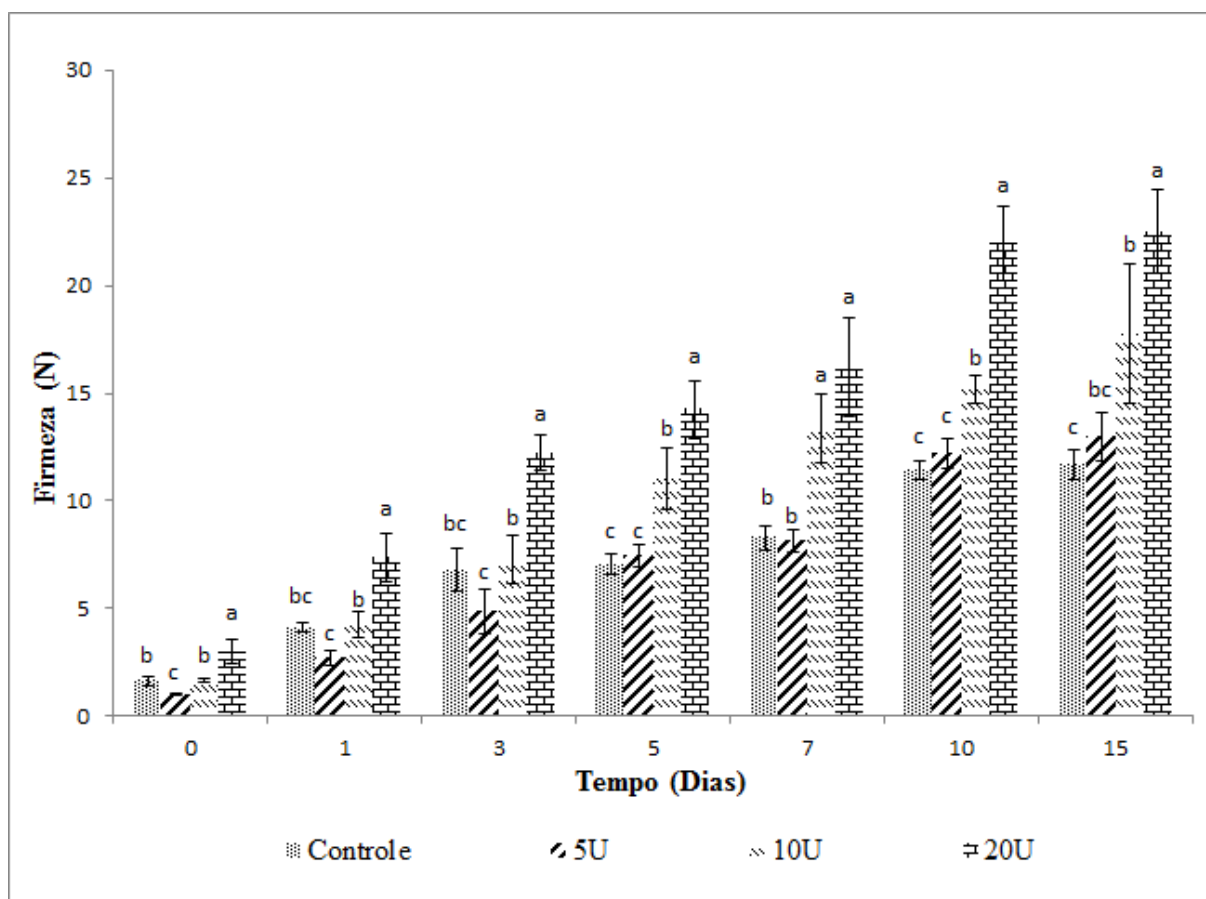


Figura 9: Firmeza (N) do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (5, 10 e 20 U/100g de farinha), frescos e armazenados por até 15 dias. Valores seguidos pela mesma letra minúscula no mesmo tempo de armazenamento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Oliveira (2010), ao adicionar concentrações de 15U e 30U de CGTase, observou redução da firmeza do miolo dos pães do 5º ao 10º dia de armazenamento, quando comparado ao pão controle. Nos três primeiros dias de armazenamento não houve diferença entre as amostras.

Gujral et. al (2003) encontraram uma redução de 53 % da firmeza do miolo de pães produzidos a partir da farinha de arroz quando adicionados de CGTase. Esses autores acreditam que a redução da firmeza desses pães pode estar relacionada com a hidrólise do amido, provocada pela CGTase, e também pela capacidade que a CGTase possui de ciclização dos produtos dessa hidrólise, o que poderia formar complexos com lipídeos e proteínas.

De acordo com Eliasson e Larsson (1993) o envelhecimento do pão pode ser potencializado com a perda de água durante a estocagem e o aumento da retenção de umidade pode aumentar a maciez e reduzir a firmeza do pão. No entanto, essa relação não foi observada neste estudo. Pães contendo CGTase tiveram o conteúdo de umidade do miolo

aumentados quando comparados ao controle (Tabela 9). No entanto, dentre as amostras contendo CGTase, apenas os pães contendo 5 U de CGTase apresentaram redução na firmeza do miolo do pão fresco (Figura 9).

5.3.5.3 Análise térmica do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase

A variação da entalpia (ΔH) de retrogradação do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (5, 10 e 20 U/100 g farinha) durante armazenamento estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Variação da entalpia de retrogradação do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase (U/ 100 g farinha) durante armazenamento.

<i>Tempo de Armazenamento (dias)</i>	<i>ΔH</i>			
	<i>Controle</i>	<i>5U</i>	<i>10U</i>	<i>20U</i>
0	1,41 ± 0,03 ^{Eb}	0,37 ± 0,02 ^{Dd}	1,24 ± 0,03 ^{Cc}	1,93 ± 0,04 ^{Da}
1	1,91 ± 0,11 ^{Db}	1,23 ± 0,04 ^{Cc}	2,16 ± 0,16 ^{Bb}	2,56 ± 0,07 ^{Ca}
3	2,30 ± 0,03 ^{Cb}	1,33 ± 0,09 ^{Cc}	2,40 ± 0,11 ^{ABb}	2,86 ± 0,06 ^{Ba}
5	2,54 ± 0,03 ^{Bb}	2,57 ± 0,03 ^{Bb}	2,55 ± 0,03 ^{Ab}	2,85 ± 0,01 ^{Ba}
7	2,84 ± 0,03 ^{Abc}	3,06 ± 0,09 ^{Aa}	2,64 ± 0,03 ^{Ac}	2,94 ± 0,06 ^{Bab}
10	2,58 ± 0,04 ^{Bb}	3,14 ± 0,15 ^{Bb}	2,59 ± 0,07 ^{Aa}	3,32 ± 0,17 ^{Aa}
15	2,85 ± 0,08 ^{Ab}	2,69 ± 0,05 ^{Ab}	2,67 ± 0,11 ^{Ab}	3,29 ± 0,00 ^{Aa}

ΔH = variação de entalpia. Média de três repetições seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O ΔH aumentou durante o armazenamento para todas as amostras analisadas devido à retrogradação das moléculas de amilopectina durante o envelhecimento dos pães, como ocorreu também com a firmeza.

A adição de 5U de CGTase reduziu significativamente o ΔH do miolo dos pães enquanto que pães contendo 10U de CGTase apresentaram valores semelhantes ao controle até o terceiro dia de armazenamento. No entanto, a presença de 20U de CGTase aumentou os valores de ΔH durante todo o período de armazenamento. Esses resultados sugerem que a CGTase, em baixas concentrações, pode prevenir a retrogradação da amilopectina. Esses valores estão de acordo com aqueles obtidos com a firmeza (Figura 10) onde as amostras contendo 5U de CGTase tiveram menor firmeza que as amostras controle e as amostras contendo 10U de CGTase apresentaram valores de firmeza semelhantes ao controle até o 3º dia de armazenamento.

Hug-Itten et. al (2001) acreditam que o efeito antienvelhecimento de enzimas amilolíticas, como a α -amilase, é devido a capacidade dessas enzimas de produzirem amilopectina parcialmente degradada, que é menos propensa a retrogradação e a produzirem amilose parcialmente degradada que é responsável pela formação rápida de uma rede de polímeros cristalinos (pão fresco) que resiste a rearranjos posteriores. Já para Lee et al. (2002) o efeito benéfico dessas enzimas está relacionado com a capacidade de produção de dextrinas de baixo peso molecular que podem reduzir a taxa de retrogradação do pão através da inibição das interações entre o amido e a matrix protéica. Além disso, para esses autores, as cadeias curtas de amilopectina melhoram a formação de complexos amilopectina-lipídeos o que poderia atrasar a retrogradação da amilopectina.

Neste trabalho, a presença de 5U de CGTase foi suficiente para, juntamente com a α -amilase presente na farinha de trigo, produzir dextrinas e oligossacarídeos que são atacados pela β -amilase da farinha, melhorando assim a estrutura e o volume do pão e prevenindo o envelhecimento do mesmo. No entanto, para concentrações maiores de enzima, provavelmente ocorreu a produção excessiva de dextrinas exercendo um papel negativo nas características do pão.

Contrariando os resultados encontrados neste estudo, Oliveira (2010) observou uma redução significativa e gradual dos valores de ΔH para pães adicionados de 15 e 30 U de CGTase. Para este autor, esses resultados mostram a influência da massa molecular da amilopectina no processo de retrogradação da mesma, já que a CGTase possui uma natureza amilolítica.

5.3.5.4 Difracção de raios-X do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase

Durante a estocagem de pães, as moléculas de amilose e amilopectina são reassociadas gerando uma nova ordem de cristalinidade, apresentando padrões de difracção de raios-x típicos de estrutura do tipo B, onde o crescimento do pico ao redor de $17,4^\circ$ é realçado (AGUIRRE et al. 2011). De acordo com Tian et. al. (2010) padrões cristalinos do tipo B apresentam picos em $5,6^\circ$, $14,9^\circ$, 17° e 22° , enquanto que, o padrão cristalino do tipo V, é caracterizado a partir de picos formados ao redor de $20,1^\circ$, $12,9^\circ$ e $7,4^\circ$, correspondente a formação do complexo de amilose-lipídeo.

Os padrões de difracção de raios-x dos pães controle e adicionados de CGTase, no 3º dia de armazenamento estão apresentados na Figura 10.

