



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

RAÍSSA INGRID SANTANA ARAÚJO COSTA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ZEÍNA E COLÁGENO
HIDROLISADO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE
PÃO SEM GLÚTEN**

SÃO CRISTÓVÃO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

RAÍSSA INGRID SANTANA ARAÚJO COSTA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ZEÍNA E COLÁGENO
HIDROLISADO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE
PÃO SEM GLÚTEN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Beltrão Lessa
Constant

São Cristóvão/SE
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C837e Costa, Raíssa Ingrid Santana Araújo.
Efeito da adição de zeína e colágeno hidrolisado nas características físicas de pão sem glúten / Raíssa Ingrid Santana Araújo Costa ; orientadora Patrícia Brandão Lessa Constant. – São Cristóvão, SE, 2021.
72 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)
– Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Trigo. 2. Pão. 3. Glúten. 4. Colágeno. I. Constant, Patrícia Brandão Lessa, orient. II. Título.

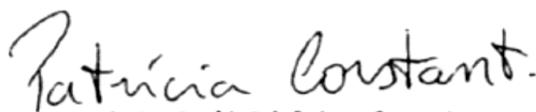
CDU 633.11

RAÍSSA INGRID SANTANA ARAÚJO COSTA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ZEÍNA E COLÁGENO HIDROLISADO NAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE PÃO SEM GLÚTEN**

Dissertação de mestrado aprovada no Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos em 27 de outubro de 2021.

BACA EXAMINADORA

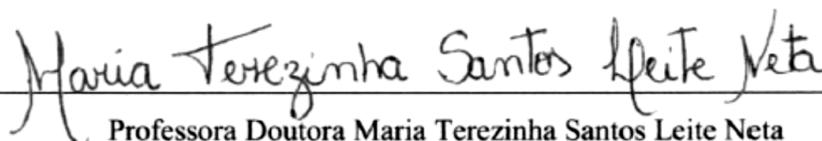


Profa. Dra. Patrícia Beltrão Lessa Constant
SIAPE 1348828

DTA/UFS

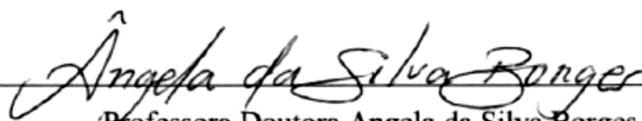
Professora Doutora Patrícia Beltrão Lessa Constant

Orientadora/PROCTA-UFS



Professora Doutora Maria Terezinha Santos Leite Neta

1º. Examinadora/PROCTA-UFS



Professora Doutora Ângela da Silva Borges

2º. Examinadora/DTA-UFS

São Cristóvão/SE

2021

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda e apoio de pessoas maravilhosas que estiveram ao meu lado ajudando-me no que fosse possível para que ao final tudo desse certo, em especial: A Deus por me guiar e dar força sempre. À minha família por parte de mãe, principalmente a minha avó Maria José, tias-avós Leda e Ana, tias Carina e Olga e tio Netto, guerreiros (as) e exemplos fundamentais para minha formação pessoal. A minha mãe Jean Karla (in memoriam), a qual devo todo esforço e dedicação. À minha família por parte de pai, principalmente a meu pai Euton, Ligia e meu pequeno Ryan por serem sempre meu equilíbrio e alegria. Agradeço a uma pessoa que a UFS me presenteou, aquele que conquistou meu coração e admiração, meu namorado Danillo. Obrigada por todo amor, paciência e apoio, Te Amo! Agradeço também a família de Danillo, principalmente minha sogra Celia e a avó Maria de Lourdes, por todo carinho e acolhimento, vocês são especiais.

Aos meus amigos de infância e do Salesiano Joana, Thaís, Isabelle, Carlos Eduardo, Daniel, Aline e Matheus, por estarem sempre ao meu lado, desde os desabafos, choros e risadas, sei que sempre posso contar com vocês e vocês comigo. Ao grupo Txuco pelo acolhimento e por dividirem comigo muitos momentos de alegria e descontração. Agradeço a Vanessa e Itallo pela amizade e por estarem comigo em momentos muito felizes e com muito rock 'n' roll.

Aos meus amigos da UFS, em especial Aline, Alysson, Annuska, Erica, Gabriel, Gabriela, Glenda, Isabela, Jideane, Jucenir, Luanne, Moema, Paula, Patrícia, Sonja, Tassiana, Thaís, Tuania, Uelisson e Weverton, por compartilharem comigo os momentos bons e ruins da universidade, os quais vocês fizeram total diferença. Aos meus amigos do CsF Mankato - USA por dividirem comigo essa experiência única de vida, não poderia ter ido para MNSU com pessoas melhores.

Aos meus professores do DTA e PROCTA que nunca mediram esforços em suas aulas e nos momentos de dúvidas, além das orientações profissionais e exemplos pessoais.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patricia Beltrão Lessa Constant por me guiar nesse mestrado e por todo carinho e paciência.

Agradeço a Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de formação e crescimento.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para que eu conseguisse completar esse desafio e me tornar quem sou hoje.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

COSTA, R. I. S. A. Efeito da adição de zeína e colágeno hidrolisado nas características físicas de pão sem glúten [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe; 2021.

RESUMO

O pão com boas características de qualidade requer desempenho adequado em relação ao desenvolvimento da massa e aspecto físico do pão. Diante disto, se apresentou a necessidade de estudar as características tecnológicas dos substitutos de glúten, principalmente para pães, como por exemplo a utilização de farinhas isentas de glúten, como a farinha de arroz, e a adição de proteínas na massa, como a zeína e o colágeno hidrolisado. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver pães isentos de glúten elaborados com farinha de arroz, com a adição de zeína e colágeno hidrolisado em diferentes proporções, e avaliar o efeito dessas proteínas sobre os pães a partir das suas características físicas. Os pães sem glúten foram desenvolvidos segundo o delineamento fatorial 2^2 inteiramente casualizado para avaliar o efeito da zeína isolada com o nível de dosagem variando de 0 a 8% e o colágeno hidrolisado variando de 0 a 4%, totalizando 4 tratamentos (Controle, Colágeno, Zeína e Colágeno com Zeína) com 3 repetições cada. Os tratamentos foram submetidos a análises físicas (cor, volume específico, perda de peso ao assar e firmeza), os quais passaram por análise de variância (ANOVA) e Teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o software Statistical Analysis System (SAS®) Studio, e microscopia digital. De acordo com os resultados a coloração da crosta e do miolo dos pães tiveram influência da zeína e dos pigmentos do milho tornando-os pães amarelados. A adição do colágeno hidrolisado e zeína isolada tiveram influência significativa ($p \leq 0,05$) quanto ao volume específico, perda de peso ao assar e firmeza, tornando os pães com maior volume específico ($2,19 \pm 0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$), menor percentual de perda de peso ($10,16 \pm 0,02\%$) e menor firmeza da crosta (5668 gf) em comparação com o controle. A microscopia digital comprovou visualmente o aumento da porosidade da crosta e do número de células do miolo nos pães adicionados das proteínas, os tornando menos firmes. Portanto, a adição da zeína isolada e do colágeno hidrolisado teve um efeito positivo nos pães sem glúten com relação as características físicas analisadas.

Palavras-chave: Zeína, glúten, colágeno, pão.

COSTA, R. I. S. A. Effect of zein and hydrolyzed collagen addition on physics characteristics of gluten-free bread [Dissertation]. São Cristóvão: Program Postgraduate Food Science and Technology, Federal University of Sergipe; 2021.

ABSTRACT

Bread with good quality characteristics requires adequate performance in relation to the development of dough and physical aspect of bread. Therefore, the need to study the technological characteristics of gluten substitutes was presented, especially for breads, such as the use of gluten-free flours, such as rice flour, and the addition of proteins in the dough, such as zein and hydrolyzed collagen. The present work aimed to develop gluten-free breads made with rice flour, with the addition of zein and hydrolyzed collagen in different proportions, and to evaluate the effect of these proteins on the breads from their physical characteristics. The gluten-free breads were developed according to the 2² factorial design completely randomized to evaluate the effect of isolated zein with the dosage level ranging from 0 to 8% and hydrolyzed collagen ranging from 0 to 4%, totaling 4 treatments (Control, Collagen, Zein and Collagen with Zein) with 3 replications each. The treatments were submitted to physical analyses (color, specific volume, bake loss and firmness), which underwent analysis of variance (ANOVA) and Tukey test ($p \leq 0.05$) using the Software Statistical Analysis System (SAS®) Studio, and digital microscopy. According to the results, the color of the crust and crumb in the breads had the influence of zein and corn pigments making them yellowish breads. The addition of hydrolyzed collagen and isolated zein had an influence on the specific volume, bake loss and firmness, making the breads with higher specific volume ($2,19 \pm 0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$), lower percentage of weight loss ($10,16 \pm 0,02\%$) and lower firmness of the crust (5668 gf) compared to the control. Digital microscopy visually proved the increase in crust porosity and the number of crumb cells in protein added breads, making them less firm. Therefore, the addition of zein and hydrolyzed collagen had a positive effect on gluten-free breads in relation to the physical characteristics analyzed.

Keywords: Zein, gluten, collagen, bread.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Rede proteica viscoelástica típica do glúten.	22
Figura 2- Estrutura da rede proteica do glúten.	23
Figura 3- Processo de gelatinização do amido.	27
Figura 4- Anatomia do grão de milho e suas partes.	32
Figura 5- Modelo de estrutura secundária da proteína zeína.	34
Figura 6- Método de extração da zeína.	37
Figura 7- Zeína obtida pelo método de extração química modificado de Sant´ana (2012).	42
Figura 8- Análise visual da cor da crosta dos pães sem glúten de acordo com cada tratamento.	43
Figura 9- Análise visual do volume dos pães sem glúten.	45
Figura 10- Interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre o volume específico dos pães sem glúten.	47
Figura 11- Interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre a perda de peso ao assar. ...	50
Figura 12- Análise de firmeza da crosta e do miolo (fatias) dos pães sem glúten para cada tratamento.	52
Figura 13- Interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre a firmeza da crosta.	54
Figura 14- Microscopia digital do tratamento controle.	56
Figura 15- Microscopia digital do tratamento colágeno.	56
Figura 16- Microscopia digital do tratamento zeína.	57
Figura 17- Microscopia digital do tratamento colágeno e zeína.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teor de glúten para farinhas de diferentes categorias de produtos.	15
Tabela 2- Características das proteínas do trigo.	21
Tabela 3- Percentual de proteína total em diferentes cereais.	22
Tabela 4- Composição centesimal em base seca de farinha de arroz crua.	25
Tabela 5- Condições para a declaração da informação nutricional complementar das proteínas (conteúdo absoluto).	31
Tabela 6- Formulações de pães sem glúten elaborados com farinha de arroz.	38
Tabela 7- Níveis codificados e decodificados das variáveis colágeno hidrolisado e zeína.	39
Tabela 8- Matriz do delineamento fatorial 2 ² inteiramente casualizado sem blocagem para elaboração dos pães sem glúten com farinha de arroz, colágeno hidrolisado e zeína.	39
Tabela 9- Determinação de cor da crosta e do miolo dos pães sem glúten expressos no sistema CIELAB.	43
Tabela 10- Volumes específicos dos pães sem glúten segundo o delineamento experimental.	45
Tabela 11- Efeito do colágeno hidrolisado sobre o volume específico dos pães sem glúten.	46
Tabela 12- Efeito da zeína sobre o volume específico dos pães sem glúten.	46
Tabela 13- Perda de peso ao assar dos pães sem glúten segundo o delineamento experimental.	49
Tabela 14- Efeito do colágeno hidrolisado sobre a perda de peso ao assar dos pães sem glúten.	49
Tabela 15- Efeito da zeína sobre a perda de peso ao assar dos pães sem glúten.	50
Tabela 16- Firmeza da crosta e do miolo dos pães sem glúten segundo delineamento experimental.	53
Tabela 17- Efeito do colágeno hidrolisado na firmeza da crosta e do miolo dos pães sem glúten.	53
Tabela 18- Efeito da zeína na firmeza da crosta e do miolo dos pães sem glúten.	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Pão.....	14
2.1.1.Principais ingredientes para a formulação de pães	14
2.1.1.1. Farinha de trigo	14
2.1.1.2. Água	15
2.1.1.3. Fermento biológico.....	16
2.1.1.4. Cloreto de sódio.....	16
2.1.1.5. Açúcar	16
2.1.1.6. Gordura.....	17
2.2. Etapas do processo de produção do pão.....	17
2.2.1.Formação da massa	17
2.2.2.Fermentação	18
2.2.3.Forneamento.....	19
2.2.4.Resfriamento	20
2.3. Características de qualidade do pão	20
2.4. Glúten.....	21
2.5. Panificação isenta de glúten.....	23
2.5.1.Matérias-primas para panificação isenta de glúten	25
2.5.1.1. Farinha de arroz.....	25
2.5.1.2. Amidos	26
2.5.1.3. Féculas.....	28
2.5.1.4. Hidrocoloides	28
2.5.1.5. Proteínas	30
2.5.1.6. Colágeno Hidrolisado.....	31
2.5.1.7. Zeína.....	32

3. OBJETIVOS	36
3.1. Geral.....	36
3.2. Específicos	36
4. METODOLOGIA	37
4.1. Matéria-prima.....	37
4.2. Extração da proteína do milho	37
4.2.1. Método de extração da proteína do milho.....	37
4.2.2. Rendimento da extração da proteína do milho.....	38
4.3. Formulação dos pães sem glúten.....	38
4.4. Delineamento Experimental.....	38
4.5. Processamento dos pães sem glúten.....	39
4.6. Análises Físicas.....	40
4.6.1. Determinação de Cor.....	40
4.6.2. Determinação de volume específico	40
4.6.3. Perda de peso ao assar.....	40
4.6.4. Determinação de Firmeza	41
4.6.5. Microscopia digital.....	41
4.7. Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Rendimento da zeína	42
5.2. Determinação de cor	43
5.3. Determinação de volume específico	45
5.4. Perda de peso ao assar.....	49
5.5. Determinação de firmeza	52
5.6. Microscopia digital.....	56
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A produção de pão é uma das atividades mais antigas da humanidade, onde sua origem é relatada pelo cultivo de cereais no Oriente Médio (CAUVAIN e YOUNG, 2009; KOHMANN, 2010). Tradicionalmente, o pão é elaborado a partir da farinha derivada do trigo, porém outros tipos de cereais, leguminosas e legumes podem ser moídos, produzindo uma farinha, contudo restringe-se ao trigo e algumas outras sementes de cereais a presença de proteínas que possuem a capacidade de formar uma rede de glúten na massa (CAUVAIN e YOUNG, 2009).