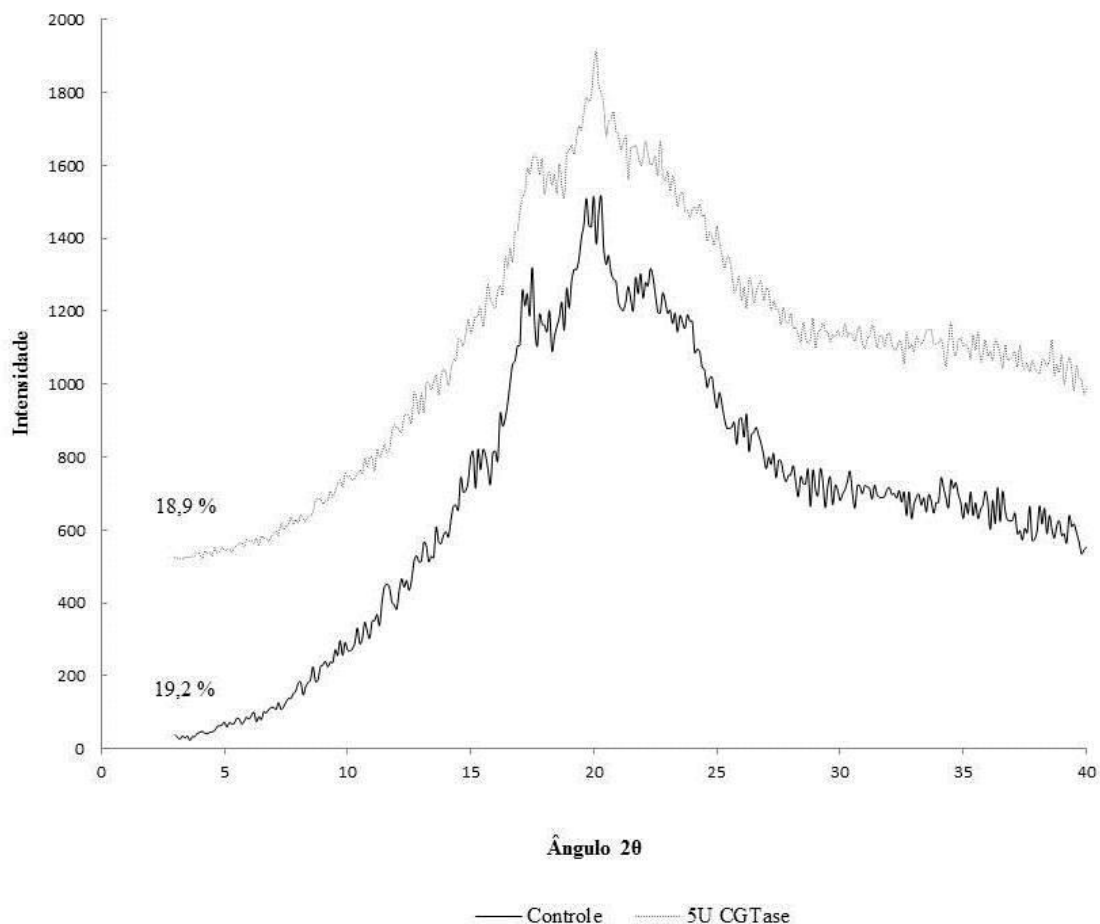


Figura 10: Padrão de difracção de raios-X do miolo de pães controle e adicionados de 5 U de CGTase e armazenados por 3 dias.

Foi observado, para o miolo do pão controle, armazenado por 3 dias, picos ao redor de 15, 17, 20 e 22°, apresentando uma cristalinidade do tipo B e do tipo V, caracterizadas por picos em 17 e 20°, respectivamente. A cristalinidade relativa foi levemente reduzida no miolo do pão contendo CGTase. De acordo com Eliasson e Larsson (1993), o padrão cristalino do tipo B indica um envolvimento da cristalização do amido com o envelhecimento do pão. De acordo com esses autores, a gelatinização do amido no pão também origina padrão cristalino do tipo V, devido a formação dos complexos amilose-lipídeo. Para o pão contendo 5U de CGTase foi observado picos menos intensos, quando comparados ao controle, em 17, 20 e 22°. Esses resultados concordam com os obtidos nas análises térmicas do miolo dos pães, indicando que a CGTase reduziu a taxa de retrogradação da amilopectina presente no pão (Tabela 11) e inibiu o aumento da intensidade do padrão cristalino do tipo B nos pães contendo 5U da enzima e armazenados por 3 dias.

5.3.5.5 Análise de cor do miolo dos pães controle e adicionados de CGTase

No sistema Hunter de cor, corrigido pela $CIE-L^*a^*b^*$ e $CIE-C^*h$, os valores L^* (luminosidade) flutuam entre zero (preto absoluto) e 100 (branco absoluto), os valores de a^* e b^* variam de $-a^*$ (verde) até $+a^*$ (vermelho) e $-b^*$ (azul) até $+b^*$ (amarelo). Os valores de C^* (saturação de cor) representam a intensidade ou saturação da cor e variam entre fraca e forte, e os valores de h representam a tonalidade cromática (FRANCIS; CLYDESDALE, 1975). Os parâmetros de cor observados para o pão controle e adicionados de CGTase (5, 10 e 20 U/100g farinha de trigo) estão apresentados na Tabela 12.

A adição de CGTase não alterou nenhum dos parâmetros de cor nos pães frescos, independente da concentração, quando comparados ao controle. A luminosidade não sofreu alterações durante o armazenamento. Pães armazenados contendo 10 e 20U de CGTase foram mais avermelhados e amarelados, enquanto que a adição 5U de CGTase praticamente não alterou este parâmetro, quando comparado ao controle. Pães armazenados contendo 20U de CGTase apresentaram cores mais intensas e tons mais claros, enquanto que as amostras contendo 5 e 10U praticamente não diferiram do controle.

Esses resultados sugerem que pães com maior volume específico e com menor firmeza no miolo, como foi o caso dos pães adicionados de 5U de CGTase, possuem menor intensidade da cor vermelha e amarela, com menor saturação de cores e com tonalidade cromática diferente, quando comparadas com o controle.

De modo geral, a adição de 5U de CGTase mostrou efeito positivo nas características tecnológicas do pão, apresentando um efeito antienvelhecimento, com aumento no volume e redução na firmeza do miolo e na retrogradação da amilopectina (ΔH) dos pães.

Tabela 12: Parâmetros de cor instrumental do miolo dos pães* controle e adicionados de CGTase (U/ 100 g farinha).

<i>Tempo de Armazenamento (dias)</i>	<i>L*</i>			
	<i>Controle</i>	<i>5U</i>	<i>10U</i>	<i>20U</i>
0	73,68 ± 1,09 ^{Aa}	71,31 ± 1,29 ^{Aa}	72,94 ± 3,66 ^{Aa}	71,31 ± 0,17 ^{Aa}
1	73,57 ± 0,73 ^{Aa}	72,94 ± 0,46 ^{Aa}	71,11 ± 0,52 ^{Ab}	72,00 ± 0,81 ^{Aab}
3	74,85 ± 0,81 ^{Aa}	73,49 ± 0,44 ^{Ab}	69,73 ± 0,35 ^{Ac}	72,83 ± 0,27 ^{Ab}
5	73,36 ± 1,14 ^{Aa}	73,09 ± 0,23 ^{Aa}	70,84 ± 1,16 ^{Ab}	71,69 ± 0,28 ^{Aab}
7	74,51 ± 2,47 ^{Aa}	72,88 ± 0,68 ^{Aa}	70,25 ± 0,59 ^{Aa}	73,35 ± 2,06 ^{Aa}
10	73,99 ± 0,42 ^{Aa}	73,26 ± 1,17 ^{Aa}	71,36 ± 1,89 ^{Aa}	72,75 ± 0,83 ^{Aa}
15	74,00 ± 1,10 ^{Aa}	72,52 ± 0,77 ^{Aab}	69,40 ± 0,10 ^{Ac}	71,24 ± 0,65 ^{Abc}
<i>a*</i>				
0	0,68 ± 0,12 ^{ABa}	0,59 ± 0,24 ^{Ab}	0,75 ± 0,66 ^{Aa}	1,20 ± 0,04 ^{Ab}
1	0,68 ± 0,04 ^{ABb}	0,38 ± 0,08 ^{Bc}	0,67 ± 0,07 ^{Ab}	1,23 ± 0,16 ^{Ab}
3	0,52 ± 0,07 ^{ABb}	0,54 ± 0,29 ^{Bb}	0,70 ± 0,11 ^{Aab}	1,10 ± 0,07 ^{Ba}
5	0,62 ± 0,03 ^{ABc}	0,77 ± 0,04 ^{ABb}	1,05 ± 0,04 ^{Aa}	1,06 ± 0,08 ^{Ba}
7	0,86 ± 0,05 ^{Aab}	0,55 ± 0,15 ^{Bb}	1,08 ± 0,16 ^{Aa}	1,12 ± 0,24 ^{Ba}
10	0,26 ± 0,05 ^{Bb}	0,62 ± 0,09 ^{ABab}	1,00 ± 0,14 ^{Aa}	1,11 ± 0,39 ^{Ba}
15	0,66 ± 0,38 ^{ABb}	1,09 ± 0,21 ^{Aab}	1,15 ± 0,17 ^{Aab}	1,69 ± 0,06 ^{Aa}
<i>b*</i>				
0	15,94 ± 0,40 ^{Aa}	14,91 ± 1,17 ^{Aa}	14,64 ± 3,24 ^{Aa}	17,38 ± 0,25 ^{Aa}
1	15,61 ± 0,37 ^{Aab}	13,64 ± 0,71 ^{Ac}	15,52 ± 0,20 ^{Ab}	16,70 ± 0,24 ^{Aa}
3	15,07 ± 0,03 ^{ABab}	13,51 ± 1,86 ^{Ab}	15,13 ± 0,41 ^{Aab}	16,51 ± 0,19 ^{Aa}
5	15,42 ± 0,17 ^{ABab}	15,10 ± 0,51 ^{Ab}	16,10 ± 0,52 ^{Aa}	16,25 ± 0,13 ^{Aa}
7	15,68 ± 1,00 ^{Aab}	13,99 ± 0,73 ^{Ab}	16,47 ± 0,55 ^{Aa}	16,53 ± 1,10 ^{Aa}
10	12,91 ± 0,23 ^{Bb}	14,72 ± 0,98 ^{Aab}	15,77 ± 0,79 ^{Aa}	16,48 ± 1,70 ^{Aa}
15	14,54 ± 2,14 ^{ABb}	16,09 ± 1,02 ^{Aab}	16,40 ± 0,58 ^{Aab}	18,21 ± 0,53 ^{Aa}
<i>C*</i>				
0	15,95 ± 0,41 ^{Aa}	14,93 ± 1,17 ^{Aa}	14,67 ± 3,27 ^{Aa}	17,42 ± 0,25 ^{Aa}
1	15,63 ± 0,37 ^{Aab}	13,64 ± 0,71 ^{Ac}	15,53 ± 0,21 ^{Ab}	16,74 ± 0,24 ^{Aa}
3	15,08 ± 0,03 ^{ABab}	13,52 ± 1,87 ^{Ab}	15,14 ± 0,41 ^{Aab}	16,55 ± 0,19 ^{Aa}
5	15,44 ± 0,16 ^{ABab}	15,12 ± 0,51 ^{Ab}	16,13 ± 0,52 ^{Aa}	16,28 ± 0,13 ^{Aa}
7	15,70 ± 1,00 ^{Aab}	14,00 ± 0,74 ^{Ab}	16,51 ± 0,55 ^{Aa}	16,56 ± 1,12 ^{Aa}
10	12,91 ± 0,23 ^{Bb}	14,73 ± 0,98 ^{Aab}	15,80 ± 0,79 ^{Aa}	16,52 ± 1,73 ^{Aa}
15	14,56 ± 2,15 ^{ABb}	16,13 ± 1,03 ^{Aab}	16,44 ± 0,58 ^{Aab}	18,29 ± 0,53 ^{Aa}
<i>h</i>				
0	87,55 ± 0,38 ^{ABa}	87,77 ± 0,80 ^{Aa}	87,34 ± 1,76 ^{Aa}	86,05 ± 0,09 ^{Ab}
1	87,52 ± 0,07 ^{ABb}	88,38 ± 0,33 ^{Aa}	87,55 ± 0,23 ^{Aab}	85,81 ± 0,51 ^{Abc}
3	88,03 ± 0,27 ^{ABa}	87,80 ± 0,92 ^{Aa}	87,34 ± 0,38 ^{Aab}	86,19 ± 0,23 ^{Ab}
5	87,70 ± 0,16 ^{ABa}	87,07 ± 0,09 ^{ABb}	86,29 ± 0,08 ^{Ac}	86,27 ± 0,27 ^{Ac}
7	86,84 ± 0,07 ^{Bab}	87,75 ± 0,54 ^{Aa}	86,27 ± 0,44 ^{Ab}	86,15 ± 0,61 ^{Ab}
10	88,86 ± 0,22 ^{Aa}	87,59 ± 0,24 ^{ABab}	86,39 ± 0,33 ^{Ab}	86,24 ± 1,02 ^{Ab}
15	87,52 ± 1,24 ^{ABa}	86,15 ± 0,50 ^{Bab}	85,98 ± 0,49 ^{Aab}	84,69 ± 0,30 ^{Bb}

Média de seis replicatas seguido do desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). L - luminosidade; a* - intensidade de vermelho; b* - intensidade de amarelo; C* - saturação da cor; h - tonalidade cromática.