O glúten é uma rede proteica formada por gluteninas e prolaminas presente no trigo, na aveia, na cevada e no centeio, o qual possui a capacidade de aumentar a absorção de água, coesividade, viscosidade e elasticidade, tendo assim um papel importante em produtos de panificação, de confeitaria e em massas, apresentando um amplo mercado consumidor (WIESER, 2006). Contudo, seu consumo pode provocar reações adversas, tais como alergia ao trigo e doença celíaca (O'SHE, ARENDT, GALLAGHER, 2014).

A doença celíaca (DC) é uma intolerância alimentar, ou seja, uma enfermidade do sistema imunológico, que inviabiliza o metabolismo do glúten, o qual é o termo empregado para especificar as prolaminas. As frações proteicas do glúten tóxicas ao paciente com doença celíaca são diferentes em cada um dos cereais: gliadina no trigo, hordeína na cevada, secalina no centeio e avenina na aveia (ALMEIDA, 2011; FRANCO, 2015). Caso o celíaco ingira esses alimentos, ele sofrerá consequências gastrintestinais e nutricionais, podendo ocorrer perda de peso e apresentar sintomas associados à deficiência de vitaminas e minerais (ALMEIDA, 2011).

Estima-se que no Brasil existe um portador da doença celíaca para cada trezentos habitantes. O seu tratamento é feito a partir da dieta isenta de glúten, não podendo ser consumido trigo, aveia, centeio, cevada e malte ou seus derivados (ARAÚJO e ARAÚJO, 2011). Para garantir essa prática no Brasil, foi promulgada a Lei nº10.674, de 16 de maio de 2003, a qual determina que todos alimentos industrializados deverão conter em seu rótulo, obrigatoriamente, as inscrições "contém Glúten" ou "não contém Glúten" (BRASIL, 2003).

A adesão a dieta isenta de glúten torna-se difícil devido à falta de produtos disponíveis no mercado e os produtos com substitutos do glúten nem sempre atingem qualidade e sabor semelhantes aos produtos originais, os quais nem sempre dispõem de qualidade nutricional que atendam às necessidades diárias (CJAZABULSA, 2014). Segundo dados da Associação de Celíacos do Brasil (ACELBRA), os produtos que os celíacos buscam encontrar no mercado com mais facilidade são o pão (47%), seguido de bolacha/biscoito (21%), macarrão (21%) e pizza (11%) (ACELBRA, 2004).

Diante disso, existe a necessidade de estudar as características tecnológicas, sensoriais e nutricionais dos substitutos de glúten, principalmente para pães sem glúten, como por exemplo a utilização de farinhas isentas de glúten, como a farinha de arroz, a utilização da proteína presente no milho, a zeína e a adição de colágeno hidrolisado.

A farinha de arroz é utilizada como fonte de amido base na preparação de pães sem glúten devido ao baixo nível de prolamina, e além disso, o arroz possui características nutricionais favoráveis, como baixo teor de sódio, gordura e alta quantidade de hidratos de carbono facilmente digeríveis (SILVA, 2014). No entanto, farinhas e amidos apresentam baixo teor de proteína, o que leva a pães com menor teor de proteína, mas com maior teor de carboidratos do que os pães de trigo. Como consequência, pães com má qualidade nutricional, aroma fraco e crosta leve são obtidos, uma vez que as proteínas são necessárias para as reações de Maillard, que são responsáveis pela cor da crosta e geração de compostos voláteis (PICO et al., 2019).

Uma possibilidade para melhorar as características tecnológicas da panificação utilizando farinha de arroz é a adição de colágeno ao produto elaborado (GRAÇA *et al*, 2017). O colágeno hidrolisado é uma proteína natural derivada do colágeno nativo, encontrado na pele e ossos de bovinos, suínos, aves e peixes e a sua utilização se deve principalmente pela capacidade de retenção de água, por possuir alto teor proteico (de 84 a 90%) e por ser um agente ligante (DENIS et al. 2008). Não contém carboidratos e seu produto final não apresenta sabor amargo, além de contribuir para sua ótima aglutinação e textura crocante (FERREIRA, ROBERTO E CAMISA, 2018).

As fontes de proteínas também têm sido investigadas para melhorar a qualidade e o desenvolvimento de pães isento de glúten, a exemplo da zeína (FRANCO, 2015; SCHOBER et al, 2008). Zeína é o nome específico de uma das proteínas derivadas do endosperma dos grãos de milho, classificada do grupo das prolaminas, caracterizadas pelo alto teor de aminoácidos apolares que conferem estrutura molecular hidrofóbica e solúvel em álcool e representando cerca de 60% das proteínas totais do milho (PAPALIA & LONDERO, 2015).

Portanto, o desenvolvimento de novas formulações de pães sem glúten utilizando zeína e colágeno hidrolisado oferecem um método viável para aumentar a ingestão de proteína na dieta, promovem a inovação no setor de pães, produtos de confeitaria, podem melhorar características físicas, sensoriais e nutracêuticas, como melhorar ainda mais a reologia da massa, o desempenho do cozimento desse tipo de pão, coloração da crosta, e por fim, disponibilizar ao consumidor que possui a doença celíaca um produto de qualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pão

Pão, por definição, é o produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes (BRASIL, 2000).

É considerado um gênero alimentício de primeira necessidade e popular, onde poucos países no mundo não o produzem e consomem tanto para lanches como junto as refeições (SANTOS, 2014; CAUVAIN e YOUNG, 2009). No Brasil, o pão é consumido nas refeições, devido aos costumes da grande população de baixa renda, por ser constituído de nutrientes essenciais e fornecedores de energia, como os carboidratos, adicionados por outros como lipídios e proteínas (LIMA, 2007). Segundo o estudo do SEBRAE e ABIP (2009), o consumo de pães tem aumentado no Brasil, nos últimos anos, inclusive com a inclusão de produtos elaborados com outras matérias-primas, como a mandioca e o milho, onde o consumo per capita do brasileiro é de 32,61 kg de pães/ano. No entanto, por se tratar de um alimento que contém glúten, o mesmo não pode ser consumido pelos celíacos (SANTOS, 2014).

2.1.1. Principais ingredientes para a formulação de pães

Segundo a ANVISA os pães são classificados de acordo com os ingredientes e/ou processos de fabricação e/ou formato, onde em sua composição os ingredientes obrigatórios são a farinha de trigo e ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas, água, e demais ingredientes específicos – como sal (cloreto de sódio), açúcar, óleo e gorduras – para cada produto de acordo com sua classificação e ou designação (BRASIL, 2000).

2.1.1.1. Farinha de trigo

A Farinha de trigo é o produto primário obtido por moagem do endosperma amiláceo de grãos de trigo por um sistema gradual de redução e ou outros processos tecnológicos (ARIMATÉA, 2015). É o ingrediente básico utilizado na formulação de todos os produtos de panificação comumente comercializados, pois o trigo apresenta característica ímpar entre os demais cereais que é a propriedade de formar uma massa borrachenta e elástica quando umedecido com água, ou seja a formação da rede de glúten. A qualidade da farinha de trigo está diretamente relacionada com o tipo de trigo de origem o qual através de suas características determina a

principal propriedade de uma farinha, a força a qual reflete diretamente na qualidade tecnológica do produto final (LIMA, 2007).

Uma farinha de trigo forte possui, em geral, maior capacidade de retenção de gás carbônico, por sua vez, uma farinha fraca apresenta deficiência nesta característica. A expressão "força de uma farinha" normalmente é utilizada para designar a maior ou menor capacidade de uma farinha de sofrer um tratamento mecânico ao ser misturada com água, associada à maior ou menor capacidade de absorção de água pelas proteínas formadoras do glúten (LIMA, 2007).

As proteínas do trigo são divididas em dois grupos, um deles formado pelas albuminas e globulinas, representando 15% das proteínas totais e, o outro, formado pela gliadina e glutenina que compreendem os restantes 85% das proteínas. Segundo LIMA (2007) é recomendado o uso de farinhas de trigo com conteúdo proteico entre 10,5 e 12,0% para a produção do pão e glúten extensível. Já segundo Nitzke *et al* (2017?) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimento (ICTA) quando se fala de especificação de farinhas para categorias de produtos, pode-se trabalhar com as seguintes faixas de conteúdo de glúten (Tabela 1)

Tabela 1- Teor de glúten para farinhas de diferentes categorias de produtos.

Características	Massas	Pães	Bolos	Biscoitos Fermentados	Biscoitos Doces
Glúten úmido (%)	> 28	> 26	20-25	25-30	20-25
Glúten seco (%)	> 9	> 8,5	7,0-8,5	8,0-10,0	7,0-8,5

Fonte: Nitzke *et al* (2017?)

2.1.1.2. Água

A água tem grande importância na formação da massa em produtos de panificação. A hidratação da farinha permite a união das proteínas para formação do glúten; controla consistência e a temperatura da massa; dissolve os sais; suspende e distribui os ingredientes; umedece e intumescce o amido; possibilita a ação das enzimas e das leveduras da fermentação; e controla a maciez e palatibilidade do pão (DIAS *et al*, 2019).

A água utilizada na panificação deve ser potável, com dureza intermediária, entre 50-100ppm e pH neutro e ligeiramente ácido. A quantidade a ser adicionada nos produtos depende da capacidade de absorção de água da farinha, da composição de ingredientes, do processo e, varia quanto ao tipo de produto a ser obtido, a exemplo da farinha de trigo a absorção de água varia entre 55 e 65% (EL-DASH *et al*, 1994; DIAS *et al*, 2019).

2.1.1.3. Fermento biológico

O fermento biológico utilizado na panificação é conhecido por ser formado de microrganismos do grupo das leveduras, denominados *Sccharomyces cerevisae* (CONSTANT e CRUZ,2017). A principal função das leveduras é a de promover a fermentação alcoólica dos açúcares, produzindo CO₂, que é responsável pelo crescimento da massa e pela formação dos alvéolos internos do pão. Além de garantir o volume do pão e de conferir alta porosidade da massa, a fermentação é capaz de produzir compostos de sabor e aroma desejáveis, a partir de produtos do metabolismo secundário, tonando, assim o sabor e o aroma característico de produtos de panificação (DIAS *et al*, 2019). As principais formas de fermento biológico comercializadas são o fermento biológico prensado fresco, o fermento biológico seco e o fermento biológico seco instantâneo. Em pães adiciona-se em torno de 2% de fermento (em relação a quantidade de farinha) (DIAS *et al*, 2019).

2.1.1.4. Cloreto de sódio

O cloreto de sódio é o sal comum utilizado na panificação com os objetivos de melhorar o sabor do pão, fortalecer o glúten, pois as gliadinas possuem menor solubilidade em água salgada, fazendo com que a massa obtida em água salgada tenha uma maior quantidade de rede de glúten formada, encurtando essas redes e tornando-as menos extensíveis devido às forças de atração eletrostáticas que ocorrem em presença do sal, assim o glúten fica mais rígido e resistente à fermentação (DIAS *et al*, 2019). Por fim, retarda a ação do fermento, induzindo a saída de água do interior das células do fermento para a massa, diminuindo sua capacidade e produzir gás (CONSTANT e CRUZ, 2017). Caso o sal não seja adicionado à massa, a fermentação ocorrerá rapidamente, no entanto se o conteúdo de sal exceder 2% sobre o peso da farinha, a fermentação será retardada excessivamente (LIMA, 2007).

2.1.1.5. Açúcar

O açúcar presente na massa é proveniente de diferentes tipos de fontes, as quais são o açúcar já presente na farinha, o açúcar adicionado na formulação e o açúcar resultante da degradação do amido pelas enzimas amilases. Dentre os açúcares adicionados temos o em pó ou em forma líquida, como xaropes (DIAS *et al*, 2019). A principal atuação do açúcar é no processo de fermentação, onde são produzidos o álcool e o gás carbônico, conferindo ao pão seu volume (EL-DASH *et al*, 1994). Uma outra função do açúcar é de proporcionar a cor dourada, característica da crosta dos pães, bem como de contribuir para o aroma e sabor do

produto final (EL-DASH *et al*, 1994). Um teor de açúcar em torno de 5% aumentará a fermentabilidade da levedura, enquanto que, para o teor de açúcar acima de 8% na formulação, a velocidade de fermentação diminuirá significativamente (DIAS *et al*, 2019).

2.1.1.6. Gordura

A gordura, tanto vegetal quanto animal, podem ser empregadas na panificação com o intuito de melhorar as propriedades de expansão da massa, ajudar a massa a reter melhor os gases, aumentar o volume do pão, contribuir para um miolo de textura mais suave, produzir uma crosta mais fina e macia, aumentar o tempo de conservação dos pães e aumentar o valor calórico do pão (EL-DASH *et al*, 1994). As gorduras vegetais, sólidas a temperatura ambiente, são as mais utilizadas, pois é de fácil manuseio, melhor conservação e conferem as melhores características em panificação (LIMA, 2007). Segundo Dias *et al* (2019) a ausência ou o excesso de gordura, como a utilização de 6% de gordura sobre o peso da farinha, influenciará aumentando a firmeza do pão, assim um teor de 2% de gordura é suficiente para a produção de um pão padrão.

2.2. Etapas do processo de produção do pão

O processo de fabricação de pão possui inúmeras formulações e matérias-primas disponíveis, contudo as etapas da produção possuem características em comum em sua maioria, as quais se dividem em quatro etapas essenciais, sendo elas a formação da massa, a fermentação, o forneamento e o resfriamento. Essas etapas permitem obter um produto segundo as características estabelecidas pela legislação – RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000, que aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão (BRASIL, 2000).

2.2.1. Formação da massa

A primeira etapa consiste na formação da massa, a qual tem como objetivo a mistura de todos os ingredientes da formulação até um ponto considerado ideal. O ponto ideal da massa passa por estágios até ser atingido, onde alterações visíveis ocorrem durante a mistura, pois a massa possui inicialmente um aspecto úmido e pegajoso e passa a apresentar um aspecto firme, liso e homogêneo. No estágio inicial da formação da massa há a absorção de água pela farinha, apresentando aparência sem uniformidade. À medida que se fornece energia à massa, através da mistura, há o estabelecimento de interações químicas entre as cadeias proteicas, desenvolvendo-se assim a rede de glúten, onde estas ligações vão se quebrando e se

restabelecendo continuamente, tornando a estrutura cada vez mais forte e elástica (BENASSI, 1997).