5.4 EFEITO DA BCD NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DA FARINHA DE TRIGO, QUALIDADE E TAXA DE ENVELHECIMENTO DE PÃES

5.4.1 Propriedades farinográficas e extensográficas da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD

As propriedades farinográficas e extensográficas da farinha de trigo controle e daquelas adicionadas de 0,25, 0,5 e 1,0 % (m/m em relação ao peso da farinha) de β CD, estão apresentadas na Tabela 13.

A absorção de água, o tempo de desenvolvimento e o tempo de estabilidade não foram significativamente afetados pela adição de 0,25 e 0,5 % de β CD. No entanto, a presença de 1,0 % de β CD aumentou a absorção de água e reduziu os tempos de desenvolvimento e estabilidade da massa. O índice de tolerância à mistura (ITM) aumentou para as amostras contendo β CD, independente da concentração, quando comparadas ao controle, indicando que massas adicionadas de β CD apresentam menor tolerância à mistura e devem ser trabalhadas por menor tempo.

Tabela 13: Parâmetros farinográficos e extensográficos (135 min) da farinha de trigo controle e adicionada de 0,25, 0,5 e 1,0 % de β CD.

Parâmetros	Concentração de β CD (%)			
	Controle	0,25	0,5	1,0
<i>Farinógrafo</i>				
Absorção de água (%)	56,5	56,5	56,5	58,0
Desenvolvimento (min)	9,3 $\pm$ 0,4 ^a	9,5 $\pm$ 0,0 ^a	9,0 $\pm$ 0,0 ^a	7,5 $\pm$ 0,0 ^b
Estabilidade (min)	11,4 $\pm$ 0,6 ^a	10,4 $\pm$ 0,2 ^a	11,2 $\pm$ 0,1 ^a	8,8 $\pm$ 0,4 ^b
ITM (UB*)	48 $\pm$ 4 ^b	68 $\pm$ 4 ^a	68 $\pm$ 4 ^a	68 $\pm$ 4 ^a
<i>Extensógrafo (135 min)</i>				
Extensibilidade (mm)	102 $\pm$ 11 ^a	100 $\pm$ 1 ^a	91 $\pm$ 0 ^a	100 $\pm$ 0 ^a
R ₅₀ (UB*)	518 $\pm$ 34 ^c	663 $\pm$ 61 ^b	795 $\pm$ 7 ^{ab}	872 $\pm$ 7 ^a
Taxa (R ₅₀ /E)	5	7	9	9

*UB – Unidades Brabender. ITM: Índice de Tolerância à Mistura. R₅₀: Resistência à extensão. E: Extensibilidade

O aumento da quantidade de água facilita a formação dos complexos β CD-lipídeos. Como alguns compostos de elevada massa molecular, tais como os lipídeos, tendem a associar-se entre si e não interagir com a β CD, a maior quantidade de água permite uma melhor dispersão e separação das moléculas de lipídeos, possibilitando o contato com a β CD e a formação de um complexo mais estável (MARTIN DEL VALLE, 2004). Duchêne et al.

(2003) estudaram a solubilidade em água dos lipídeos, na presença de α CD ou β CD, e observaram que cadeias lipídicas compostas por dez ou onze carbonos estão significativamente retorcidas dentro da cavidade da β CD, conduzindo a uma melhor interação molecular.

A adição de β CD, independente da concentração, não afetou significativamente a extensibilidade da massa, porém o aumento da concentração de β CD aumentou gradualmente a resistência à extensão e a taxa R_{50}/E , causando um fortalecimento na farinha.

5.4.2 Propriedades de pasta da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD

As propriedades de pasta da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD (0,25, 0,5 e 1,0 %) estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14: Propriedades de pasta da farinha de trigo* sem e com β CD.

Concentração β CD (%)	T. pasta (°C)	Viscosidade (RVU)			
		Pico	Quebra	Final	Setback
<i>Controle</i>	94,1 $\pm$ 0,5 ^a	245,6 $\pm$ 3,1 ^b	63,1 $\pm$ 1,4 ^c	304,0 $\pm$ 2,9 ^a	121,5 $\pm$ 2,8 ^c
0,25	92,5 $\pm$ 1,9 ^a	241,8 $\pm$ 3,7 ^b	99,4 $\pm$ 0,9 ^a	277,8 $\pm$ 3,2 ^b	135,4 $\pm$ 0,9 ^a
0,5	93,2 $\pm$ 0,6 ^a	247,2 $\pm$ 1,4 ^{ab}	71,9 $\pm$ 3,2 ^b	304,8 $\pm$ 1,5 ^a	129,5 $\pm$ 3,1 ^{ab}
1,0	93,6 $\pm$ 0,0 ^a	256,8 $\pm$ 0,1 ^a	73,1 $\pm$ 1,8 ^b	306,2 $\pm$ 0,0 ^a	122,5 $\pm$ 1,9 ^{bc}

*Média de três replicatas, seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A adição de β CD não alterou a temperatura de pasta da farinha. No entanto, houve aumento do *setback* quando baixas concentrações de β CD foram usadas, enquanto em maiores concentrações a viscosidade de pico aumentou e houve redução do *setback*.

O efeito da β CD sobre as propriedades de pasta de amidos e farinhas tem mostrado resultados contraditórios. Diferenças nas propriedades de pasta de amidos de trigos de diferentes variedades adicionados de β CD foram encontradas por Li et al. (2000). A adição de 1,0 % de β CD em amidos que naturalmente possuíam baixa viscosidade (~210 RVU) provocou redução das viscosidades de pico, enquanto que em amidos que naturalmente apresentavam altas viscosidades (~397 RVU), a presença de β CD aumentou a viscosidade de pico. Para esses autores β CD pode aumentar o poder de inchamento e a solubilidade dos grânulos de amido de trigo durante a gelatinização através do rompimento dos complexos amilose-lipídeo, e que o inchamento dos grânulos e da liberação de carboidratos solúveis podem ocorrer em temperaturas menores na presença de β CD.

Ling, King e Shih (2002) estudaram o efeito da β CD em amido de arroz comercial. A adição de 2 e 6 % de β CD reduziu significativamente o *setback*, porém não afetou as viscosidades de pico e de quebra. Esses autores concluíram que a β CD tem apenas uma pequena influência sobre as propriedades de pasta do amido de arroz.

De acordo com Kim e Hill (1984), a β CD aumenta o poder de inchamento e a solubilidade dos grânulos de amido de trigo durante a gelatinização porque provoca a dissociação dos complexos amilose-lipídeo e a formação do complexo de inclusão β CD-lipídeo além de interações da β CD com outros componentes da farinha de trigo, tais como o glúten.

O aumento no *setback* observado para as suspensões de farinha com menores concentrações de β CD pode ser consequência da maior quantidade de amilose lixiviada durante a gelatinização do amido. No entanto, em concentrações maiores de β CD, a viscosidade de pico da pasta aumentou o que sugere possíveis interações entre a β CD livre com a amilose livre de complexos.

5.4.3 Propriedades térmicas da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD

As propriedades térmicas da farinha de trigo controle e adicionadas de β CD em diferentes concentrações estão apresentadas na Tabela 15.

A presença de 0,5 e 1,0 % β CD não alterou as temperaturas de gelatinização da farinha, enquanto que a adição de 0,25 % de β CD reduziu significativamente as temperaturas de pico e final. Porém houve uma redução significativa na variação de entalpia (ΔH), tanto do amido quanto do complexo amilose-lipídeo, independente da concentração de β CD.

Gunaratne; Corke (2007) estudaram a influência da β CD (solução 0,01M) na gelatinização de amidos de trigo, milho, arroz, batata, batata doce e inhame. Neste estudo tanto a entalpia de gelatinização do amido quanto a de dissociação do complexo amilose-lipídeo reduziram, na presença de β CD, para todos os amidos. Esses autores sugeriram que modificações na estrutura da região amorfa (amilose lixiviada e intumescida) devido à dissociação do complexo amilose-lipídeo na presença de β CD pode facilitar a desestabilização das hélices de amilopectina na região cristalina requerendo menos energia durante o processo de gelatinização, o que justifica a redução da entalpia observada para as amostras adicionadas de β CD.

Tabela 15: Propriedades térmicas de gelatinização da farinha de trigo e do complexo amilose-lipídeo sem e com β CD.

Concentração βCD (%)	T₀ (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	ΔH (J/g)
<i>Controle</i>	61,88 $\pm$ 0,34 ^a	67,92 $\pm$ 0,34 ^a	74,03 $\pm$ 0,73 ^a	8,03 $\pm$ 0,34 ^a
0,25	61,42 $\pm$ 0,03 ^a	66,80 $\pm$ 0,19 ^b	72,25 $\pm$ 0,09 ^b	6,78 $\pm$ 0,31 ^b
0,5	61,67 $\pm$ 0,38 ^a	67,59 $\pm$ 0,00 ^a	73,58 $\pm$ 0,16 ^a	6,70 $\pm$ 0,09 ^b
1,0	61,64 $\pm$ 0,12 ^a	67,92 $\pm$ 0,01 ^a	74,13 $\pm$ 0,44 ^a	6,93 $\pm$ 0,03 ^b
Complexo amilose-lipídeo				
	T₀(°C)	T_p(°C)	T_f(°C)	ΔH_{comp} (J/g)
<i>Controle</i>	89,23 $\pm$ 0,27 ^b	96,84 $\pm$ 0,51 ^a	102,96 $\pm$ 0,44 ^a	1,17 $\pm$ 0,02 ^a
0,25	87,79 $\pm$ 0,32 ^c	94,74 $\pm$ 0,58 ^b	100,60 $\pm$ 0,72 ^b	0,79 $\pm$ 0,11 ^b
0,5	90,01 $\pm$ 0,38 ^{ab}	96,73 $\pm$ 0,88 ^a	102,13 $\pm$ 0,27 ^{ab}	0,78 $\pm$ 0,04 ^b
1,0	90,88 $\pm$ 0,68 ^a	97,18 $\pm$ 0,20 ^a	101,62 $\pm$ 0,97 ^{ab}	0,65 $\pm$ 0,04 ^b

T₀, T_p, T_f = temperaturas inicial, de pico e final, respectivamente; ΔH = variação de entalpia. Média de três replicatas seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Todas as farinhas gelatinizadas foram armazenadas durante 14 dias à temperatura de 4 °C para avaliação da retrogradação da amilopectina (Tabela 15). As temperaturas de transição e a variação de entalpia de todas as amostras retrogradadas foram menores que aquelas apresentadas na Tabela 14. Com o resfriamento, as moléculas de amilose e amilopectina se reorganizam novamente por meio de pontes de hidrogênio formando uma estrutura mais organizada quando comparada à estrutura predominante antes da gelatinização (ATWELL, 2001). Essa recristalização que ocorre durante longos períodos de estocagem é devido principalmente às cadeias de amilopectina. Os cristais formados durante a retrogradação tem um nível de organização menor do que no amido nativo, dessa forma as temperaturas de transição e variação de entalpia são reduzidas.

Tabela 16: Propriedades térmicas de retrogradação da farinha de trigo e do complexo amilose-lipídeo sem e com β CD.

Concentração βCD (%)	T₀ (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	ΔH_{ret} (J/g)
<i>Controle</i>	49,10 $\pm$ 0,48 ^b	58,82 $\pm$ 0,84 ^{ab}	65,36 $\pm$ 0,58 ^a	1,28 $\pm$ 0,04 ^b
0,25	49,91 $\pm$ 0,43 ^{ab}	57,48 $\pm$ 0,96 ^b	63,07 $\pm$ 0,77 ^b	1,40 $\pm$ 0,04 ^b
0,5	50,55 $\pm$ 0,09 ^a	59,38 $\pm$ 0,19 ^a	65,35 $\pm$ 0,21 ^a	1,45 $\pm$ 0,23 ^b
1,0	49,66 $\pm$ 0,41 ^{ab}	59,60 $\pm$ 0,58 ^a	66,31 $\pm$ 0,67 ^a	1,79 $\pm$ 0,07 ^a
Complexo amilose-lipídeo				
	T₀ (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	ΔH_{comp}(J/g)
<i>Controle</i>	86,59 $\pm$ 1,08 ^b	98,70 $\pm$ 0,39 ^a	104,58 $\pm$ 0,22 ^a	2,31 $\pm$ 0,02 ^a
0,25	89,45 $\pm$ 0,06 ^{ab}	96,71 $\pm$ 0,38 ^b	101,93 $\pm$ 0,16 ^b	0,93 $\pm$ 0,03 ^c
0,5	88,05 $\pm$ 0,79 ^{ab}	99,04 $\pm$ 0,70 ^a	103,88 $\pm$ 0,41 ^a	1,54 $\pm$ 0,08 ^b
1,0	90,18 $\pm$ 2,35 ^a	98,82 $\pm$ 0,34 ^a	104,30 $\pm$ 0,95 ^a	1,46 $\pm$ 0,05 ^b

T₀, T_p, T_f = temperaturas inicial, de pico e final, respectivamente; ΔH = variação de entalpia. Média de três replicatas seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não houve diferença significativa no ΔH_{ret} entre a farinha controle e aquelas adicionadas de 0,25 e 0,5 % β CD, enquanto 1% de β CD promoveu um aumento no ΔH_{ret} (Tabela 15), indicando a maior taxa de retrogradação nesta concentração. Resultados semelhantes foram observados por Gunarantne e Corke (2007). De acordo com o estudo realizado por esses autores, o complexo amilose-lipídeo dissociado pode ser reorganizado durante o resfriamento. Este conceito foi usado para examinar se a presença de β CD pode formar novos complexos de β CD-lipídeos reduzindo a formação do complexo amilose-lipídeo no amido nativo. Foi observado para o amido de trigo uma redução no ΔH dos complexos reassociados na presença de β CD quando comparadas com amostras controle, indicando que a β CD é capaz de complexar com os lipídeos do amido, como também observado neste trabalho.

5.4.4 Avaliação tecnológica

5.4.4.1 Avaliação do volume e pH das massas dos pães controle e adicionados de β CD

O pH e o volume das massas controle e adicionadas de β CD durante o período de fermentação estão apresentados na Tabela 17.

A fermentação das massas controle e adicionadas de β CD se deu a temperatura de 32°C por 60 minutos. O pH das massas foi medido no início e após o término da fermentação.

O pH das massas frescas ficou entre 5,43 e 5,63 indicando que a β CD não interferiu no pH inicial da massa. A redução de pH durante a fermentação das massas controle e adicionadas de β CD não foram significativas neste estudo.

Tabela 17: pH da massa antes e depois da fermentação e volume da massa de pão controle e adicionados de β CD.

Concentração β CD (%)	pH _{inicial}	pH _{final}	Volume (mL)
<i>Controle</i>	$5,50 \pm 0,00^{ab}$	$5,37 \pm 0,06^{ab}$	430 ± 7^b
<i>0,25</i>	$5,63 \pm 0,06^a$	$5,47 \pm 0,06^a$	347 ± 9^c
<i>0,5</i>	$5,53 \pm 0,06^{ab}$	$5,43 \pm 0,06^a$	450 ± 0^b
<i>1,0</i>	$5,43 \pm 0,06^b$	$5,27 \pm 0,06^b$	513 ± 11^a

*Média de três replicatas seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Houve um aumento de 19 % no volume da massa quando 1,0 % de β CD foi adicionada, enquanto 0,5 % de β CD não provocou alteração no volume e 0,25 % reduziu o volume da massa em 19 % em relação ao volume da massa controle. O aumento de volume da massa contendo 1,0 % de β CD pode estar relacionado ao aumento da quantidade de água utilizada na formulação, pois a maior concentração de água facilita o acesso da β CD por toda a massa.

5.4.4.2 Avaliação do volume específico dos pães controle e adicionados de β CD

Os volumes específicos dos pães controle e adicionados de β CD estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Volume específico dos pães controle e adicionados de β CD.

Concentração β CD (%)	Volume específico (cm ³ /g)
<i>Controle</i>	$5,5 \pm 0,1^b$
<i>0,25</i>	$4,6 \pm 0,0^c$
<i>0,5</i>	$5,6 \pm 0,1^b$
<i>1,0</i>	$6,0 \pm 0,2^a$

Média de nove replicatas seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O volume específico dos pães variou de 4,6 a 6,0 cm³/g. Houve aumento significativo no volume específico do pão quando 1,0 % de β CD foi utilizada, o que representou um aumento de 9 % em relação ao volume específico do pão controle. A adição de 0,5 % de β CD

não alterou o volume específico dos pães, enquanto o uso de 0,25 % provocou redução de 16 % no mesmo. Esses resultados acompanharam aqueles obtidos para o volume da massa durante a fermentação (Tabela 17).

Não existem trabalhos mostrando o efeito da β CD no volume específico de pães, apenas aqueles que mostram um efeito indireto quando do uso da enzima CGTase. Neste estudo, a presença de 5U de CGTase aumentou significativamente o volume específico do pão (11 %) quando comparado ao pão controle. A adição de 10U de CGTase não alterou o volume específico dos pães, enquanto o uso de 20U de CGTase provocou redução de 26 %.

Oliveira (2010); Jemli et al. (2007) e Gujral et al. (2003), encontraram um efeito positivo da ação da CGTase no volume específico do pão. No entanto, nesses trabalhos os outros produtos da degradação do amido, além da β CD também influenciaram na qualidade dos pães. Jemli et al. (2007) sugeriram que o aumento no volume do pão adicionado de CGTase se deve também às interações entre as ciclodextrinas e a matrix proteica da massa. Além disso, a β CD aumenta o poder de inchamento e a solubilidade dos grânulos de amido de trigo durante a gelatinização, melhorando assim o volume do pão.

Neste estudo o aumento do volume específico em maiores concentrações de β CD pode estar relacionado à maior viscosidade de pico (Tabela 14) e maior capacidade de absorção de água pela farinha de trigo. A adição de 1,0 % de β CD também tornou a massa mais elástica (Tabela 13), tornando-a, portanto, capaz de reter mais CO_2 durante a fermentação aumentando assim o volume da massa e do pão nesta concentração.

A ação da CGTase, produz não só β CD, mas também α CD e γ CD, por meio da reação de ciclização, além de dextrinas lineares de baixo peso molecular e oligossacarídeos que podem ser metabolizados pela levedura aumentando o volume dos pães. Por esse motivo uma menor quantidade de enzima foi suficiente para melhorar a qualidade dos pães, enquanto que quando adicionada isoladamente, a β CD requer uma quantidade mais elevada para produzir uma melhora nas características tecnológicas do pão.

5.4.5 Estudo do envelhecimento dos pães controle e adicionados de β CD

5.4.5.1 Umidade e atividade de água dos pães controle e adicionados de β CD

Os teores de umidade do miolo e da crosta dos pães frescos e armazenados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Teor de umidade do miolo e da crosta dos pães controle e adicionados de β CD durante armazenamento refrigerado por 15 dias.

Tempo de Armazenamento (dias)	Concentração de βCD (%)			
	Miolo			
	Controle	0,25	0,5	1,0
0	36,87 $\pm$ 1,09 ^{Ab}	37,15 $\pm$ 0,50 ^{Ab}	33,31 $\pm$ 0,04 ^{Dc}	43,30 $\pm$ 0,25 ^{Aa}
1	35,16 $\pm$ 0,12 ^{Bb}	35,26 $\pm$ 0,17 ^{BCb}	35,38 $\pm$ 0,17 ^{Ab}	40,79 $\pm$ 0,08 ^{Ba}
3	34,65 $\pm$ 0,24 ^{Bc}	35,91 $\pm$ 0,15 ^{Ba}	35,44 $\pm$ 0,17 ^{Ab}	35,98 $\pm$ 0,09 ^{Ca}
5	34,09 $\pm$ 0,13 ^{Bb}	34,63 $\pm$ 0,17 ^{Ca}	33,78 $\pm$ 0,02 ^{Cb}	34,95 $\pm$ 0,24 ^{Da}
7	34,16 $\pm$ 0,19 ^{Bb}	32,67 $\pm$ 0,20 ^{Dc}	34,92 $\pm$ 0,27 ^{Ba}	32,46 $\pm$ 0,14 ^{Ec}
10	33,16 $\pm$ 0,08 ^{Cb}	32,31 $\pm$ 0,12 ^{Db}	34,07 $\pm$ 0,07 ^{Ca}	32,27 $\pm$ 0,07 ^{Eb}
15	32,35 $\pm$ 0,08 ^{Ca}	30,22 $\pm$ 0,06 ^{Ec}	31,50 $\pm$ 0,18 ^{Eb}	27,55 $\pm$ 0,13 ^{Fd}
	Crosta			
	Controle	0,25	0,5	1,0
0	28,71 $\pm$ 0,36 ^{Aa}	24,96 $\pm$ 0,28 ^{Cb}	21,65 $\pm$ 0,15 ^{Ed}	23,11 $\pm$ 0,23 ^{Dc}
1	25,12 $\pm$ 0,11 ^{Da}	24,52 $\pm$ 0,14 ^{Cb}	24,51 $\pm$ 0,19 ^{Cb}	23,20 $\pm$ 0,15 ^{Dc}
3	24,84 $\pm$ 0,12 ^{Da}	26,16 $\pm$ 0,02 ^{Aba}	23,05 $\pm$ 0,15 ^{Dc}	25,03 $\pm$ 0,24 ^{Ba}
5	26,61 $\pm$ 0,02 ^{Ca}	26,15 $\pm$ 0,30 ^{Aba}	25,18 $\pm$ 0,20 ^{Bb}	26,49 $\pm$ 0,18 ^{Aa}
7	27,51 $\pm$ 0,14 ^{Ba}	25,78 $\pm$ 0,12 ^{Bb}	23,41 $\pm$ 0,18 ^{Dd}	24,43 $\pm$ 0,17 ^{Cc}
10	26,12 $\pm$ 0,08 ^{Ca}	26,33 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	26,13 $\pm$ 0,11 ^{Aa}	25,30 $\pm$ 0,15 ^{Bb}
15	25,31 $\pm$ 0,24 ^{Da}	24,73 $\pm$ 0,10 ^{Cb}	24,42 $\pm$ 0,15 ^{Cb}	21,99 $\pm$ 0,16 ^{Ec}

*Média de três replicatas seguidas do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O conteúdo de umidade do miolo dos pães frescos tiveram seus valores significativamente aumentados com a adição de 0,25 e 1,0 % de β CD, quando comparados com o controle. A adição de 1,0 % de β CD melhorou a retenção de água no miolo dos pães até o quinto dia de armazenamento. Para a crosta dos pães frescos, o conteúdo de umidade reduziu com a adição de β CD, sugerindo que as moléculas de β CD poderiam redistribuir a água no miolo de tal modo que menor quantidade migrasse para a crosta. Durante o armazenamento dos pães, o conteúdo de umidade da crosta variou muito, mas de um modo geral ele diminuiu para os pães controle, o que não era esperado, e aumentou para os pães adicionados de β CD, principalmente para aqueles com 1,0 % de β CD até o 10º dia de armazenamento.