No ponto de desenvolvimento máximo da massa, observa-se que ela apresenta a capacidade de ser finamente esticada sem se romper, tal a viscosidade da rede de glúten formada, porém, se o fornecimento de energia contínua prosseguir as ligações que mantêm a rede proteica começaram a se quebrar e não mais retornarão, enfraquecendo o glúten e tornando a massa mole e pegajosa devido a liberação da água (BENASSI, 1997). Além do desenvolvimento do glúten na mistura, ocorre também a incorporação de ar na massa, na forma de bolhas pequenas e bem distribuídas, colaborando para a obtenção de uma boa granulometria do miolo no produto final e para os processos fermentativos (ARIMATEIA, 2015).

2.2.2. Fermentação

A fermentação é a etapa de descanso da massa, a qual engloba desde a incorporação do fermento biológico até a fase de expansão das bolhas de ar incorporadas, tendo como objetivos conferir volume e leveza, formação de dióxido de carbono (CO_2), maturação do glúten e a produção de compostos que conferem aroma e sabor característicos ao pão (CONSTANT e CRUZ, 2017; BENASSI, 1997). Os principais responsáveis pelas modificações que ocorrem nesta fase são as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, pois consomem os açúcares presentes na massa, através de seu sistema enzimático, transformando-os em dióxido de carbono e álcool etílico. Os açúcares são também metabolizados por bactérias lácticas e acéticas presentes na farinha, aumentando a acidez da massa, reduzindo seu pH de 6,2 para um pH próximo a 5,6 após um período de 4 horas e meia (DIAS *et al*, 2019; ARIMATEIA, 2015).

Diante das mudanças químicas e físicas advindas da fermentação observam-se consequências que ocorrem na massa, como perda de água por evaporação, a qual pode ser evitada mantendo-se a umidade relativa do ambiente próxima a 80%; Variação da consistência, pois a massa passa de pesada a borrachenta para uma consistência menos densa e mais extensível; Aumento de volume; e aumento da temperatura, principalmente quando o tempo de fermentação é longo (DIAS *et al*, 2019; BENASSI, 1997). A temperatura é um parâmetro que interfere no resultado da fermentação, pois se esta for muito alta, acima de 27°C , a produção de gás será muito rápida e assim a estrutura da massa não ficará suficientemente elástica para retê-lo, diminuindo o volume final, por sua vez, se a temperatura for muito baixa, abaixo de 27°C , o glúten se desenvolverá, porém, os outros produtos da fermentação, como os ácidos,

estarão em menores quantidades a massa terá que ser fermentada por muito tempo para se obter um maior volume (BENASSI, 1997).

2.2.3. Forneamento

A etapa definitiva para o processo de formação do pão é o forneamento ou assamento. A temperatura e a duração do forneamento são os parâmetros principais, além das condições de saturação de vapor do forno, e determiná-los corretamente depende principalmente do tipo de pão que está sendo produzido, além do peso e seu formato (DIAS *et al*, 2019; CONSTANT e CRUZ, 2017).

Segundo Dias *et al* (2019) as principais mudanças químicas que ocorrem pela ação do calor de forneamento são a gelatinização do amido, que ocorre quando a temperatura alcança aproximadamente 50°C e os grânulos de amido começam a absorver água e intumescer, assim o amido parcialmente gelatinizado fica incrustado no “esqueleto” proteico e, após o resfriamento, dará sustentação a essa estrutura; Desnaturação proteica, com o aquecimento da massa por volta de 70°C, a rede de glúten se desnatura ou coagula, formando uma estrutura rígida porosa; Ação e inativação enzimática, com o aquecimento, aumenta a ação enzimática, porém as enzimas se desnaturam e perdem sua atividade quando se atingem determinadas temperaturas e; Produção de cor e aroma, onde ocorre a reação de escurecimento não enzimático conhecida como reação de *Maillard*, que produz o aroma característico de pão assado e os compostos responsáveis pelo “flavor”, que se formam durante o assamento, na região da crosta, e depois penetram no miolo, ficando nele solubilizados.

Mudanças físicas também ocorrem durante o assamento dos pães e também são citadas por Dias *et al* (2019), sendo elas o aumento de volume da massa, o qual ocorre devido ao aumento da taxa de produção de CO₂, da diminuição de solubilidade da fase gasosa na massa e do aumento de volume de gases aquecidos, que modificam a pressão interna e fazem expandir a massa; Formação de crosta, que consiste na formação de um filme na superfície, semipermeável à saída de gases e que delimita a estrutura do produto e; Perda de peso, causada pela evaporação de água e de outras substâncias gasosas ou voláteis, como CO₂, álcool e ácidos orgânicos.

2.2.4. Resfriamento

No resfriamento do pão ocorre o fenômeno da retrogradação do amido, que contribui para a estabilidade da estrutura final do pão. No pão recém-assado e resfriado, as moléculas de amilose estão associadas e imobilizadas em um filme gel retrogradado, não podendo participar das modificações subsequente. É a vez então, das moléculas de amilopectina começarem a se associar pelo entrelaçamento de suas ramificações. Isto diminui a flexibilidade do gel e parece ser a causa do endurecimento do miolo à medida que o pão envelhece (BENASSI, 1997).

Há dois mecanismos distintos no resfriamento do pão, o primeiro é mediante a transmissão de calor, principalmente pela convecção para o ar circundante, mas também pela radiação e condução para uma estrutura do resfriador, ocorrendo assim o segundo por evaporação. A umidade se evapora a partir da casca, da qual a energia para evaporar é extraída (CAUVAIN e YOUNG, 2009).

2.3. Características de qualidade do pão

A característica do pão e de outros produtos fermentados depende muito da formação de uma rede de glúten na massa, não apenas para aprisionar o gás da fermentação, mas também para contribuir diretamente com a formação de uma estrutura celular do miolo, que, depois do assamento, confere textura e qualidades sensoriais que são diferentes em comparação a outros assados (CAUVAIN & YOUNG, 2009).

O pão com boas características de qualidade requer desempenho adequado em relação ao desenvolvimento da massa e aspecto do pão, o qual está diretamente envolvido com fatores como capacidade de retenção de gás, elasticidade, resistência da massa, capacidade de retenção de água, qualidade e quantidade dos ingredientes da massa e o emprego de tecnologia adequada (ARIMATEIA, 2015).

A legislação atual utilizada para determinar a qualidade produtos panificados é a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 90, de 18 de outubro de 2000, a qual aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão (BRASIL, 2000).

A qualidade do pão pode ser avaliada mediante as análises físicas, físico-químicas, macroscópicas, microscópicas, microbiológicas e sensoriais (FERREIRA *et al*, 2001). Pesquisas voltadas para a determinação da qualidade do pão concentram-se principalmente nos parâmetros físicos, como peso, volume e volume específico, perda de peso ao assar, cor e textura (FERREIRA *et al*, 2001; ESTELLER e LANNES, 2005; SOARES *et al*, 2008).

Outro método para avaliar a qualidade do pão é o sistema de pontuação global que foi empregado por EL-DASH, (1978) e depois por vários pesquisadores (SOARES et al, 2008; GUTKOSKI e NETO, 2002; FERREIRA *et al*, 2001). O valor obtido pelos atributos (volume, cor da crosta, quebra, simetria, pestana, estrutura das células do miolo, cor do miolo, textura do miolo, sabor e aroma na análise sensorial) é somado totalizando 100 pontos, que depois de somados fornecem a classificação do produto (GUTKOSKI e NETO, 2002; FERREIRA *et al*, 2001). No ramo de panificação, esta metodologia tem sido empregada para avaliar as características do pão servindo como parâmetro para a tomada de decisões corretivas em relação a defeitos apresentados no produto final (FERREIRA *et al*, 2001).

2.4. Glúten

O glúten é uma proteína insolúvel em água proveniente dos cereais da família *Poaceae*, subfamília *Festucoideae*, os quais são integrantes o trigo, a cevada, o centeio e a aveia. Essa proteína é composta por uma fração monomérica solúvel em álcool, denominada prolamina, e por uma fração polimérica insolúvel, chamada de glutelina, que é estabilizada por ligações dissulfeto (GOUVEIA, 2014). De acordo com o cereal de origem, a fração prolamínica recebe diferentes denominações, no caso do trigo é chamada de gliadina; na cevada, hordeína; no centeio, secalina; e na aveia, avenina (HABOUBI; TAYLOR; JONES, 2006).

As proteínas do trigo são normalmente divididas em proteínas de reserva (gliadina e glutenina), globulinas e albuminas (Tabela 2), sendo o único cereal que contém a quantidade e qualidade necessária de proteínas para formação de glúten na produção de massas com qualidade tecnológica e sensorial satisfatória (Tabela 3), representando aproximadamente 80-85% do total de proteínas (GOUVEIA, 2014; LACERDA, 2008).

Tabela 2- Características das proteínas do trigo.

Proteínas	Gliadina	Glutenina	Globulinas	Albuminas
Proporção (p/p)%	68	32	13	7
Solubilidade	Álcool 70%	Ácidos e bases diluídas	Solução salina	Água
Massas Molares (kDa)	15 - 60	60 - 10000	< 25	< 25

Fonte: LACERDA, 2008.

Tabela 3- Percentual de proteína total em diferentes cereais.

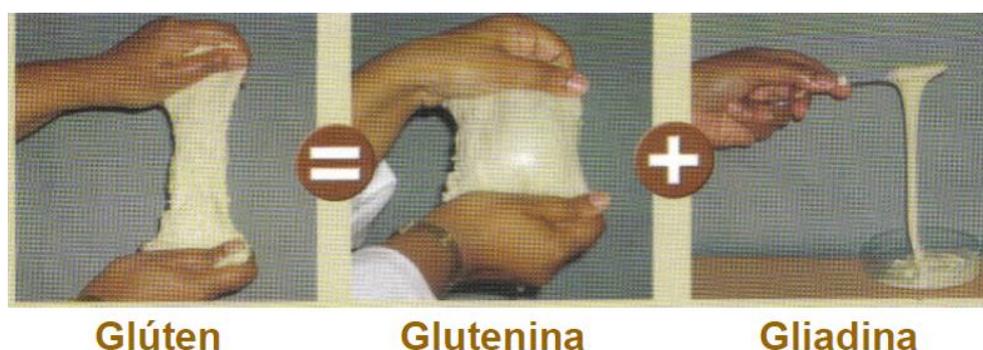
Cereal	Proteína total (%)	Albumina (%)	Globulina (%)	Prolamina (%)	Glutelina (%)
Trigo	10-15	3-5	6-10	40-50	30-40
Aveia	8-14	1	80	10-15	5
Centeio	9-14	5-10	5-10	30-50	30-35
Cevada	10-16	3-4	10-20	35-45	35-45
Arroz	8-10	-	2-8	1-5	85-95
Milho	7-13	-	5-6	50-55	30-45

Fonte: CONSTANT e CRUZ, 2017.

As gliadinas, que pertencem ao grupo das prolaminas, apresentam baixo teor de aminoácidos carregados, formando somente ligações intermoleculares dissulfeto e podem ser classificadas em ordem crescente de massa molecular como α , β , γ , ω -gliadinas (DIAS *et al*, 2019). Já as gluteninas, que pertencem ao grupo das glutelinas, são agregadas de proteínas ligadas por ligações intermoleculares dissulfeto devido à presença de cisteína nas subunidades. As mesmas podem, então, ser classificadas como proteínas de baixa massa molecular (BMM) e alta massa molecular (AMM) (LACERDA, 2008).

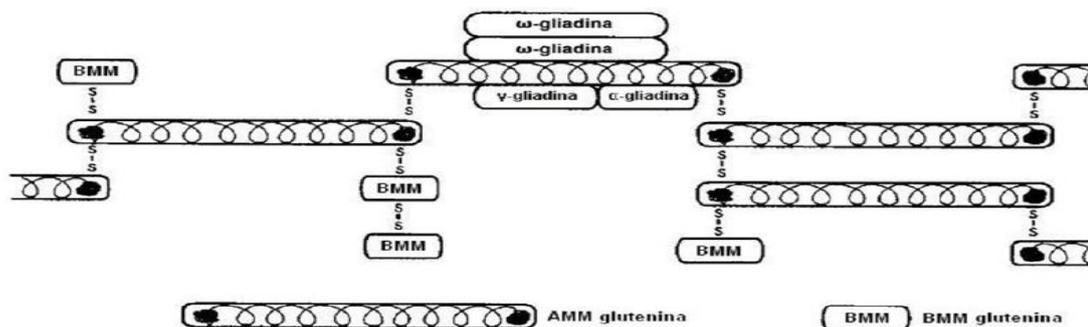
A propriedade viscoelástica do glúten hidratado é caracterizada a partir da ação plastificante da gliadina, promovendo extensibilidade, e da glutenina, propiciando resistência à ruptura da massa, devido sua alta elasticidade (Figura 1) (SCHEUER *et al*, 2011). As frações proteicas por ação mecânica perdem a sua estrutura quaternária permitindo estabelecer novas ligações entre si e formar uma espécie de rede, ou seja, o glúten (Figura 2) (LACERDA, 2008).

Figura 1- Rede proteica viscoelástica típica do glúten.



Fonte: Lacerda, 2008.

Figura 2- Estrutura da rede proteica do glúten.



Fonte: Lacerda, 2008.

O glúten é fundamental na elaboração de produtos panificáveis levedados, pois esta rede proteica é responsável pela retenção de dióxido de carbono produzido durante o processo de fermentação, e de forneamento nas massas, contudo as gliadinas são as responsáveis pela toxicidade do glúten no organismo de pessoas com doença celíaca (SILVA, 2014; NASCIMENTO, 2014) Moléculas não digeridas de gliadina, como peptídeos da fração α -gliadina composta por 33 aminoácidos, são resistentes à degradação gástrica, pancreática, e das proteases na borda da escova intestinal humana e assim permanecem no lúmen intestinal após a ingestão do glúten. Quando ocorrem episódios de infecção intestinal ou outros fatores que levam ao aumento da permeabilidade intestinal, estes peptídeos passam através da barreira epitelial do intestino e interagem com antígenos presentes na lâmina própria (NASCIMENTO, 2014).