Devido a sua cavidade hidrofóbica, a β CD forma complexos de inclusão com outras substâncias hidrofóbicas, aumentando a solubilidade em água de todo o sistema (DE CASTRO et al., 2010), podendo portanto, aumentar a absorção de água das massas, como foi observado na Tabela 13, para farinhas contendo 1,0 % de β CD e consequentemente, aumentar o conteúdo de umidade do miolo dos pães (Tabela 19).

A atividade de água do miolo dos pães controle e adicionados de β CD está apresentada na Tabela 20.

A atividade de água aumentou significativamente para os pães frescos adicionados de 0,5 e 1,0 % β CD, quando comparados com o controle. A atividade de água não foi significativamente alterada durante o armazenamento dos pães controle, enquanto que para as amostras adicionadas de β CD, a atividade de água reduziu a partir do 10º dia de armazenamento. Os pães contendo 1,0 % de β CD apresentaram os maiores valores de atividade de água até o 7º dia de estocagem, sendo que, miolo de pães com 1,0 % de β CD também apresentaram os maiores valores de conteúdo de umidade (Tabela 19). A cavidade essencialmente hidrofóbica da β CD possibilita a formação de complexos de inclusão com outras moléculas hidrofóbicas. O seu exterior é hidrofílico devido ao grande número de grupos hidroxilas (ZHOU et al. 2012), podendo portanto realizar ligações com a água, aumentando a solubilidade do sistema e a quantidade de água ligada.

Aguirre et al. (2011) estudaram a umidade do miolo e da crosta e a atividade de água do miolo de pães produzidos com farinha branca e armazenados a 4 °C por 23 dias. O valor de atividade de água decresceu em função da estocagem, variando de 0,960 (pão fresco) a 0,945 (23º dia de armazenamento).

Tabela 20: Atividade de água do miolo dos pães controle e adicionados de β CD durante armazenamento refrigerado por 15 dias.

<i>Tempo de Armazenamento (dias)</i>	<i>Concentração de βCD (%)</i>			
	<i>Controle</i>	<i>0,25 % βCD</i>	<i>0,5 % βCD</i>	<i>1,0 % βCD</i>
0	0,926 $\pm$ 0,010 ^{Ac}	0,928 $\pm$ 0,002 ^{ABbc}	0,941 $\pm$ 0,001 ^{Aab}	0,948 $\pm$ 0,001 ^{Aa}
1	0,931 $\pm$ 0,002 ^{Ab}	0,932 $\pm$ 0,002 ^{Ab}	0,930 $\pm$ 0,000 ^{ABb}	0,943 $\pm$ 0,001 ^{Aa}
3	0,933 $\pm$ 0,001 ^{Ab}	0,934 $\pm$ 0,001 ^{Ab}	0,929 $\pm$ 0,001 ^{ABc}	0,938 $\pm$ 0,001 ^{Abba}
5	0,932 $\pm$ 0,002 ^{Ab}	0,934 $\pm$ 0,001 ^{Aab}	0,931 $\pm$ 0,002 ^{ABb}	0,938 $\pm$ 0,002 ^{Abba}
7	0,936 $\pm$ 0,002 ^{Aa}	0,930 $\pm$ 0,005 ^{ABab}	0,928 $\pm$ 0,001 ^{ABb}	0,932 $\pm$ 0,002 ^{ABab}
10	0,927 $\pm$ 0,001 ^{Ab}	0,931 $\pm$ 0,002 ^{ABb}	0,922 $\pm$ 0,007 ^{Bb}	0,923 $\pm$ 0,007 ^{BCb}
15	0,931 $\pm$ 0,002 ^{Aa}	0,925 $\pm$ 0,002 ^{Ba}	0,899 $\pm$ 0,012 ^{Cb}	0,911 $\pm$ 0,015 ^{Cab}

*Média de três replicatas seguidas do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p > 0,05).

5.4.5.2 Avaliação da firmeza do miolo dos pães controle e adicionados de β CD

A firmeza do miolo dos pães controle e adicionados de β CD está apresentada na Figura 11.

A firmeza do miolo aumentou gradualmente para todas as amostras, controle e com β CD, durante o armazenamento, como esperado. A presença de 1,0 % de β CD reduziu significativamente a firmeza do miolo dos pães durante todo o armazenamento, enquanto que a adição de 0,5 % reduziu significativamente a firmeza até o 7º dia, quando comparados com o controle. No entanto, a adição de 0,25 % de β CD aumentou a firmeza do miolo dos pães, durante todo o período, quando comparados com o controle. Esses resultados podem estar relacionados com a ação da β CD sobre o amido, desestabilizando o complexo amilose-lipídeo, e promovendo alguma interação com as moléculas do amido e as proteínas do glúten. Além disso, segundo Eliasson e Larsson (1993), o volume do pão afeta as medidas de firmeza do miolo – quanto menor for o volume específico do pão, maior será a firmeza. Este conceito poderia explicar o fato dos pães contendo 0,25 % de β CD apresentarem os maiores valores de firmeza, pois apresentaram o menor crescimento durante a fermentação e, conseqüentemente, o menor volume específico. De acordo com Ribotta e Bail (2007), a retrogradação da amilose ocorre nas primeiras horas após o forneamento. Já a retrogradação da amilopectina ocorre mais lentamente e é considerada um dos principais fenômenos responsáveis pela firmeza do miolo durante o armazenamento.

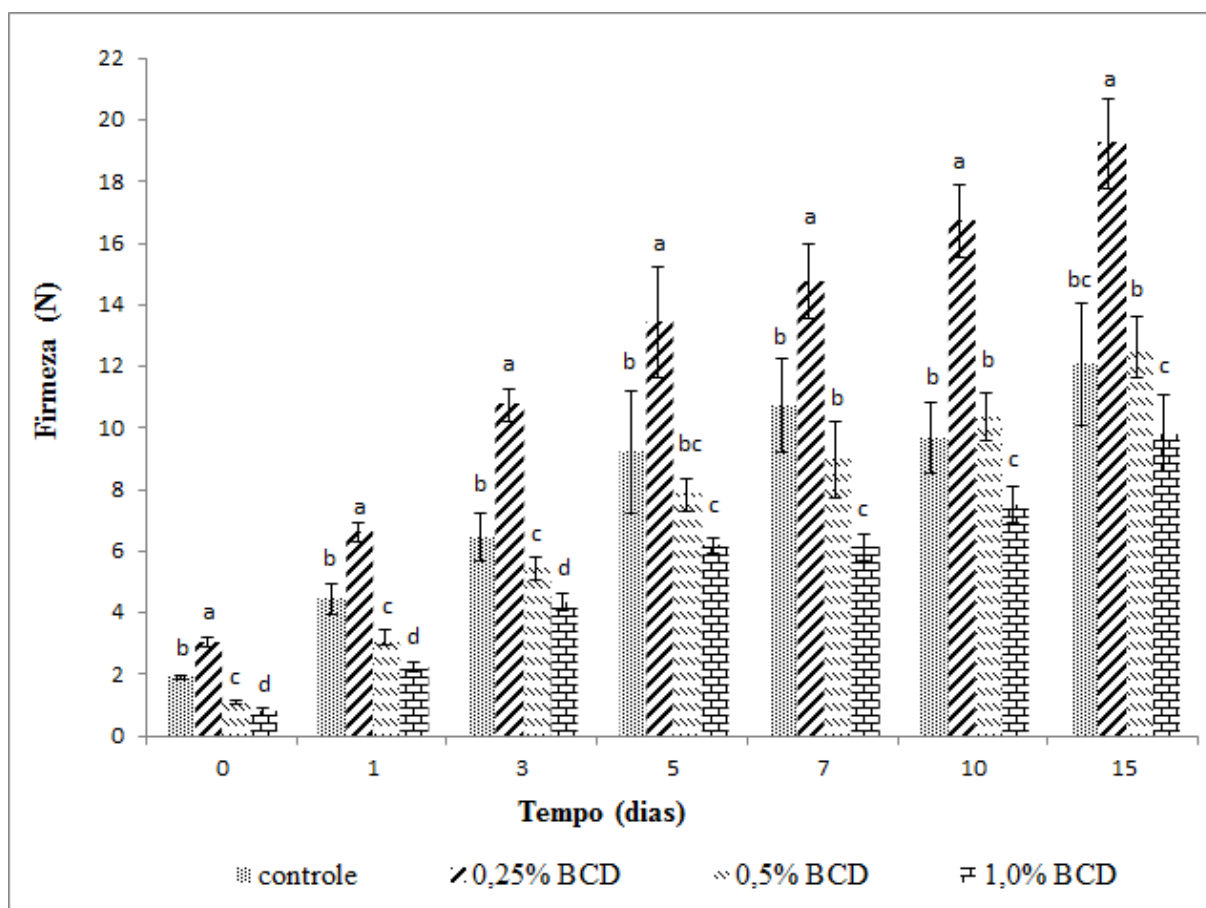


Figura 11: Firmeza (N) do miolo dos pães controle e adicionados de 0,25, 0,5 e 1,0 % β CD, frescos e armazenados por 15 dias. Valores seguidos pela mesma letra minúscula no mesmo tempo de armazenamento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Praticamente não existem estudos relatando o efeito da β CD pura sobre as características de qualidade dos pães. Tian et al. (2009b), mostraram que a presença de 1,5 % de β CD apresentou uma prevenção significativa no aumento da firmeza do pão, sugerindo que a adição de β CD pode retardar o processo de envelhecimento de pães. Para esses autores, este efeito pode ser parcialmente atribuído à formação de uma rede melhorada – no pão, provavelmente resultante das interações da β CD com o amido e proteína. A adição da β CD pode, ainda, formar complexos amilose-lipídeo- β CD, resultando na redução do endurecimento do pão.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que, em concentrações mais elevadas a β CD compete com a amilose pelo lipídeo provocando uma desestabilização dos complexos amilose-lipídeo e consequente formação do complexo β CD-lipídeo, além de possíveis interações da β CD não complexada com outros compostos presentes na farinha de trigo, tais como a amilose liberada na desestabilização dos complexos amilose-lipídeo e as proteínas do glúten reduzindo a taxa de envelhecimento dos pães.

5.4.5.3 Análise térmica do miolo dos pães controle e adicionados de β CD

A variação da entalpia (ΔH) de retrogradação do miolo dos pães controle e adicionados de β CD (0,25, 0,5 e 1,0 %) durante armazenamento por até 15 dias estão apresentados na Tabela 21.

O ΔH aumentou durante o armazenamento para todas as amostras analisadas devido à retrogradação das moléculas de amilopectina durante o envelhecimento dos pães, como ocorreu também com a firmeza.

Tabela 21: Variação da entalpia de retrogradação do miolo dos pães controle e adicionados de β CD, durante armazenamento refrigerado por 15 dias.