O único tratamento disponível para a doença celíaca consiste na exclusão total do glúten da dieta (GOVEIA, 2014). Isso fará com que haja remissão dos sintomas, normalização dos parâmetros sorológicos e da histologia intestinal, melhorando a saúde e a qualidade de vida da maioria das pessoas afetadas pela doença. Contudo, a remoção total dos alimentos que contêm glúten da dieta pode ser bastante difícil devido ao consumo de glúten sem conhecimento, como no caso de contaminações do alimento ou problemas relacionados à rotulagem, do elevado custo dos produtos, da restrita disponibilidade de opções sem glúten, da baixa palatabilidade dos alimentos, e também em razão das representações sociais e culturais em torno dos alimentos (GOVEIA, 2014; NASCIMENTO, 2014).

2.5. Panificação isenta de glúten

A formulação de produtos isentos de glúten apresenta um grande desafio aos profissionais da área de alimentos, uma vez que o glúten é o principal elemento para a obtenção

de produtos panificados com a estrutura, paladar, aceitabilidade e vida de prateleira desejável (FRANCO, 2015). A dificuldade de se conseguir um pão sem glúten com características apropriadas à panificação está relacionada com as frações de glutenina e gliadina no trigo em quantidades apreciáveis, onde a glutenina confere à massa carácter elástico, força, firmeza e a gliadina responsável pela extensibilidade e coesividade (LACERDA,2008).

De acordo com o *Codex Alimentarius*, da Organização Mundial de Saúde (OMS), em conjunto com a *Food And Agriculture Organization Of The United Nations* (FAO), os alimentos livres de glúten são aqueles produzidos a partir de ingredientes que não contêm trigo, cevada, centeio, aveia ou qualquer espécie de cereal *Triticum* e suas variedades cruzadas e que não excedam 20 mg/Kg de glúten no alimento conforme comercializado ou distribuído ao consumidor. Também são considerados livres de glúten aqueles alimentos que contêm esses ingredientes, mas que tiveram seu conteúdo de glúten reduzido por processamento de forma a não ultrapassar 20 mg/Kg de glúten no alimento conforme comercializado ou distribuído ao consumidor (CODEX, 2006; CODEX, 2008).

No Brasil, em função da necessidade de restrição do glúten na dieta dos celíacos, em 2003 foi aprovada a Lei Federal 10.674 que determina que todos os alimentos industrializados devem conter em seu rótulo, obrigatoriamente, as inscrições "contém Glúten" ou "não contém Glúten"). Essa lei determina, ainda, que a advertência deve ser impressa nos rótulos e embalagens dos produtos respectivos assim como em cartazes e materiais de divulgação em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura (BRASIL, 2003).

A remoção do glúten de produtos de panificação prejudica a capacidade da massa de se desenvolver apropriadamente durante o amassamento, fermentação e panificação. Desta forma, frequentemente pães elaborados apenas com farinhas sem glúten apresentam massa líquida na etapa que antecede o cozimento; e quando assados, apresentam volume inferior àqueles produzidos com trigo, problemas de textura e de cor, além de outros defeitos de qualidade, convergindo para baixa palatabilidade e aceitação sensorial (NASCIMENTO, 2014).

Pesquisas voltadas para o desenvolvimento de produtos sem glúten concentram-se principalmente na elaboração de pães (CLERICI; AIROLDI; EL-DASH, 2009; MEZAIZE et al., 2009; ONYANGO et al., 2009; STORCK C. R., 2009; ZANDONADI; BOTELHO; ARAÚJO, 2009; ALVAREZ-JUBETE et al., 2010a; DEMIRKESEN et al., 2010; ONYANGO et al., 2010; SCIARINI et al., 2010b; TORBICA; HADNAĐEV; DAPČEVIĆ, 2010; PERESSINI; PIN; SENSIDONI, 2011; SAKAČ et al., 2011; ZANNINI et al. , 2012; HERA; MARTINEZ; GÓMEZ, 2013; MARIOTTI; PAGANI; LUCISANO, 2013; MARTÍNEZ; MARCOS; GÓMEZ, 2013; STORCK et al., 2013; NASCIMENTO, 2014; PONGJARUVAT

et al., 2014; SANTOS, 2014; SILVA, 2014; FRANCO, 2015; ZIOBRO, et al.2016; CARLI et al, 2017; GRAÇA et al., 2017). Em todos os casos, as matérias-primas utilizadas com maior frequência são farinhas de arroz e de milho.

De acordo com Franco (2015), farinha de arroz, amido e farinha de milho, fubá, farinha de mandioca, polvilho e fécula de batata são alguns dos principais substitutos utilizados na dieta de um celíaco por não possuírem glúten em sua composição. De modo que, para melhorar suas qualidades tecnológicas, são utilizados alguns ingredientes, como amido, hidrocoloides, outras fontes de proteínas e enzimas.

2.5.1. Matérias-primas para panificação isenta de glúten

As farinhas utilizadas na panificação são, normalmente, as farinhas de trigo, centeio, triticale ou mesmo aveia, onde a aveia, devido aos procedimentos de plantação e reprodução, na literatura é considerada não isenta de glúten. Contudo, todas essas farinhas são proibidas na produção de pão sem glúten, apenas farinhas como de arroz, milho, milho painço, amaranto, trigo sarraceno (sem glúten), quinoa, mandioca, castanha, soja, coco, polvilho, fécula de batata e entre outras, podem ser utilizadas como matérias-primas na panificação isenta de glúten (SILVA, 2014).

2.5.1.1. Farinha de arroz

A farinha de arroz é utilizada como fonte de amido base na preparação de pães sem glúten devido ao baixo nível de prolamina, e além disso, o arroz possui características nutricionais favoráveis, como baixo teor de sódio, baixo teor de gordura e alta quantidade de hidratos de carbono facilmente digeríveis (SILVA, 2014). Na Tabela 4 observa-se a composição centesimal em base seca da farinha de arroz crua. O grão de arroz possui um dos teores proteicos mais baixos do grupo dos cereais, apesar de sua proteína, a glutelina, ser a de melhor qualidade (KOHMANN, 2010).

Tabela 4- Composição centesimal em base seca de farinha de arroz crua.

	Composição centesimal
Proteína	8,24
Gordura	0,46
Cinzas	0,42
Carboidratos	90,72
Fibras	0,17

Fonte: KOHMANN, 2010.

Diversos estudos relataram que o uso de farinha de arroz para fazer pães sem glúten deu origem a pães de boa qualidade, os quais se basearam principalmente na textura e características sensoriais. Dentre eles está o estudo que desenvolveu um pão branco e integral livre de glúten e fortificados com cálcio e ferro e concluiu que o pão branco sem glúten fortificado obteve aprovação suficiente nos testes sensoriais, no entanto, o integral sem glúten teria que melhorar nos atributos aparência do miolo e aroma (KOHMANN, 2010). Outro estudo desenvolveu mixes para a fabricação de pães isentos de glúten a partir de farinha de trinca e farelo de arroz e este produto obteve melhor estrutura interna quando adicionado ovo em pó (SILVA, 2014).

No entanto, pelo fato de o arroz conter menor quantidade de prolamina e ser isento de glúten surge muitas vezes a necessidade de recorrer a outros aditivos, hidrocoloides, emulsionantes, produtos lácteos ou proteínas que melhorem as suas propriedades tecnológicas e as características viscoelásticas das massas produzidas com farinha de arroz.

Estudos reforçam esta busca, dentre eles é possível citar o desenvolvimento de um pão sem glúten com farinha de arroz e de batata-doce, o qual obteve melhores resultados com a adição de em hidrocoloide - carboximetilcelulose (CMC) – e um índice de aceitabilidade de 80,3% com o pão produzido com 25% de farinha de batata-doce e 75% de farinha de arroz (FRANCO, 2015). Já em outro trabalho realizou-se a adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz, onde obteve-se com a adição de 4% de colágeno em fibra características tecnológicas próximas ao esperado e um índice de aceitação superior a 75% pelos avaliadores (GRAÇA *et al*, 2017).

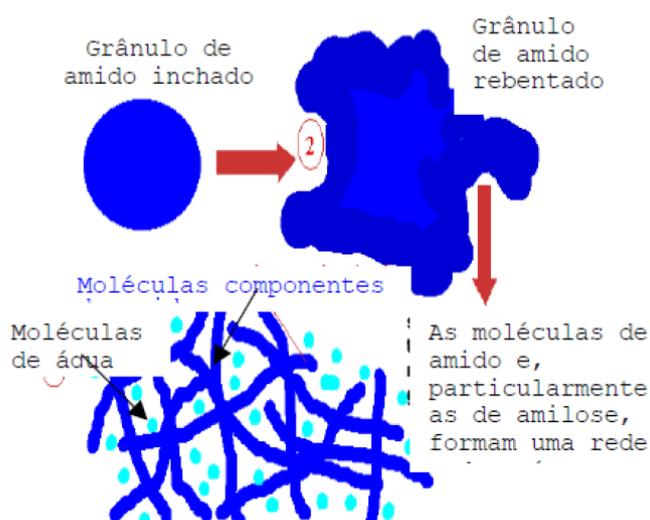
Pico *et al.* (2019) sugeriram o uso de uma variedade de farinhas sem glúten em vez de apenas uma farinha para alcançar pães sem glúten com boas propriedades sensoriais e texturais. Além disso, eles relataram que a adição de uma certa porcentagem de amido melhorou a qualidade geral do pão sem glúten. Assim, misturas de farinhas sem glúten e amidos têm sido comumente utilizadas, geralmente amido de milho e farinhas de arroz.

2.5.1.2. Amidos

O amido é o mais abundante carboidrato de reserva das plantas superiores, presentes nos tecidos sob forma de grânulos intracelulares. Pela legislação brasileira (BRASIL, 1978), esses polissacarídeos de reserva dos vegetais são designados amido ou fécula, se provenientes de partes aéreas ou subterrâneas das plantas, respectivamente. As cinco principais espécies consideradas fonte de amido comercial são o milho, trigo, arroz, batata e mandioca (LEONEL, 2005).

O amido é constituído de dois polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, e possui capacidade limitada de absorver água fria, no entanto, com o calor ocorre a quebra de ligações das pontes de hidrogénio entre as cadeias de amilose e amilopectina, consequentemente os grânulos tornam-se mais disponíveis para estabelecer ligações com a água, promovendo assim a intumescência dos grãos e formação de uma estrutura viscosa. Este processo denomina-se gelatinização e é dependente das características do amido, mais diretamente das respectivas temperaturas de gelatinização que se relacionam com o teor de amilose. O processo de gelatinização prossegue até que haja a ruptura dos grânulos por completo e a amilose seja extraída para o exterior formando uma pasta (Figura 3) (SILVA, 2014).

Figura 3- Processo de gelatinização do amido.



Fonte: SILVA, 2014.

Na panificação é muito importante compreender o comportamento do amido, pois quando a farinha é moída, inevitavelmente uma proporção significativa de grânulos de amido é fisicamente danificada, rachada ou quebrada. Quando a massa é primeiramente misturada, esses grânulos de amido absorvem água. Durante a produção do pão, nos estágios de mistura e fermentação anteriores ao forneamento, as α e β -amilases que estão presentes naturalmente na farinha transformam uma pequena proporção do amido em maltose e outros açúcares, estes são fermentados pelas leveduras que produzem gás carbônico na massa. Uma vez no forno os grânulos de amido gelatinizam (FRANCO, 2015).

Após gelatinização do amido, durante o resfriamento, inicia-se um processo onde as moléculas de amilose auto associam-se, e formam um gel. Esse processo é denominado retrogradação do amido, que resulta num aumento da consistência final e, no caso da

panificação é também responsável pelo endurecimento de todos os produtos à base de amido (COULTATE, 2002; SILVA, 2014).

A gelatinização do amido na presença de diferentes hidrocoloides influencia a viscosidade da pasta de amido quente. Este comportamento tem sido explicado em termos da formação de complexos entre os polímeros de amido (amilose e amilopectina) e os hidrocoloides durante a gelatinização e a adição dos hidrocoloides tem demonstrado que estes afetam o comportamento reológico da massa e o endurecimento do pão (FRANCO, 2015).

2.5.1.3. Féculas

A fécula é um ingrediente largamente utilizado na produção de panificados sem glúten. Esta pode ser originária da batata, da araruta ou da mandioca (KOHMANN, 2010). Segundo a Resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde – CNNPA/MS (BRASIL, 1978), polvilho ou fécula de mandioca é o produto extraído da mandioca. Por meio de normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas, o polvilho é classificado em doce e azedo, tendo por base apenas o teor de acidez. Para o produto fermentado, a acidez deve ser, no máximo, de 5mL de NaOH 1N/100g e para o não-fermentado de 1mL de NaOH 1N/100g. Para outras características, os valores são idênticos: umidade máxima de 14%p/p, teor mínimo de amido de 80%p/p e resíduo mineral fixo máximo de 0,5%p/p, conforme Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA, 2000).

Apesar de serem provenientes da mesma matéria-prima, o polvilho doce e o azedo apresentam características diferentes, por exemplo, o polvilho azedo apresenta maior capacidade de expansão comparado com o doce, porém possui menor capacidade de geleificação e menor estabilidade à agitação (KOHMANN, 2010).

2.5.1.4. Hidrocoloides

Os hidrocoloides, são polissacarídeos considerados essenciais na elaboração de produtos de panificação sem glúten, pois possuem a capacidade de imitar, até certo ponto, a propriedade viscoelástica do glúten (NASCIMENTO, 2014). Suas aplicações na indústria alimentar estão associadas à sua capacidade hidrofílica, ou seja, interação significativamente com a água que se encontra livre no meio onde se aplicam, reduzindo a sua mobilidade e aumentando assim a viscosidade das soluções (FRANCO, 2015). Além disso, os hidrocoloides têm sido utilizados devido à sua solubilidade em água, o que permite a sua aplicação como agente espessante, gelificante e estabilizante, outro fato é sua alta capacidade de retenção de

água que confere estabilidade aos produtos por redução da sua atividade de água (SILVA, 2014).

Estas substâncias podem ser classificadas de acordo com a sua origem. Entre os de origem vegetal estão: (a) aqueles provenientes de algas marinhas, como a goma agar-agar, carragena e alginato; (b) os extraídos de plantas, como pectina e β -glucanas; (c) as gomas exsudadas de plantas, como a goma arábica; (d) as mucilagens de sementes, como a goma alfarroba, goma guar e psyllium. Existem também os hidrocoloides produzidos a partir da síntese química ou bioquímica da celulose, tais como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose (CMC) e a metilcelulose (MC); e também os oriundos da biossíntese microbiana, como é o caso da goma xantana (NASCIMENTO, 2014). Apesar da grande variedade, na literatura identifica-se que os hidrocoloides utilizados mais frequentemente em experimentos realizados com produtos sem glúten são a goma xantana, HPMC e CMC (NASCIMENTO, 2014).

A xantana, conhecida como goma xantana, é um heteropolissacarídeo de alto peso molecular e um biopolímero produzido por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, que utilizam como fontes de carbono preferencialmente a glicose ou sacarose. É um hidrocolóide não gelificante, que forma soluções pseudoplásticas de alta viscosidade e não é afetada por mudanças na temperatura, pH ou concentração de sal, sendo, portanto, um dos hidrocolóides mais utilizados na indústria de alimentos (NASCIMENTO, 2014).

A Resolução RDC n° 45 de 03 de novembro de 2010 aprovou o Regulamento Técnico sobre aditivos alimentares autorizados segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), no qual a goma xantana e guar estão inseridas (BRASIL, 2010). A Resolução n.º 383 de 09 de agosto de 1999 aprovou o Regulamento Técnico sobre o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 7 – produtos de panificação e biscoitos, sendo que nela os espessantes utilizados para pães com fermento biológico estabelece como limite máximo quantun satis (BRASIL, 1999). De acordo com Silva (2014), estes hidrocoloides podem ser aplicados em concentrações baixas, que geralmente variam de 0,5 % a 5 % e por norma não interferem no aroma, paladar ou valor nutritivo do produto, desempenhando um papel importante no controle da textura de muitos alimentos processados.

Na preparação da massa de pão isenta de glúten, os hidrocoloides são muitas vezes utilizados para aumentar a estabilidade das bolhas de gás com o aumento da viscosidade e também interagir nas propriedades de gelatinização/retrogradação do amido. A influência do hidrocolóide sobre a reologia da massa de pão e qualidade do pão, mais concretamente, na

textura do miolo e volume final, depende das opções específicas do hidrocoloide (massa e estrutura molecular, comprimento da cadeia, concentração e modificações químicas), das farinhas e outros ingredientes da receita, e dos parâmetros do processo utilizados (pH, temperatura, ligações iônicas e presença de íons) (SILVA, 2014).

2.5.1.5. Proteínas

As proteínas são essenciais para manter a massa e a força muscular, especialmente nos idosos, mas também para promover o crescimento saudável em crianças, para obter uma quantidade ideal e manter a saúde óssea em todas as fases da vida, e para melhorar a resposta adaptativa ao treinamento de atletas e indivíduos que praticam atividade física (GARCÍA-SEGOVA, IGUAL and MARTÍNEZ-MONZÓ, 2020).

As fontes de proteínas têm sido investigadas para melhorar a qualidade e o desenvolvimento de um pão sem glúten, uma vez que as proteínas são necessárias para as reações de Maillard, que são responsáveis pela cor da crosta e geração de compostos voláteis, podem melhorar a estrutura e capacidade de retenção de gás das massas, além de simultaneamente beneficiar a qualidade nutricional dos produtos (PICO et al., 2019). Proteínas de diversas fontes podem ser utilizadas, entre elas, as proteínas do leite, albumina dos ovos, proteína de soja, colágeno além de outras proteínas de fontes animais e vegetais (NASCIMENTO, 2014; FRANCO, 2015).

Na indústria de alimentos, as proteínas de fontes vegetais, provenientes do milho e ervilha por exemplo, são utilizadas como uma "fonte de proteína" ou alegação de "rico em proteína" principalmente em produtos lácteos ou voltados para atletas e idosos, como também em produtos de confeitaria e panificação. Além disso, a fortificação do pão com a proteína permite uma alegação de "rico em proteína" sem aumentar o nível glúten, podendo, porém, afetar a textura, consistência e elasticidade da massa (GARCÍA-SEGOVA, IGUAL AND MARTÍNEZ-MONZÓ, 2020).

No Brasil, os termos de alegação utilizados em produtos que contenham a proteína e as condições para a declaração da informação nutricional complementar para as proteínas e outros nutrientes (Tabela 5) são autorizados segundo Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, a qual dispõe sobre o regulamento técnico sobre informação nutricional complementar (BRASIL, 2012).

Tabela 5- Condições para a declaração da informação nutricional complementar das proteínas (conteúdo absoluto).

Proteínas		
Atributo	Condições	
Fonte	Mínimo de 6 g de proteína; e	Por 100 g ou 100 ml em pratos preparados conforme o caso. Por porção.
	As quantidades de aminoácidos essenciais do alimento atendem às condições estabelecidas na Tabela 8.	
Alto conteúdo	Mínimo de 12 g de proteínas; e	Por 100 g ou 100 ml em pratos preparados conforme o caso. Por porção.
	As quantidades de aminoácidos essenciais do alimento atendem às condições estabelecidas na Tabela 8.	

Fonte: RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012 (BRASIL,2012).

Neste contexto, a utilização de matérias-primas ricas em proteínas, como é o caso dos cereais como o milho e de proteínas hidrolisadas como o colágeno oferecem um método viável para aumentar a ingestão de proteína na dieta, promovem a inovação no setor de pães, produtos de confeitaria e podem melhorar características físicas, sensoriais e nutracêuticas, como também projetar novos alimentos ricos em proteínas e fibras (MENEZES *et al*, 2014; NASCIMENTO, 2014).

2.5.1.6. Colágeno Hidrolisado

O colágeno hidrolisado é uma proteína natural derivada do colágeno nativo, encontrado na pele e ossos de bovinos, suínos, aves e peixes (DENIS *et al*. 2008). A sua diferença entre o colágeno nativo e a gelatina consiste na sua solubilidade em água e solução salina, sendo constituído de elevado teor proteico (84 a 90%) e não possui poder de geleificação, devido as baixas massas moleculares. (DAMODARAN *et al*. 2010).

Para fins de produção industrial, o colágeno nativo é submetido ao tratamento químico para a remoção de gordura e para a eliminação do cálcio. A partir dele podem ser obtidos: fibra de colágeno, colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e colágeno hidrolisado. Para a obtenção do colágeno hidrolisado solúvel em água (sem poder de gelificação), o mesmo passa por uma hidrólise química e enzimática sob condições controladas (50 a 60°C) (FERREIRA, ROBERTO E CAMISA, 2018).

O colágeno hidrolisado não contém carboidratos e não confere sabor amargo ao produto final, podendo ser adicionado como matéria-prima em produtos que oferecem benefícios complementares para a saúde e ser utilizado no desenvolvimento de novos produtos. O uso

deste tipo de colágeno é indicado em produtos de panificação devido a elevada capacidade de retenção de água e alto teor proteico (MENEZES *et al*, 2014).

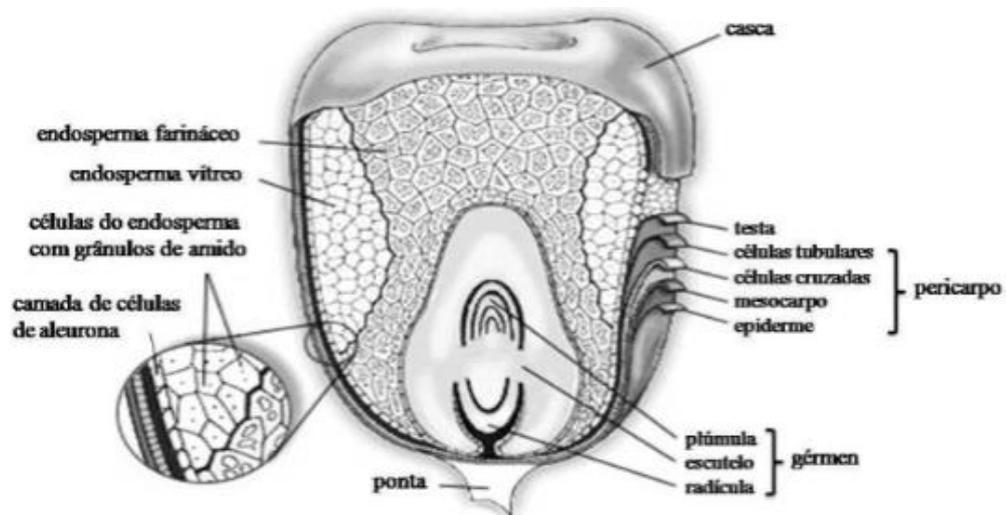
Alguns estudos já foram realizados para analisar os efeitos da ingestão do colágeno hidrolisado. Menezes *et al* (2014) estudou a adição de colágeno hidrolisado na qualidade da farinha de trigo para a produção de pães tipo forma e constatou que é uma alternativa para o enriquecimento do produto, elevando o teor de proteína, sem prejudicar, significativamente, as propriedades reológicas da farinha e aspectos da qualidade dos pães.

É possível citar também o estudo realizado por Graça *et al* (2017) onde foi avaliado o efeito da adição de colágeno em pó e em fibra nas características estruturais, tecnológicas e sensoriais de pães sem glúten, elaborados com farinha de arroz e seus resultados foram que o pão da formulação com 4% de colágeno em fibra apresentou as características tecnológicas mais próximas ao esperado, não diferindo significativamente quanto à composição química, do pão padrão e que por meio da análise sensorial, constatou-se que os pães sem glúten (padrão e com 4% de colágeno em fibra) obtiveram aceitação sensorial superior a 75%.

2.5.1.7. Zeína

O grão de milho é formado por quatro estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta, estas estruturas diferem em composição química e na disposição interna do grão (Figura 4).

Figura 4- Anatomia do grão de milho e suas partes.



Fonte: PAPALIA e LONDERO (2015).

O endosperma representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, consiste principalmente de grânulos de amido, em média 88%, classificado em dois tipos: farináceo e vítreo, e concentração de proteínas de reserva, como a zeína. No endosperma vítreo do grão de milho, encontra-se a maior concentração de zeína, em comparação com o endosperma farináceo (PAPALIA & LONDERO, 2015).

Zeína é o nome específico de uma das proteínas derivadas do endosperma dos grãos de milho, classificada do grupo das prolaminas, caracterizadas pelo alto teor de aminoácidos apolares, conferindo estrutura molecular hidrofóbica e solúvel em álcool, e representando cerca de 60% das proteínas totais do milho (PAPALIA & LONDERO, 2015; SHUKLA & CHERYAN, 2001).

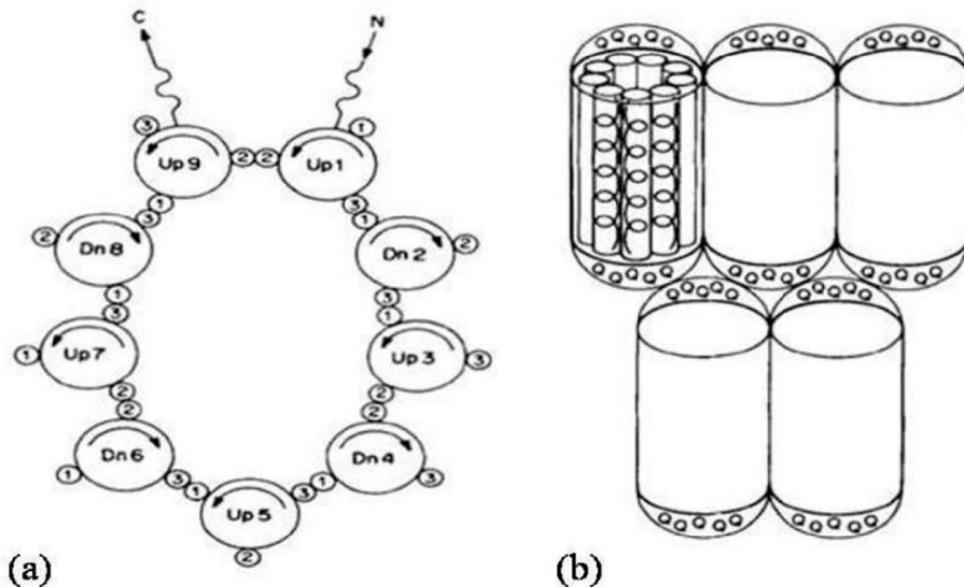
De acordo com Papalia & Londero (2015), a zeína pode ser dividida em quatro subclasses: α -zeínas – rica em aminoácidos hidrofóbicos (alanine, leucina e prolina) e solúveis em soluções alcoólicas; β -zeína – rica em aminoácidos sulfurados e solúveis em álcool hidratado após uso de agentes redutores, γ -zeína – constituída de resíduos de prolina e, para solubilização dessa proteína, tanto em álcool 70% como em água, é necessário o uso de agentes redutores para rompimento das ligações dissulfeto; e por fim δ -zeína – cuja composição é de aminoácidos sulfurados, além de prolina e leucina, o qual assim como as zeínas β , γ , são extraídas somente com redução das ligações de dissulfeto, sendo usado tradicionalmente o beta mercaptoetanol.

O beta-mercaptoetanol é um agente redutor que promove a redução das pontes de enxofre, formadas pelos grupamentos sulfidrila de cisteínas, presentes na enzima, promovendo sua inibição (SANT'ANA, 2012). De acordo com a diretiva Europeia 67/548/CEE e emendas, o beta-mercaptoetanol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão além de ser irritante para a pele. Deste modo, o uso do beta-mercaptoetanol é inadequado para qualquer tipo de extração para fins alimentícios e deve ser substituído por um outro agente redutor não tóxico, como o ácido ascórbico.

O ácido ascórbico puro é sólido, branco, cristalino e muito solúvel em água. A propriedade química do ascorbato é a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons), antioxidante e como agente sequestrador em determinados alimentos. A atuação do ácido ascórbico como agente redutor, além de este ser totalmente seguro para consumo humano, barato e bem aceito pelos consumidores, pode otimizar da extração da zeína de milho e não causar danos à saúde humana (SANT'ANA, 2012).

Esse grupo de proteínas foi isolado pela primeira vez por Gorham (1821) em milho integral usando solução aquosa de etanol e a primeira patente para o método comercial de extração de zeína foi concedida a Osborne (1891). Argos et al., (1982) propôs um modelo estrutural da zeína em formato de hélice coloidal (união dos aminoácidos polares e apolares), referente à estrutura secundária da proteína zeína (Figura 5).