Tempo de Armazenamento (dias)	ΔH_{ret}			
	Controle	0,25 % β CD	0,5 % β CD	1,0 % β CD
0	$1,45 \pm 0,02^{Cc}$	$1,63 \pm 0,01^{Eb}$	$1,40 \pm 0,06^{Dc}$	$1,80 \pm 0,01^{Da}$
1	$2,04 \pm 0,09^{Bb}$	$1,63 \pm 0,08^{Ec}$	$1,80 \pm 0,02^{Cc}$	$2,43 \pm 0,06^{Ca}$
3	$2,00 \pm 0,12^{Bb}$	$2,02 \pm 0,07^{Db}$	$1,99 \pm 0,13^{BCb}$	$2,51 \pm 0,08^{ABCa}$
5	$2,42 \pm 0,01^{Aab}$	$2,31 \pm 0,06^{Cb}$	$2,23 \pm 0,06^{Bb}$	$2,48 \pm 0,09^{BCa}$
7	$2,46 \pm 0,11^{ABa}$	$2,50 \pm 0,07^{BCa}$	$2,58 \pm 0,16^{Aa}$	$2,68 \pm 0,06^{Aa}$
10	$2,49 \pm 0,04^{Ab}$	$2,59 \pm 0,06^{ABb}$	$2,89 \pm 0,09^{Aa}$	$2,62 \pm 0,04^{ABb}$
15	$2,68 \pm 0,09^{Aa}$	$2,76 \pm 0,09^{Aa}$	$2,65 \pm 0,17^{Aa}$	$2,56 \pm 0,06^{ABCa}$

ΔH_{ret} = variação de entalpia de retrogradação. Média de três repetições seguida do desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Comparando-se os valores de ΔH dos pães controle e daqueles adicionados de β CD nos diferentes tempos de armazenamento, observa-se que a presença de 0,25 e 0,5 % β CD praticamente não alterou o ΔH . A presença de 1,0 % de β CD aumentou significativamente o ΔH até o quinto dia de armazenamento. Após este período não houve diferença significativa nos valores de ΔH entre as amostras controle e adicionadas de β CD, independente da concentração. Esses resultados aliados àqueles obtidos para a firmeza dos pães indicam que o envelhecimento dos pães não está relacionado apenas à retrogradação da amilopectina, mas que outros fatores como a distribuição de água no sistema e interações das moléculas de amido e proteína também estejam envolvidas neste processo.

Dragsdorf e Varriano-Marston (1980), concluíram que não há uma relação de causa e efeito entre a cristalização do amido e a firmeza do pão. Esses resultados concordam com aqueles observados por Zobel e Senti (1959) citados por Gray e Bemiller (2003) onde foi

observado um aumento na cristalinidade do amido na presença de α -amilase bacteriana juntamente com uma típica redução da firmeza.

5.4.5.4 Difrração de raios-X do miolo dos pães controle e adicionados de β CD

Os padrões de difração de raios-x dos pães controle e adicionados de β CD, no 7º dia de armazenamento estão apresentados na Figura 12.

Foi observado, para o miolo do pão controle e adicionado de β CD, armazenado por 7 dias, picos ao redor de 15, 17, 20 e 22°, apresentando uma cristalinidade do tipo B e do tipo V, caracterizadas por picos em 17 e 20°, respectivamente. Não houve diferença na cristalinidade relativa entre o miolo do pão controle e daquele adicionado de β CD. O padrão cristalino do tipo B indica a retrogradação da amilopectina no miolo dos pães (PRIMO-MARTÍN et al., 2007). Para o miolo do pão com β CD, foi observado um pico levemente mais intenso ao redor de 17°, representando um padrão do tipo B mais intenso para essas amostras. Esses resultados concordam com os obtidos nas análises térmicas do miolo dos pães, onde pães contendo 1,0 % de β CD apresentaram maiores valores de ΔH , indicando uma maior retrogradação da amilopectina durante o armazenamento.

A gelatinização do amido no pão também origina padrão cristalino do tipo V, devido a formação dos complexos amilose-lipídeo (ELIASSON; LARSSON, 1993). Miolos do pão contendo β CD apresentaram um pico mais pronunciado ao redor de 20°. Esse aumento pode estar relacionado com a formação do complexo amilose-lipídeo- β CD.

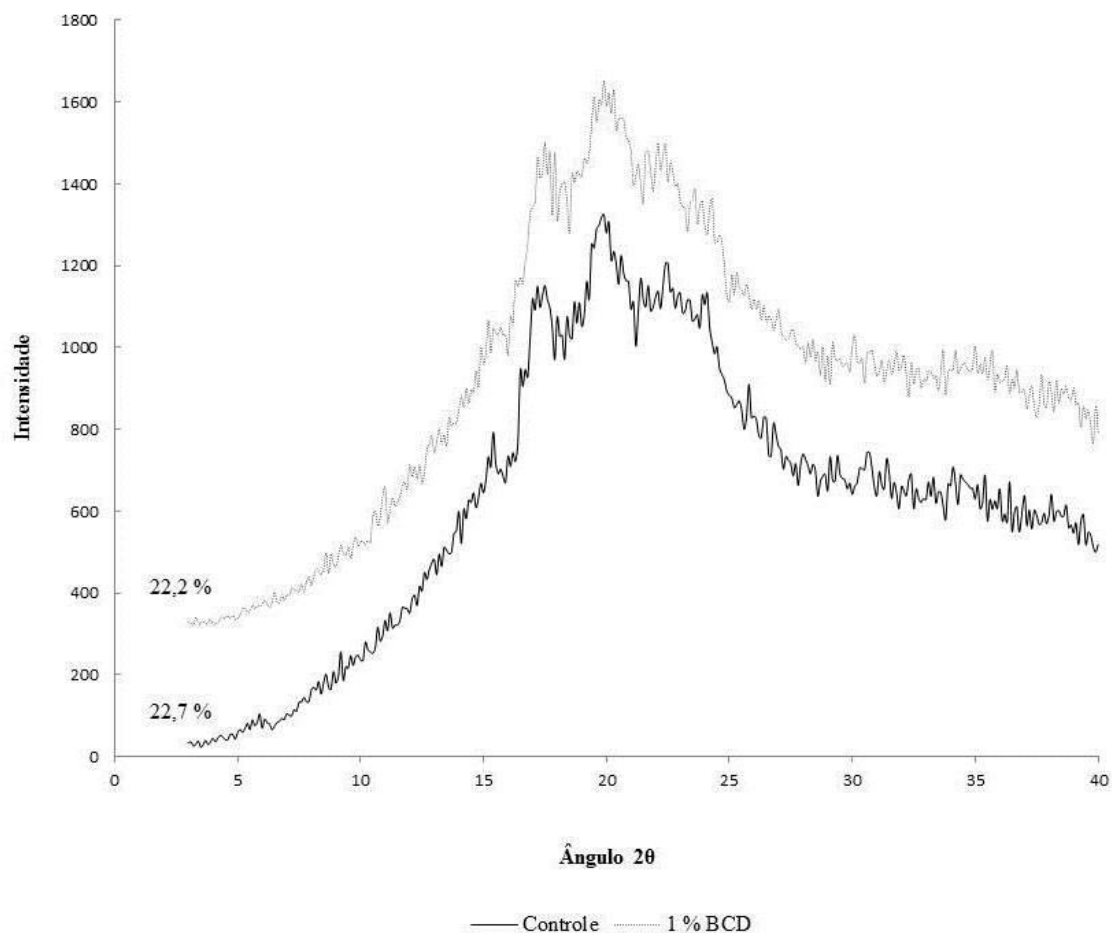


Figura 12: Padrão de difração de raios-X do miolo de pães controle e adicionados de 1% de βCD e armazenados por 7 dias.

5.4.5.5 Análise de cor do miolo dos pães controle e adicionados de βCD

Os parâmetros de cor observados para o pão controle e adicionados de βCD (0,25, 0,5 e 1,0 %) estão apresentados na Tabela 22.

A adição da βCD, independente da concentração, praticamente não afetou a luminosidade do miolo dos pães frescos e armazenados, quando comparados com controle. Um miolo branco (levemente amarelado) e sem estrias ou manchas é considerado melhor. A cor do miolo é afetada pela taxa de extração da farinha, cor do endosperma do trigo e pela granulosidade do miolo. Quanto mais fina for a granulosidade, mais brilhante será a cor (EL-DASH; CAMARGO; DIAZ, 1982).

A presença de 0,25 e 0,5 % de βCD aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) o parâmetro a^* e h durante todo o período de armazenamento, ao passo que 1,0 % de βCD reduziu significativamente os parâmetros a^* b^* e C^* e aumentou o parâmetro h durante o mesmo período, quando comparados com o controle.

Esses resultados sugerem que pães com maior volume específico e com menor firmeza no miolo, como foi o caso dos pães adicionados de 1,0 % de β CD, possuem menor intensidade da cor vermelha e amarela, com menor saturação de cores e com tonalidade cromática diferente, quando comparadas com o controle.

De modo geral, a β CD apresentou um efeito antienvelhecimento nos pães em concentrações mais elevadas, provocando um aumento no volume e redução da firmeza do miolo, quando 1,0 % de β CD foi utilizada. No entanto, a mesma concentração de β CD não foi capaz de prevenir a retrogradação da amilopectina, provocando um aumento no ΔH , sugerindo que o envelhecimento dos pães não está relacionado apenas com a retrogradação da amilopectina.

Tabela 22: Parâmetros de cor instrumental do miolo do pão sem e com β CD durante armazenamento refrigerado por até 15 dias.