Figura 5- Modelo de estrutura secundária da proteína zeína.



Fonte: PAPALIA e LONDERO (2015).

A estrutura da zeína, portanto é formada por aminoácidos apolares organizados em uma estrutura circular, unidos através de três segmentos polares, repetidas em nove hélices sequenciais (Up) e antiparalelas (Dn) em superfície plana molecular (Figura 5a), formando um empilhamento dessas hélices por interações de resíduos de glutamina, parte polar nas extremidades da cadeia (Figura 5b) (PAPALIA & LONDERO, 2015).

As zeínas são consideradas de alto grau de polimerização e propriedades isolantes, destacando-se sua aplicação na elaboração de filmes para conservação de alimentos altamente perecíveis e microcápsulas na indústria farmacêutica (PAPALIA & LONDERO, 2015). Recentemente estas proteínas têm sido avaliadas adequadas para a produção de pão isento de glúten, por exemplo, segundo Smith *et al* (2017) o uso da zeína na área de panificação tem focado principalmente em propriedades físico-químicas das misturas zeína e zeína-amido, bem como desenvolvimento de produtos e otimização de pães utilizando misturas zeína-amido.

Berta *et al* (2019) cita que a zeína quando aquecida acima de sua temperatura de transição vítrea (40°C) forma fibrilas elásticas dentro da matriz de amido, conferindo propriedades viscoelásticas à massa sem glúten. Sosa, Califano e Lorenzo (2019) também citam que na mistura de massas contendo zeína e amido, a zeína é conhecido por formar β folhas, que acreditasse contribuir substancialmente para o comportamento elástico do glúten na massa de trigo. No entanto, no desenvolvimento de produtos sem glúten, eles descobriram que misturas puras de zeína e amido apresentavam textura indesejável de pães sem glúten. Por outro lado, quando zeína foi usado em combinação com hidrocoloides, serviu como um potencial estrutural do miolo que mostrou seu potencial como fonte de proteínas de cereais na produção de alimentos sem glúten.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver pães isentos de glúten elaborados com farinha de arroz, com a adição de zeína e colágeno hidrolisado, e avaliar o efeito dessas proteínas sobre os pães a partir das suas características físicas.

3.2. Específicos

- Isolar a proteína do milho, zeína, por meio do método modificado por Sant'ana (2012) utilizando o ácido ascórbico como agente redutor;
- Desenvolver um pão sem glúten e verificar a influência da adição da zeína isolada;
- Desenvolver um pão sem glúten e verificar a influência da adição do colágeno hidrolisado;
- Avaliar as características físicas dos pães sem glúten a partir do volume específico, firmeza, cor e perda peso após forneamento;
- Avaliar os pães sem glúten a partir da microscopia digital.

4. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Cereais e Massas, Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Vegetal (LPPOV), Laboratório de Análise de Alimentos (LAA) e no Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas (LAF) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), todos situados na Universidade Federal de Sergipe, Campus de São Cristóvão – SE.

4.1. Matéria-prima

As matérias-primas para o isolamento da proteína do milho (farinha de milho flocada) e para as elaborações dos pães (farinha de arroz, sal, açúcar cristal, óleo de girassol, fermento biológico seco e goma xantana) foram adquiridos em estabelecimentos localizados em Aracaju-SE. O carbonato de cálcio e o colágeno hidrolisado foram adquiridos em farmácias locais.

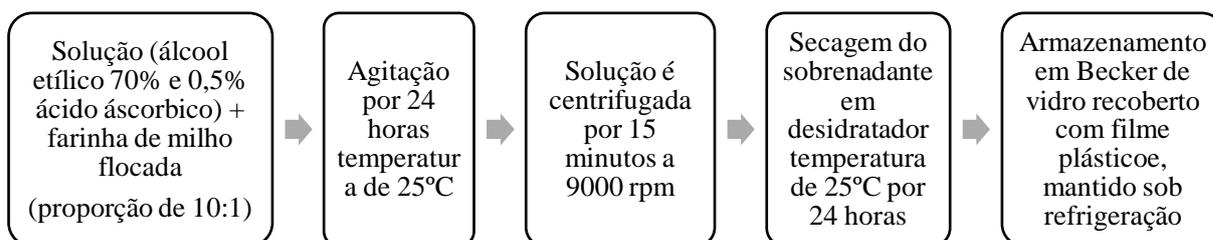
4.2. Extração da proteína do milho

A extração química da proteína do milho, zeína, foi conduzida segundo o método modificado realizado por Sant'ana (2012), o qual utiliza ácido ascórbico como agente redutor não tóxico.

4.2.1. Método de extração da proteína do milho

Para extração da zeína, uma solução de álcool etílico 70% contendo 0,5% ácido ascórbico foi adicionada a amostra (farinha de milho flocada), numa proporção de 10:1 (volume/peso), sob agitação por 24 horas à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 6). Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 9000 rpm (SANT'ANA, 2012). O sobrenadante foi submetido a secagem em desidratador com ar forçado a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, posteriormente armazenado em Becker de vidro recoberto com filme plástico, para sua vedação, e mantido sob refrigeração (Figura 6).

Figura 6- Método de extração da zeína.



Fonte: Próprio autor.

4.2.2. Rendimento da extração da proteína do milho

Após a secagem, a proteína obtida foi pesada em balança analítica para que assim fosse possível calcular seu rendimento final, ou seja quanto de proteínas totais do milho foram obtidas a partir da matéria-prima, farinha de milho flocada, utilizada para sua extração. O cálculo de rendimento utilizado está demonstrado na Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\text{massa obtida (g)}}{\text{massa da matéria-prima (g)}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.3. Formulação dos pães sem glúten

As formulações foram desenvolvidas em conformidade com a área de panificação, em que a soma das farinhas deve ser equivalente a 100% e os demais ingredientes são calculados com base na quantidade de farinha, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6- Formulações de pães sem glúten elaborados com farinha de arroz.

Ingredientes	Quantidade (%)	Quantidade (g)
Farinha de arroz	100	400
Água	100	400
Óleo de girassol	6	24
Açúcar	5	20
Sal	2	8
Fermento biológico seco	2	8
Goma xantana	2	8
Carbonato de cálcio	*	*
Zeína	**	**
Colágeno hidrolisado	**	**

* A quantidade de carbonato de cálcio (10g) é utilizada apenas para os tratamentos que continham zeína.

**As quantidades de zeína e colágeno hidrolisado variaram conforme o delineamento experimental.

4.4. Delineamento Experimental

O delineamento fatorial 2^2 inteiramente casualizado sem blocagem foi utilizado para avaliar o efeito de duas variáveis independentes na composição dos pães processados com farinha de arroz avaliados em dois níveis (-1 e 1) conforme valores indicados na Tabela 7, sendo as variáveis a zeína isolada com o nível de dosagem variando de 0 a 8% e o colágeno hidrolisado variando de 0 a 4%, totalizando 4 tratamentos com 3 repetições cada. As variáveis dependentes do planejamento foram as características físicas dos pães, como perda de peso ao assar, volume específico, cor e firmeza. A Tabela 8 contém a matriz do planejamento utilizado para o estudo.

Tabela 7- Níveis codificados e decodificados das variáveis colágeno hidrolisado e zeína.

Variáveis independentes	Níveis	
	-1	1
Colágeno hidrolisado (%)	0	4
Zeína (%)	0	8

Fonte: Próprio autor.

Tabela 8- Matriz do delineamento fatorial 2² inteiramente casualizado sem blocagem para elaboração dos pães sem glúten com farinha de arroz, colágeno hidrolisado e zeína.

Tratamento	Colágeno hidrolisado (%)	Zeína (%)
Controle	0 (-1)	0 (-1)
Colágeno	4 (1)	0 (-1)
Zeína	0 (-1)	8 (1)
Colágeno e Zeína	4 (1)	8 (1)

Fonte: Próprio autor.

4.5. Processamento dos pães sem glúten

O processamento dos pães foi realizado diante da devida pesagem dos ingredientes (Tabela 6) em balança analítica, seguida da sua homogeneização em batedeira (Arno planetária Mod.: BPA, COM. REF.: SX7000.12), onde inicialmente era misturada água, óleo de girassol, açúcar, sal, goma xantana por aproximadamente 5 minutos na velocidade 2, em seguida adiciona-se a farinha de arroz, fermento biológico seco e, dependendo de qual seja o tratamento (Tabela 8), a zeína e/ou colágeno, homogeneizando-os por mais 5 minutos na velocidade 2.

Nas formulações dos pães adicionados da zeína houve previamente o ajuste do pH da zeína obtida utilizando uma solução de carbonato de cálcio (10g/50mL) até obter um pH próximo a neutralidade.

As massas foram enformadas e levadas à fermentação na câmara BOD, permanecendo por 40 minutos a uma temperatura de 29°C. Após a fermentação, a massa foi transferida para a máquina de pão (Panificadora Multi Pane 2 Britânia) onde foi submetida à operação de forneamento por 60 minutos. Ao final do forneamento, os pães foram desenformados e colocados para resfriar até atingirem a temperatura ambiente (25±2°C), em seguida armazenados em embalagens de polietileno de baixa densidade e temperatura ambiente (25 ± 2°C) para posterior realização das análises experimentais.

4.6. Análises Físicas

4.6.1. Determinação de Cor

A avaliação das cores dos pães sem glúten foi realizada por meio do sistema de leitura de três parâmetros, o CIELAB, também conhecido como espaço $L^* a^* b^*$, a partir do colorímetro *Color Reader* (Minolta, Modelo: CR-10).

O parâmetro L^* está associado à luminosidade das amostras e pode variar de 0 a 100, sendo que os valores mais altos de L^* (próximos de 100) caracterizam as amostras mais claras e os menores valores de L^* (menores que 50) caracterizam amostras mais escuras. A coordenada cromática a^* está associada à dimensão verde-vermelho; valores positivos de a^* indicam amostras na região do vermelho e valores negativos de a^* indicam amostras na região do verde. A coordenada cromática b^* está associada à dimensão azul-amarelo; valores positivos de b^* indicam amostras na região do amarelo e valores negativos de b^* indicam amostras na região do azul (ROLIM et al, 2010).

4.6.2. Determinação de volume específico

O volume específico (Equação 2) seguiu a metodologia de Brito e Cereda (2015) com adaptações, onde foi estabelecido pelo quociente entre o volume (cm^3) e a massa (g) de cada amostra forneada, com resultados expressos em cm^3g^{-1} . A massa será obtida em balança analítica e o volume pelo cálculo dado pela multiplicação da altura, vezes a largura, vezes o comprimento de cada pão.

$$VE = \frac{V}{m} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: VE - volume específico ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$); V - volume (cm^3); m - massa (g).

4.6.3. Perda de peso ao assar

A perda de peso ao assar (PPA) foi obtida utilizando-se o peso anterior e posterior ao forneamento segundo metodologia de El- Dash (1978) e será calculada segundo a Equação 3.

$$PPA = \left(\frac{PA-PP}{PA} \right) \times 100\% \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: PPA - Porcentagem da perda de peso ao assar (%); PA - Peso anterior ao assamento (g); PP - Peso posterior ao assamento (g).

4.6.4. Determinação de Firmeza

A firmeza da crosta dos pães, para cada tratamento, foi realizada em triplicata segundo a metodologia da AACC (74-09) (2000) com adaptações. Cada tratamento dos pães sem glúten foi colocada no centro da plataforma do Analisador de Textura (CT3™ Texture Analyzer), sendo então comprimidas por sonda cilíndrica de 36 mm de diâmetro nas seguintes condições de trabalho: velocidade de pré-teste: 2 mm/s; velocidade de teste: 1,7 mm/s; velocidade de pós-teste: 1,7 mm/s; compressão: 40%; força de disparo: 5 g. Posteriormente, fatias de 25 mm de espessura também foram submetidas as mesmas condições citadas anteriormente com modificação da compressão (30%).

4.6.5. Microscopia digital

A análise de microscopia digital dos quatro tratamentos foi realizada utilizando o microscópio digital da Marca Dino-Lite, modelo Dino-Lite Plus AM313T, aproximação 20x ~ 230x e o software DinoCapture 2.0. Através da análise visual das imagens capturadas, será observado a estrutura do miolo e casca dos pães adicionados de zeína e colágeno segundo o delineamento experimental, onde estas serão comparadas ao controle.

4.7. Análise estatística

O rendimento da zeína foi analisado pelo software Microsoft Excel a partir da média das massas obtidas em cada extração juntamente com seu desvio padrão. As análises físicas: cor instrumental, volume específico, perda de peso ao assar e firmeza, foram avaliadas estatisticamente pelo software Statistical Analysis System (SAS®) Studio por Análise de Variância (ANOVA) e Teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$), para que sejam comparadas as médias e determinar qual o efeito de cada variável sobre as características físicas dos pães sem glúten.

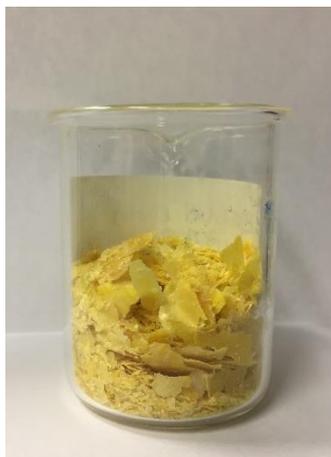
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento da zeína

A extração química das proteínas do milho, seja diretamente de grãos macerados ou de seus derivados industrialmente processados, tem por base o uso de soluções alcoólicas, empregadas como solventes, pois a classificação das proteínas do milho tem por base a solubilidade em diferentes solventes, onde as prolaminas, são solúveis em soluções alcoólicas a 70-80%; e o uso de um agente redutor na extração, como o ácido ascórbico, pois as zeínas β , γ e δ são extraídas somente com redução das ligações de dissulfeto (SANT'ANA, 2012).

Diante disto, foram realizadas várias extrações da proteína do milho segundo o método modificado de Sant'ana (2012) a partir da farinha de milho flocada e verificou-se que seu rendimento médio foi de $9,19 \pm 1,0\%$ de proteínas totais do milho, onde segundo Papalia & Londero, (2015) a zeína representa cerca de 60% das proteínas totais do milho.

Figura 7- Zeína obtida pelo método de extração química modificado de Sant'ana (2012).



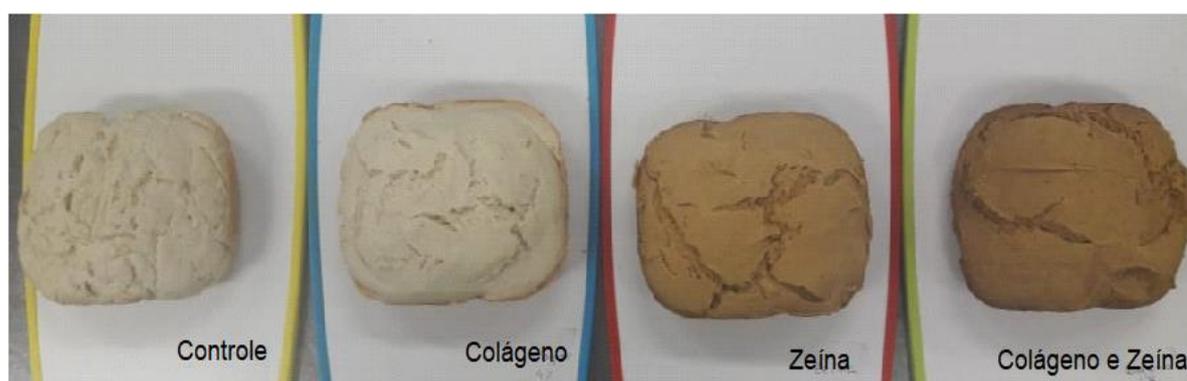
Fonte: Próprio autor.

O experimento realizado por Shukla et al. (2000) obteve uma recuperação média das zeínas de 50,6 % do total das proteínas do milho, utilizando-se o etanol a 70% por 30-40 min a uma temperatura de 50°C. Comportamento semelhante foi observado no estudo para extração de zeína realizado por Sant'ana (2012), a partir do grão de milho moído integral e utilizando-se como solvente extrator o etanol 70%, o qual obteve 40,26% de proteína. Diante destes resultados, pode-se concluir que dentro do rendimento de proteína total do milho encontrado neste estudo podemos assumir que o percentual de zeína está próximo ao da literatura, o qual seria de 40 a 60%, o qual é um resultado satisfatório de extração.

5.2. Determinação de cor

A cor é uma importante característica em produtos de panificação, pois, aliada a textura e ao aroma, contribui na aceitação dos consumidores. Por outro lado, a cor é dependente das características físico-químicas da massa (conteúdo de água, pH, açúcares redutores) e do processo de fabricação (temperatura de forno e umidade relativa) (EVANGELHO *et al*, 2012). O resultado médio de cor da crosta e do miolo dos pães sem glúten de acordo com o delineamento experimental, utilizando-se os parâmetros segundo o sistema CIELAB, estão expressos na Tabela 9 e a análise visual das crostas estão demonstradas na Figura 8.

Figura 8- Análise visual da cor da crosta dos pães sem glúten de acordo com cada tratamento.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 9- Determinação de cor da crosta e do miolo dos pães sem glúten expressos no sistema CIELAB.

Tratamento	Crosta			Miolo		
	a*	b*	L*	a*	b*	L*
Controle	4,47±1,3 ^b	28,43±4,0 ^b	56,83±2,2 ^a	4,90±0,0 ^c	29,30±0,4 ^b	56,50±1,2 ^a
Colágeno	5,0±0,2 ^b	30,03±1,5 ^b	56,90±2,6 ^a	4,20±0,4 ^c	28,57±0,6 ^b	56,37±0,8 ^a
Zeína	13,43±1,0 ^a	43,27±1,4 ^a	47,87±2,6 ^{ab}	11,70±0,4 ^b	41,93±1,3 ^a	47,77±2,7 ^b
Colágeno e zeína	13,9±0,7 ^a	40,33±2,3 ^a	38,93±5,7 ^b	13,43±0,2 ^a	41,53±1,8 ^a	42,67±2,4 ^c

Parâmetros de cor (CIELAB) - L(luminosidade), a*(intensidade de vermelho/verde) e b* (intensidade de amarelo/azul). Média da triplicata ± desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Analisando a cor da crosta e do miolo apresentada na Tabela 9 observa-se que o parâmetro luminância L* com valores mais altos indicam maior refletância da luz, traduzindo-se em pães com coloração clara, pobres em açúcares, como no caso dos tratamentos Controle e Colágeno, os quais não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre si, como mostra a Figura 8.

Essa coloração é justificada pois os pães sem glúten são geralmente identificados por ter cor mais clara do que pães de trigo em virtude de amidos e farinha de arroz (WRONKOWSKA; HAROS; SORAL-SMIETANA, 2013). Gomez et al. (2003) também ressaltam que a cor do miolo é afetada diretamente pelas características da farinha de arroz.

Em relação aos parâmetros de cromaticidade a^* (desvio para o vermelho) e b^* (desvio para o amarelo) verificou-se que os tratamentos Zeína e Colágeno com Zeína obtiveram os maiores valores e diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos tratamentos Controle e Colágeno, ou seja, os valores de a^* quando são maiores indicam uma coloração mais escura de crosta e miolo, e os valores de b^* quando forem valores altos são traduzidos para amostras com forte coloração amarelada ou dourada (ESTELLER; LANNES, 2005). Estes resultados podem ser confirmados na Figura 8, onde visualmente os tratamentos Controle e Colágeno são mais claros e os Zeína e Colágeno com Zeína são mais amarelados.

Um aumento significativo do amarelamento no pão suplementado com a proteína lupina foi observado por Kohajdová *et al.* (2011). O mesmo efeito do amarelamento foi relatado por Ziobro et al. (2016) em seu estudo dos efeitos das proteínas isoladas (albumina, colágeno, ervilha, lupina e soja) sobre a qualidade e estrutura do pão sem glúten, onde os autores observaram que a presença das proteínas diminuiu significativamente a luminosidade (L^*) dos pães, contudo obtiveram valores dos parâmetros a^* e b^* positivos.

Miñarro *et al.* (2010) avaliaram a influência de proteína unicelular sobre as características do pão sem glúten. Segundo os autores, os pães contendo proteínas unicelulares ficaram mais escuros que a mesma fórmula sem este ingrediente, devido à própria cor da proteína ($L^*=65$, $a^*=6$, e $b^*=21$). Já Graça *et al.* (2017) utilizaram colágeno em pó e em fibra em pão sem glúten com farinha de arroz e observaram que a luminosidade da crosta e do miolo em pães de colágeno em pó foi significativamente maior, ou seja, pães mais claros, e que o croma a^* e b^* tiveram maiores valores para as formulações com o colágeno em fibra, tendo assim influência na cor dos pães.

Segundo Esteller e Lannes (2005) embora a coloração dourada seja característica de produtos forneados, essa cor pode aparecer por outras razões, a exemplo de pães ricos em proteínas, açúcares redutores e ovos (carotenoides). Wronkowska; Haros; Soral-Smietana (2013) também cita que a própria formulação do pão pode alterar a cor do pão final. Portanto, os tratamentos Zeína e Colágeno com Zeína obtiveram valores maiores nos parâmetros de cromaticidade devido a presença da própria zeína e também do pigmento do milho que permaneceu na proteína mesmo após sua extração, resultando em pães mais amarelados.

5.3. Determinação de volume específico

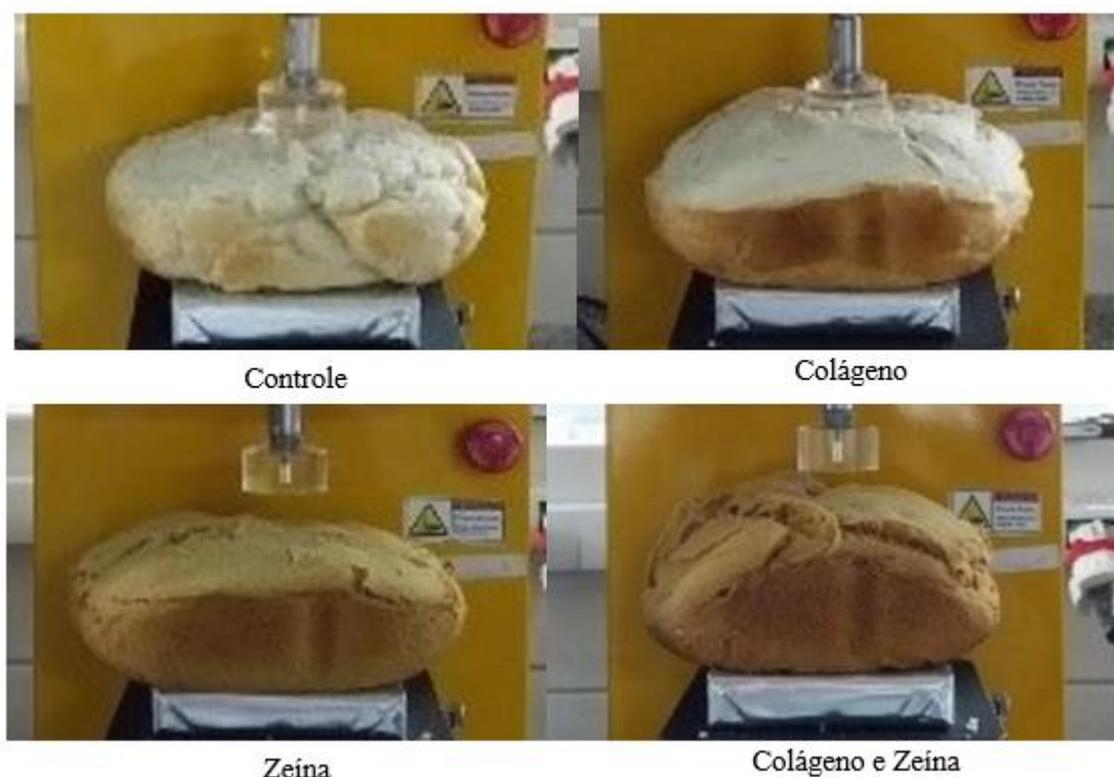
O volume específico é uma das características visuais mais importante nos pães, a qual influencia fortemente a escolha do consumidor. É também a medida utilizada para verificar a capacidade da farinha de expandir e reter o gás no interior da massa durante o forneamento (EVANGELHO et al., 2012). De acordo com o delineamento experimental, a Tabela 9 demonstra os valores médios dos volumes específicos dos pães sem glúten, os quais foram analisados segundo a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$) para verificar o efeito do colágeno hidrolisado e zeína nos pães sem glúten (Tabelas 10, 11 e 12). A Figura 9 ilustra o volume dos pães de acordo com seu respectivo tratamento.

Tabela 10- Volumes específicos dos pães sem glúten segundo o delineamento experimental.

Tratamento	Volume específico ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)*
Colágeno e Zeína	$2,19 \pm 0,05^a$
Colágeno	$2,08 \pm 0,06^a$
Zeína	$1,92 \pm 0,04^b$
Controle	$1,43 \pm 0,06^c$

*Média da triplicata \pm desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 9- Análise visual do volume dos pães sem glúten.



Fonte: Próprio autor.

O maior volume específico ($2,19 \pm 0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$) foi observado no pão que continha em sua formulação o colágeno hidrolisado e a zeína (Tabela 10) e este tratamento não obteve diferença estatística ($p \leq 0,05$) ao ser comparado com a formulação adicionado apenas com colágeno hidrolisado, dados comprovados visualmente na Figura 9. O tratamento com zeína resultou em um volume específico ($1,92 \pm 0,04 \text{ cm}^3/\text{g}$) estatisticamente menor que os que utilizaram colágeno, porém um valor significativamente melhor que o controle, pois este último apresentou o menor volume específico ($1,43 \pm 0,06 \text{ cm}^3/\text{g}$) e diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de todas as outras formulações. Sendo assim, a presença das proteínas impactou positivamente no volume específico dos pães sem glúten em comparação ao controle. As Tabelas 11 e 12 mostram o efeito das proteínas sobre o volume específico dos pães.

Tabela 11- Efeito do colágeno hidrolisado sobre o volume específico dos pães sem glúten.

Colágeno hidrolisado (%)	Volume específico ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)*
4	$2,13 \pm 0,08^a$
0	$1,67 \pm 0,27^b$

*Média da triplicata \pm desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 12- Efeito da zeína sobre o volume específico dos pães sem glúten.