<i>Tempo de Armazenamento (dias)</i>	<i>L*</i>			
	<i>Controle</i>	<i>0,25 % βCD</i>	<i>0,5 % βCD</i>	<i>1,0 % βCD</i>
0	73,28 $\pm$ 0,72 ^{Aab}	72,89 $\pm$ 0,86 ^{ABab}	71,91 $\pm$ 0,66 ^{ABb}	73,34 $\pm$ 1,15 ^{Aa}
1	72,85 $\pm$ 0,57 ^{Aa}	72,31 $\pm$ 0,85 ^{Ba}	72,94 $\pm$ 0,49 ^{Aa}	72,65 $\pm$ 0,58 ^{Aa}
3	73,77 $\pm$ 0,67 ^{Aa}	73,89 $\pm$ 0,77 ^{Aa}	72,97 $\pm$ 0,51 ^{Aa}	74,09 $\pm$ 0,92 ^{Aa}
5	73,32 $\pm$ 0,75 ^{Aa}	73,46 $\pm$ 0,65 ^{Aba}	72,75 $\pm$ 0,60 ^{Aa}	73,56 $\pm$ 0,86 ^{Aa}
7	73,34 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	72,94 $\pm$ 0,45 ^{Aba}	72,63 $\pm$ 0,95 ^{Aa}	73,05 $\pm$ 0,98 ^{Aa}
10	72,42 $\pm$ 1,39 ^{Aa}	73,11 $\pm$ 0,95 ^{Aba}	71,83 $\pm$ 0,54 ^{ABa}	72,70 $\pm$ 0,74 ^{Aa}
15	73,46 $\pm$ 1,26 ^{Aa}	73,05 $\pm$ 0,22 ^{ABa}	72,03 $\pm$ 0,88 ^{ABa}	72,55 $\pm$ 1,19 ^{Aa}
<i>a*</i>				
0	0,94 $\pm$ 0,09 ^{BCb}	1,29 $\pm$ 0,06 ^{BCDa}	1,15 $\pm$ 0,11 ^{BCa}	0,76 $\pm$ 0,10 ^{Bc}
1	0,87 $\pm$ 0,15 ^{BCb}	1,12 $\pm$ 0,10 ^{Ea}	0,97 $\pm$ 0,07 ^{CDEab}	0,33 $\pm$ 0,07 ^{Ec}
3	0,82 $\pm$ 0,12 ^{BCb}	1,27 $\pm$ 0,14 ^{BCDEa}	0,80 $\pm$ 0,03 ^{Eb}	0,40 $\pm$ 0,03 ^{DEc}
5	0,73 $\pm$ 0,09 ^{Cc}	1,15 $\pm$ 0,06 ^{CDEa}	0,97 $\pm$ 0,04 ^{CDEb}	0,49 $\pm$ 0,08 ^{CDd}
7	0,99 $\pm$ 0,12 ^{ABa}	1,13 $\pm$ 0,07 ^{DEa}	1,04 $\pm$ 0,18 ^{BCDa}	0,46 $\pm$ 0,07 ^{DEb}
10	0,85 $\pm$ 0,14 ^{ABb}	1,30 $\pm$ 0,12 ^{BCa}	0,94 $\pm$ 0,17 ^{DEb}	0,60 $\pm$ 0,09 ^{Cc}
15	1,03 $\pm$ 0,09 ^{ABc}	1,35 $\pm$ 0,07 ^{ABa}	1,22 $\pm$ 0,06 ^{Bb}	0,60 $\pm$ 0,07 ^{Cd}
<i>b*</i>				
0	16,10 $\pm$ 0,41 ^{BCb}	17,13 $\pm$ 0,32 ^{BCa}	16,29 $\pm$ 0,34 ^{BCb}	15,43 $\pm$ 0,37 ^{Bc}
1	15,75 $\pm$ 0,40 ^{BCb}	16,66 $\pm$ 0,41 ^{Ca}	15,76 $\pm$ 0,22 ^{CDb}	14,30 $\pm$ 0,33 ^{Dc}
3	15,39 $\pm$ 0,51 ^{Cb}	16,50 $\pm$ 0,36 ^{Ca}	15,19 $\pm$ 0,14 ^{Db}	14,31 $\pm$ 0,36 ^{Dc}
5	15,40 $\pm$ 0,38 ^{Cb}	16,62 $\pm$ 0,34 ^{Ca}	15,80 $\pm$ 0,06 ^{CDb}	14,63 $\pm$ 0,34 ^{CDb}
7	16,05 $\pm$ 0,35 ^{BCb}	16,76 $\pm$ 0,29 ^{Ca}	15,82 $\pm$ 0,52 ^{Cb}	14,69 $\pm$ 0,17 ^{CDc}
10	16,05 $\pm$ 0,36 ^{BCb}	17,09 $\pm$ 0,51 ^{BCa}	15,80 $\pm$ 0,51 ^{CDbc}	15,25 $\pm$ 0,35 ^{BCc}
15	16,59 $\pm$ 0,26 ^{ABb}	17,45 $\pm$ 0,20 ^{ABa}	16,86 $\pm$ 0,32 ^{Bb}	15,62 $\pm$ 0,55 ^{Bc}
<i>C*</i>				
0	16,13 $\pm$ 0,41 ^{BCb}	17,17 $\pm$ 0,32 ^{BCa}	16,33 $\pm$ 0,34 ^{BCb}	15,45 $\pm$ 0,38 ^{Bc}
1	15,78 $\pm$ 0,40 ^{BCb}	16,69 $\pm$ 0,41 ^{Ca}	15,79 $\pm$ 0,22 ^{CDb}	14,30 $\pm$ 0,33 ^{Dc}
3	15,41 $\pm$ 0,51 ^{Cb}	16,55 $\pm$ 0,37 ^{Ca}	15,22 $\pm$ 0,14 ^{Db}	14,32 $\pm$ 0,36 ^{Dc}
5	15,50 $\pm$ 0,39 ^{Cb}	16,66 $\pm$ 0,35 ^{Ca}	15,83 $\pm$ 0,06 ^{CDb}	14,64 $\pm$ 0,34 ^{CDc}
7	16,08 $\pm$ 0,36 ^{BCb}	16,80 $\pm$ 0,30 ^{Ca}	15,86 $\pm$ 0,53 ^{Cb}	14,70 $\pm$ 0,17 ^{Cdc}
10	16,08 $\pm$ 0,37 ^{BCb}	17,13 $\pm$ 0,51 ^{BCa}	15,82 $\pm$ 0,52 ^{CDbc}	15,26 $\pm$ 0,35 ^{BCc}
15	16,62 $\pm$ 0,27 ^{ABb}	17,50 $\pm$ 0,20 ^{ABa}	16,90 $\pm$ 0,32 ^{Bb}	15,63 $\pm$ 0,56 ^{Bc}
<i>h</i>				
0	86,67 $\pm$ 0,26 ^{ABCb}	85,71 $\pm$ 0,14 ^{BCc}	85,95 $\pm$ 0,37 ^{CDEc}	87,19 $\pm$ 0,31 ^{Ea}
1	86,86 $\pm$ 0,49 ^{ABb}	86,18 $\pm$ 0,23 ^{Ac}	86,47 $\pm$ 0,23 ^{ABCbc}	88,66 $\pm$ 0,26 ^{Aa}
3	86,95 $\pm$ 0,38 ^{ABb}	85,62 $\pm$ 0,40 ^{BCDc}	86,98 $\pm$ 0,14 ^{Ab}	88,38 $\pm$ 0,14 ^{Aba}
5	87,31 $\pm$ 0,26 ^{Ab}	86,06 $\pm$ 0,13 ^{ABd}	86,50 $\pm$ 0,14 ^{ABCc}	88,11 $\pm$ 0,28 ^{BCDa}
7	86,50 $\pm$ 0,35 ^{BCb}	86,16 $\pm$ 0,18 ^{Ab}	86,26 $\pm$ 0,54 ^{BCDb}	88,21 $\pm$ 0,23 ^{BCa}
10	86,98 $\pm$ 0,43 ^{ABb}	85,67 $\pm$ 0,31 ^{BCc}	86,59 $\pm$ 0,50 ^{ABb}	87,76 $\pm$ 0,29 ^{Da}
15	86,46 $\pm$ 0,28 ^{BCb}	85,60 $\pm$ 0,21 ^{CDc}	85,87 $\pm$ 0,14 ^{DEc}	87,80 $\pm$ 0,19 ^{CDa}

Média de seis replicatas seguido do desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha e mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). L - luminosidade; a* - intensidade da cor vermelha; b* - intensidade da cor amarela; C* - saturação da cor; h* - tonalidade cromática.

6 CONCLUSÃO

A adição de 5U de CGTase mostrou efeito positivo nas características tecnológicas do pão, apresentando um efeito antienvelhecimento, com aumento no volume e redução na firmeza do miolo e na retrogradação da amilopectina (ΔH) dos pães devido à presença de dextrinas lineares de baixo peso molecular e oligossacarídeos produzidos a partir da ação da CGTase sobre o amido. As ciclodextrinas produzidas pela ação da CGTase, quando em pequenas concentrações, também podem ter influenciado de forma positiva na taxa de envelhecimento do pão, devido a formação de complexos de inclusão com os lipídeos. No entanto, concentrações maiores de enzima não apresentaram o efeito antienvelhecimento possivelmente devido a produção excessiva de dextrinas a partir da ação conjunta da CGTase e α -amilase presente naturalmente na farinha de trigo.

A β CD desestabiliza o complexo amilose-lipídeo e compete com o amido para a formação do complexo β CD-lipídeo, modificando as características reológicas da massa, aumentando o volume específico do pão e reduzindo a firmeza do miolo exercendo um efeito antienvelhecimento nos pães. Durante o armazenamento, a presença de β CD aumentou os valores do ΔH , sugerindo que a retrogradação da amilopectina não é a única responsável pela taxa de envelhecimento do pão. O efeito antienvelhecimento da β CD pode estar relacionado com a maior quantidade e redistribuição da água no pão e com as interações da β CD com o amido e as proteínas presentes na farinha.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC, Approved methods of the American of Cereal Chemists. 7^a ed. v. 2. St. Paul: Minnesota, 2000.

AGUIRRE, J. F., OSELLA, C. A., CARRARA, C. R., SANCHEZ, H. D., BUERA, M. P., Effect of storage temperature on starch retrogradation of bread staling. **Starch/Stärke**, v.63, p.587-593, 2011.

ALMEIDA, E. L., **Estudo de pão francês pré-assado congelado elaborado com farinha de trigo integral: influência da formulação, processo e estocagem congelada**. Campinas – SP. Tese de doutorado em Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2011. 250 p.

ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e seqüenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii***. Rio Claro – SP. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005. 150 p.

ALVES-PRADO, BOCCHINI, D. A., E., GOMES, E., BAIDA, L. C. CONTIERO, J., ROBERTO, I. C., SILVA, R. da. Optimization of cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus clausii* strain E16 in submerged fermentation using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-14, p. 27-40, 2007.

ATWELL, W. A., **Wheat Flour**. St. Paul: Eagan Press, 2001. 134 p.

BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian Journal Physiology Pharmacology** , v. 69, n. 1, p. 60-78, jan. 1991.

BLACKWOOD, A. D; BUCKE, C. Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase solvent effects on CGTase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 704-708, nov. 2000.

BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3^a edição. São Paulo: Varela, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 90, de 17 de outubro de 2000**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Visualizado em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/adivo.htm> Acesso em: 17 dez. 2013.

CARDELLO, H.M. A.B, CELESTINO, E.M. Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes encapsulantes. **Boletim SBCTA**, v. 30, n. 2, p. 166-171, jul./dez. 1996.

CAUVAIN, S. P., YOUNG, L. S. **Tecnologia de Panificação**. Barueri, SP: Manole, 2ª ed., 2009.

COLAKOGLU, A. S., ÖZKAYA, H., Potential use of exogenous lipases for DATEM replacement to modify the rheological and thermal properties of wheat flour dough. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 397-404, 2012.

COURTIN, C. M; DELCOUR, J. A. Arabinoxilans and endoxylanases in wheat flour bread-making. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 225-243, 2002.

CUCOLO, G. R., ALVES-PRADO, H. F., GOMES, E., SILVA, R. Otimização da Produção de CGTase de *Bacillus sp* Subgrupo *alcalophilus* E16 em Polvilho Doce em Fermentação Submersa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 201-208, 2006.

D'APPOLONIA, B. D. Factor for consideration in bread staling. In: **International Symposium on advances in baking science and technology**, Kansas State University, Manhattan, KS, 1984.

DE CASTRO, A. D., SILVA JR, N. P., CURY, B. S. F., EVANGELISTA, R. C., FREITAS, L. A. P., GREMIÃO, M. P. D. A new approach to the granulation of β -ciclodextrin inclusion complexes. **Chemical Engineering Journal**, v. 164, p. 316-321, 2010.

DRAGSDORF, R. D., VARRIANO-MARSTON, E. Bread Staling: X-Ray Diffraction Studies on Bread Supplemented with α -Amylases from Different Sources. **Cereal Chemistry**, v. 57, p. 370-314, 1980.

DRUNKLER, D. A., FETT, R., LUIZ, M. T. B. Polímeros e Ciclodextrina: Características, formação de complexos de inclusão e aplicações industriais. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v.17, n.1, p. 21-32, 1999.

DUCHÊNE, D., BOCHOT, A. YU, S. C., PÉPIN, C., SEILLER, M. Cyclodextrins and emulsions. **International Journal of Pharmaceutics** v. 266, p. 85-90, 2003.

EL-DASH, A. A., CAMARGO, C. O., DIAZ, N. M. **Fundamentos da Tecnologia de Panificação**. 345 p., 1982.

ELFSTRAND, L. FRIGÂRD, T.; ANDERSSON, R.; ELIASSON, A.; JÖNSSON, M.; RESLOW, M.; WAHLGREN, M. Recrystallisation behavior of native and processed waxy maize starch in relation to the molecular characteristics. **Carbohydrate Polymers**, n. 57, p. 389-400, 2004.

ELIASSON, A. C., LARSSON, K. **Cereals in breadmaking: a molecular colloidal approach**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. 376 p.

FRANCIS, F. J., CLYDESDALE, F. M. **Food Colorimetry Theory and Applications**. Westport: AVI, 1975. 467p.

FRANCO, C. M., DAIUTO, E. R., DEMIATE, I. M., CARVALHO, J. C. B., LEONEL, M., VILPOUX, O. F., SARMENTO, S. B. S. **Culturas de Tuberculosas Amiláceas Latino Americanas: Propriedades Gerais do amido**. 1ª ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 224 p.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.

GOESAERT, H. BRIJS, K., VERAVERBEKE, W. S., COURTIN, C. M., GEBRUERS K., DELCOUR, J. A. Review: Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.12-30, 2005.

GRAY, J. A., BEMILLER, J. N., Bread staling: Molecular basis and control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p. 1-20, 2003.

GREEBLATT, H. C., DOMBROSKI, M., KLISHEVICH, W., KIRKPATRIK, I.B., GARRISON, W., REDDING, B.K. Encapsulation and controlled release of flavours and fragrances. In: ENCAPSULATION and controlled release. **Cambridge : Royal Society of Chemistry**, p. 148-162, 1993.

GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial do trigo**. Embrapa. 2ª edição, Passo Fundo – RS, 1996.

GUJRAL, H. S., GUARDIOLA, I., CARBONELL, J. V., ROSELL, C. M., Effect of cyclodextrinase on dough rheology and bread quality from rice flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 3814-3818, 2003.

GUJRAL, H. S., ROSELL, C. M. Modification of pasting properties of wheat starch by cyclodextrin glycosyltransferase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1685-1690, 2004.

GUNARATNE, A., CORKE, H., Influence of unmodified and modified cycloheptaamylose (β -cyclodextrin) on transition parameters of amylose-lipid complex and functional properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 226-234, 2007.

GUTKOSKI, L. C., ANTUNES, E., ROMAN, I. T., Avaliação do grau de extração de farinhas de trigo e de milho em moinho tipo colonial. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 17, nº 2, p. 153-166, 1999.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HOOVER, R. Composition, molecular structure and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

HOSENEY, R. C. Functional properties of pentosans in baked foods. **Food Technology**, v.38, p. 114-117, 1984.

HOSENEY, R. C., HE, H. Changes in bread firmness and moisture during long – term storage. **Cereal Chemistry**, v. 67, nº 6, p. 603-605, 1990.

HOSENEY, R. C. **Principios de Ciencia y Tecnología de Los Cereales**. Zaragoza: Acribia,, 1991. 321 p.

HU, G., HUANG, S., CAO, S., MA, Z. Effect of enrichment with hemicellulose from rice bran on chemical and functional properties of bread. **Food Chemistry**, v. 115, p. 839-842, 2009.

HUG-ITEN, S., ESCHER, F., CONDE-PETIT, B. Structural Properties of Starch in Bread and Bread Model Systems: Influence of an Antistaling α -Amylase. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 421-428, 2001.

JEMLI, S., MESSAOUD, E. B., AYADI-ZOUARI, D., NAILI, B., KHEMAKHEM, B., BEJAR, S., A β -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US 132 strain: Purification, properties and potential use in Bread-making. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 44-50, 2007.

JENSEN, S. OESTDAL, H., SKIBSTED, L. H., LARSEN, E., THYBO, A. K. Chemical changes in wheat pan bread during storage and how it affects the sensory perception of aroma, flavor, and taste. **Journal of Cereal Science**, v. 53, p. 259-268, 2011.

KAWAMURA-KONISHI, Y., SHODA, K., KOGA, H., HONDA, Y. Improvement in gluten-free rice bread quality by protease treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 45-50, 2013.

KIM, H. O.; HILL, R. D. Modification of wheat flour dough characteristics with cycloheptaamylose. **Cereal Chemistry**, v. 61 p. 406-409, 1984.

LEE, M. R., SWANSON, B. G., BAIK, B. K. Influence of amylase content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. **Cereal Chemistry**, v.78, n. 6, p. 701-706, 2001.

LEE, S. H., KIM, Y. W., LEE, S., AUH, J. H., YOO, S. S., KIM, T. J., KIM, J. W., KIM, S. T., RHO, H. J., CHOI, J. H., KIM, Y. B., PARK, K. H. Modulation of Cyclizing Activity and Thermostability as an Antistaling Enzyme. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1411-1415, 2002.

LI, D. W., HUANG, J. C., CORKE, H. Effect of β -cyclodextrin on pasting properties of wheat starch. **Nahrung**, v. 44, n. 3, p. 164-167, 2000.

LIANG, X., KING, J. M., SHIH, F. F., Pasting property differences of commercial and isolated rice starch with added lipids and β -Cyclodextrin. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 812-818, 2002.

LINDNER, K, SZENTE, L., SZEJTLI, J. Food flavoring with β -cyclodextrin complex flavor substances. **Acta Alimentaria**, v. 10, n. 3, p. 175-185, 1981.

LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**. v. 16, n. 2, p. 219-226, 2003.

MAKELÄ, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J., LAAKSO, S.V. Nonchromatographic cyclodextrin: evaluation of sensitivity and conversion mixture applications. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.83-88, 1988.

MANDARINO, J. M. G. **Aspectos importantes para a qualidade do trigo**. Embrapa. Londrina – PR, 1993.

MARTIN, M. L., ZELEZNAK, K. J., HOSENEY, R. C., A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. **Cereal Chemistry**, v. 68, nº 5, p. 498-503, 1991.

MARTIN DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1033-1046, 2004.

MOUSIA, Z.; EDHERLY, S.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Effect of wheat pearling on flour quality. **Food Research International**, v.37, p. 449-459, 2004.

NUNES, J. C. **Modificações enzimáticas em pães brancos e pães ricos em fibras: Impactos na qualidade**. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos – UFRGS. Porto Alegre, 2008.

OLIVEIRA, D. S., **Aplicação de xilanase e/ou ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) na produção de pães**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto-SP, 2010. 150 p.

OLIVEIRA, D. S., TELIS-ROMERO, J., DA-SILVA, R., FRANCO, C. M. L. Effect of a *Thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. **Food Chemistry**, v. 143, p. 139-146, 2014.

ONYANGO, C., MUTUNGI, C., UNBEHEND, G., LINDHAUER, M. G. Rheological and baking characteristics of batter and bread prepared from pregelatinised cassava starch and sorghum and modified using microbial transglutaminase. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 465-470, 2010.

OSBORNE, T. B. The vegetable proteins. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 43, p. 440, 1924.

PARK, C. S., BAIK, B. K. Relationship between protein characteristics and instant noodle making quality of wheat flour. **Cereal Chemistry**, v. 81, p. 159-164, 2004.

PATEL, M. J., NG, J. H. Y., HAWKINS, W. E., PITTS, K. F., CHAKRABARTI-BELL, S. Effects of fungal α -amylase on chemically leavened wheat flour doughs. **Journal of Cereal Science**, v. 56, p. 644-651, 2012.

PHIMOLSIRIPOL, Y., MUKPRASIRT, A., SCHOENLECHENER, R. Quality improvement of rice-based gluten-free bread using different dietary fibre fractions of rice bran. **Journal of Cereal Science**, v. 56, p. 389-395, 2012.

PIZZINATO, A., **Qualidade da farinha de trigo: Conceitos, fatores determinantes, parâmetros de avaliação e controle**. Campinas: ITAL, 1997. 71 p.

PONGSAWASKI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase – producing bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, p. 463-467, 1987.

PRIMO-MARTÍN, C., VAN-NIEUWENHUIJZEN, N. H., HAMER, R. J., VAN-VLIET, T. Crystallinity changes in wheat starch during the bread-making process: Starch crystallinity in the bread crust. **Journal of Cereal Science**, v. 45, p. 219-226, 2007.

PUPPO, M. CALVELO, A., AÑÓN, M. C. Physicochemical and rheological characterization of wheat flour dough. **Cereal Chemistry**, v. 82, p. 173-181, 2005.

QUAGLIA G. B., GENNARO L. ENZYMES – Uses in Food Processing. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2^a ed. p.2125-2139, 2003.

RAVI, R., MANOHAR, R. S., RAO, P. H., Influence of additives on the rheological characteristics and baking quality of wheat flours. **European Food Research and Technology**, v. 210, p. 202-208, 2000.

RIBOTTA, P. D., BAIL, A. L. E. Thermo-physical assessment of bread during staling. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 40, p. 879-884, 2007.

SAHAA, B.C., JORDANA, D.B., BOTHASTB, R.J., Enzymes, Industrial (overview). **Encyclopedia of Microbiology**, p. 281-294, 2009.

SCHEUER, P. M., FRANCISCO, A., MIRANDA, M. Z., LIMBERGER, V. M. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n.2, p.213-224, 2011.

SERAVALLI, E. A. G., IGUTI, A. M., SANTANA, I. A., FILHO, F. F. Effects of application of transglutaminase in wheat proteins during the production of Bread. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 935-942, 2011.

SHAH, A. R., SHAH, R. K., MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresouce Technology**, v. 97, p. 2047-2053, 2006.

SHIM, J. H., SEO, N. S., ROH, S. A., KIM, J. W., CHA, H., PARK, K. H., Improved Bread-Baking Process Using *Saccharomyces cerevisiae* Displayed with Engineered Cyclodextrin Glucanotransferase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4735-4740, 2007.

SINGH, N. SINGH, J., KAUR, L., SODHI, N. S., GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, p.219-231, 2003.

SLUIMER, P. **Principles of Breadmaking: Functionality of Raw Materials and Process Steps**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 2005. 212 p.

STAMPFLI, L., NERSTEN, B., MOLTEBERG, E. L. Effects of emulsifiers on farinograph and extensograph measurements. **Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 523-530, 1996.

STEFFOLANI, M. E., RIBOTTA, P. D., PÉREZ, G. T., LEÓN, A. E. Effect of glucose oxidase, transglutaminase and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 366-373, 2010.

SVENSSON, D., ADLERCREUTZ, P. Characterisation of a glycosylated alkyl polyglycoside produced by a cyclodextrin glycosyltransferase by HPLC-ELSD and –MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1857-1860, 2011.

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal of Materials Chemistry*, v. 7, p. 575-687, 1997.

SZENTE, L., SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 137-142, 2004.

TIAN, Y., LI, Y., MANTHEY, F. A., XU, X., JIN, Z., DENG, L., Influence of β -cyclodextrin on the short-term retrogradation of rice starch. **Food Chemistry**, v.119, p. 54-58, 2009a.

TIAN, Y. Q., LI, Y., XU, X. M., WANG, J. P., JIAO, A. Q., YU, B., TALBA, T. β -Cyclodextrin (β -CD): A new approach in bread staling. **Thermochimica Acta**. V. 489, p.22-26, 2009b.

TIAN, Y., YANG, N., XU, X., ZHAN, J., JIN, Z. Potential interaction between β -cyclodextrin and amylose-lipid complex in retrograded rice starch. **Carbohydrate Polymers**. v.80, p. 581-584, 2010.

TOBITSUKA, K., MIURA, M., KOBAYASHI, S. Interaction of cyclodextrins with aliphatic acetate esters and aroma components of La France pear. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 5402-5406, 2005.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 22, p.678-686, 1998.

VENTURINI, C. G; NICOLINI, J; MACHADO, C; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.

ZOBEL, H. F., KULP, K. The staling mechanism. In R. E. Hebeda, & H. F. Zobel (Eds.), Baked goods freshness: **Technology, evaluation, and inhibition of staling**. p. 1–64, 1996.

ZOBEL, H. F., SENTI, F. R., The bread staling problem. X-ray diffraction studies on breads containing a cross-linked starch and a heat-stable amylase. **Cereal Chemistry**, v. 36, p. 441-451.