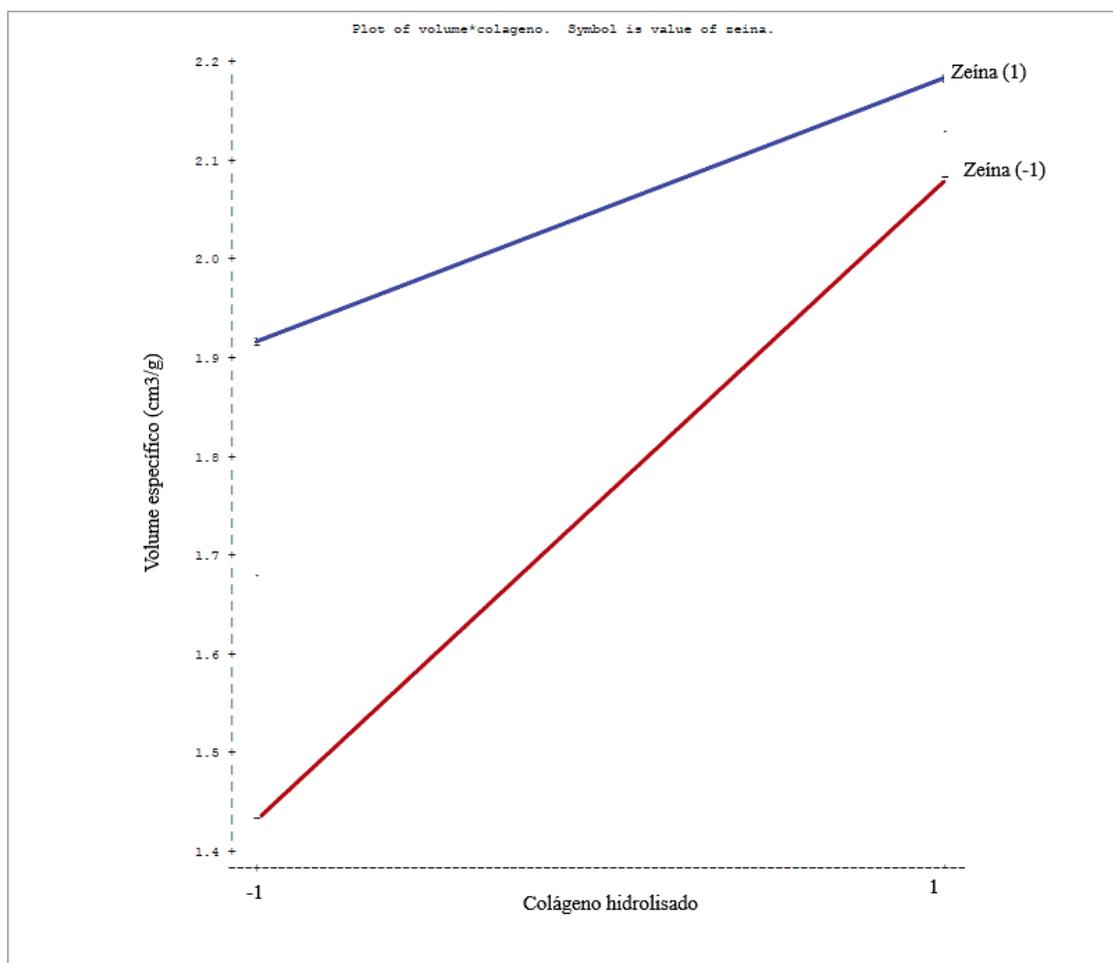
Zeína (%)	Volume específico ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)*
8	$2,05 \pm 0,15^a$
0	$1,75 \pm 0,36^b$

*Média da triplicata \pm desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os pães sem glúten com a adição tanto do colágeno hidrolisado quanto da zeína obtiveram diferença significativa ($p \leq 0,05$) daqueles que não continham essas proteínas em sua formulação, ou seja, a presença dessas proteínas promoveram efeito sobre o volume específico, aumentando significativamente a capacidade a retenção de gás gerado durante a fermentação e o forneamento dos pães sem glúten, reforçando o resultado observado na Tabela 10. Segundo Moore *et al* (2004) a capacidade de retenção de gás é uma dificuldade tecnológica encontrada na produção de massas sem glúten, originando pães com baixo volume específico e miolo firme e borrachento. Portanto, ao melhorar o volume específico obtém-se um pão sem glúten de melhor qualidade.

A interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre o volume específico encontra-se no gráfico da Figura 10.

Figura 10- Interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre o volume específico dos pães sem glúten.



Fonte: Software Statistical Analysis System (SAS®) Studio.

Observa-se na Figura 10 que os pães que não continham em sua formulação nem o colágeno e nem a zeína (-1 e -1) obtiveram menor volume específico ($1,43 \pm 0,06 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$), contudo ao ser adicionado apenas o colágeno hidrolisado ao tratamento já se obtém um aumento significativo ($p \leq 0,05$) desta característica ($2,08 \pm 0,06 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$).

Os pães sem glúten adicionados com a zeína obtiveram também um aumento no volume específico para as duas condições do colágeno (-1 e 1), onde a interação colágeno e zeína (1 e 1) torna-se estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) sendo o resultando do maior volume específico dos pães ($2,19 \pm 0,05 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$), ou seja, pães com maior capacidade de retenção de gás no interior da massa durante a fermentação e o forneamento. Esta conclusão é confirmada

por Ziobro *et al* (2016), onde eles citam que a capacidade da estrutura do miolo para reter o gás produzido durante a fermentação tem impacto significativo no volume do pão.

As proteínas utilizadas em massas sem glúten apresentam importante papel, pois elas podem conter o gás produzido durante a fermentação, a água e estabilizar o gel de amido formado durante a gelatinização. A capacidade das proteínas de formar uma estrutura está relacionada com suas propriedades emulsionante e de expansão (ZIOBRO *et al*, 2016).

O volume específico de pães sem glúten pode variar bastante, dependendo do tipo de farinha, aditivos, açúcares disponíveis, teor de fibras, fermento, pH e do processo utilizado (GUSMÃO, 2017; MIÑARRO *et al*, 2010). Neste experimento, o volume específico variou entre 1,43 e 2,19 cm³/g nas formulações desenvolvidas, resultados comparáveis a outras formulações de pães sem glúten, como no estudo realizado por Elgeti *et al* (2014) sobre o aperfeiçoamento de volume e textura de pão sem glúten usando farinha branca de quinoa, o qual obteve valores de volume específico entre 1,65 e 2,5 cm³/g.

Graça *et al* (2017) também verificaram em seu estudo da adição de colágeno em pães sem glúten que o volume específico de seus pães variou entre 2,6 e 3,8 cm³/g e que os pães adicionados com 2% e 4% de colágeno em fibras foram os que apresentaram os volumes mais altos. Já Miñarro *et al* (2010) encontrou valores entre 2,21 e 3,3 cm³/g em seu estudo da influência de proteínas unicelulares nas características dos pães sem glúten.

O volume específico obtido neste estudo para pães sem glúten ainda é menor comparado com pães produzidos com trigo encontrados na literatura, a exemplo do volume específico médio encontrado por Soares *et al*. (2008) para pães de forma com 100% de farinha de trigo que foi de 4,42 cm³/g, enquanto que o valor de 4,10 cm³/g foi encontrado por Esteller e Lannes (2005). Embora as tentativas de conseguir um pão sem glúten que contenha as mesmas características de um pão com glúten, não é possível garantir que isso ocorra, pois, vários fatores influenciam a produção dos pães, como o tipo de farinha, qualidade e quantidade dos ingredientes da massa e o emprego de tecnologia adequada.

Portanto, nesta busca por tecnologias adequadas para a panificação sem glúten encontram-se alternativas viáveis, a exemplo da adição de proteínas como colágeno hidrolisado e a zeína. Esta adição de proteínas que possam ser consumidas por celíacos mostrou-se influenciar significativamente ao nível de 95% de confiança no aumento do volume específico, tornando-se efetiva na obtenção de pães sem glúten com a qualidade esperada pelo consumidor.

5.4. Perda de peso ao assar

A perda de peso ao assar, é uma medida que demonstra a capacidade da massa em reter água, sendo acentuada em pães sem glúten devido à ausência da rede proteica (EVANGELHO et al., 2012). A análise de perda de peso ao assar foi realizada mediante comparação de peso do produto antes e após o forneamento e de acordo com o delineamento experimental seus valores médios estão demonstrados na Tabela 13, os quais foram analisados segundo a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$) para verificar o efeito do colágeno hidrolisado e zeína nos pães sem glúten (Tabelas 13, 14 e 15).

Tabela 13- Perda de peso ao assar dos pães sem glúten segundo o delineamento experimental.

Tratamento	Perda de peso ao assar (%)*
Controle	11,06 ± 0,04 ^a
Colágeno	10,41 ± 0,04 ^b
Zeína	10,30 ± 0,03 ^c
Colágeno e Zeína	10,16 ± 0,02 ^d

*Média da triplicata (± desvio padrão). Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Todos os tratamentos aplicados nos pães sem glúten diferiram estatisticamente entre si a 5% de significância quanto a perda de peso ao assar (Tabela 13). A maior perda de peso ao assar foi observada no pão sem glúten controle (11,06 ± 0,04%), enquanto que o tratamento Colágeno e Zeína apresentou a menor perda de peso (10,16 ± 0,02%). Destaca-se também que os pães elaborados com colágeno hidrolisado obtiveram uma perda de peso significativamente maior ao comparado com os pães adicionados apenas da zeína, contudo a combinação colágeno hidrolisado e zeína obtém o resultado ainda mais satisfatório ao ser comparado com a adição isolada dessas proteínas. As Tabelas 14 e 15 mostram esse efeito das proteínas sobre a perda de peso ao assar dos pães.

Tabela 14- Efeito do colágeno hidrolisado sobre a perda de peso ao assar dos pães sem glúten.

Colágeno hidrolisado (%)	Perda de peso ao assar (%)*
0	10,68±0,42 ^a
4	10,29±0,14 ^b

*Média da triplicata ± desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

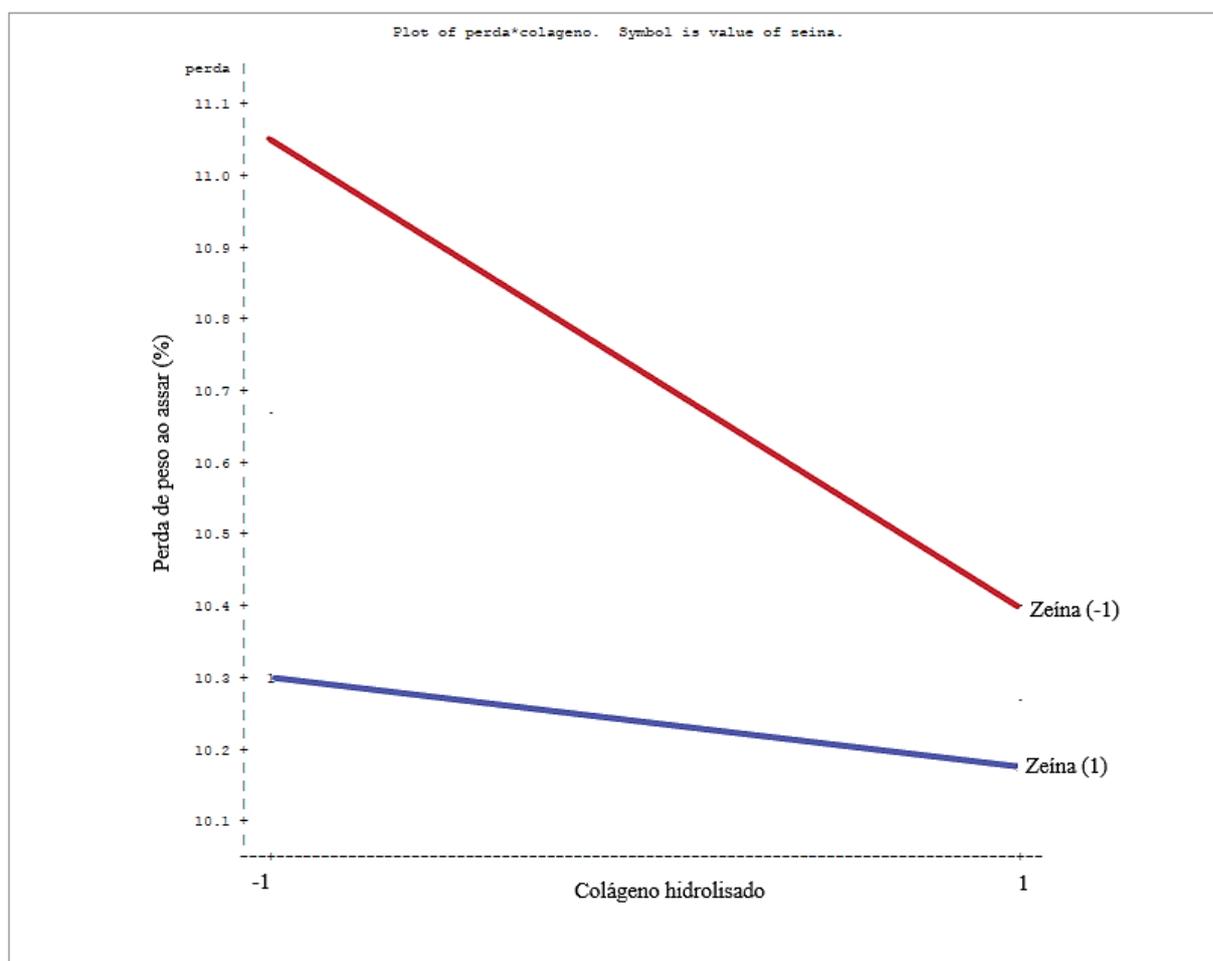
Tabela 15- Efeito da zeína sobre a perda de peso ao assar dos pães sem glúten.

Zeína (%)	Perda de peso ao assar (%)*
0	10,73±0,36 ^a
8	10,23±0,08 ^b

*Média da triplicata ± desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os pães sem glúten com a adição tanto do colágeno hidrolisado quanto da zeína obtiveram diferença significativa ($p \leq 0,05$) daqueles que não continham essas proteínas em sua formulação, ou seja a presença dessas proteínas promoveram efeito positivo sobre a perda de peso ao assar comparado ao controle, reduzindo significativamente a perda de água do produto, reforçando o resultado observado na Tabela 13. A interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre a perda de peso ao assar encontra-se no gráfico da na Figura 11.

Figura 11- Interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre a perda de peso ao assar.



Fonte: Software Statistical Analysis System (SAS®) Studio.

Ao analisar a Figura 11 nota-se que os pães que não continham nem o colágeno e nem a zeína (-1 e -1) obtiveram um maior percentual de perda de peso ao assar ($11,06 \pm 0,04\%$), contudo os pães que não continham em sua formulação a zeína (1 e -1) ainda assim conseguiram uma redução da perda de peso ao assar devido a presença do colágeno.

Os pães sem glúten que foram adicionados com a zeína obtiveram uma redução no percentual de perda de peso ao assar para as duas condições do colágeno (-1 e 1), onde a interação colágeno e zeína (1 e 1) torna-se estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) resultando no menor percentual de perda de peso nos pães ($10,16 \pm 0,02\%$), ou seja maior capacidade de retenção de água.

Segundo Ziobro et al (2016) a capacidade de conter a água e estabilizar o gel de amido formado durante a gelatinização é um dos papéis importantes que as proteínas exercem em massas sem glúten. Miñarro *et al* (2010) também descreveu que a presença de proteínas unicelulares nas formulações de pães sem glúten resultou na diminuição de perda de peso ao assar, a qual seria a explicação para a funcionalidade da proteína, a qual para o autor é a capacidade de reter água.

A perda de peso dos pães sem glúten adicionados ou não de colágeno hidrolisado e zeína em função do forneamento variou entre 10,16 e 11,06%. Valores semelhantes foram encontrados na literatura, como no estudo realizado por Gusmão (2017) sobre o desenvolvimento de pão de forma sem glúten com farinha de arroz vermelho, enzima transglutaminase microbiana e prebiótico, o qual obteve uma perda de peso dos pães em função do forneamento entre 3,88 e 12,43%. Já Nobre (2015) encontrou valores entre 8,49 e 11,46% para perda de peso em pães sem glúten desenvolvidos com farinha de quinoa e arroz.

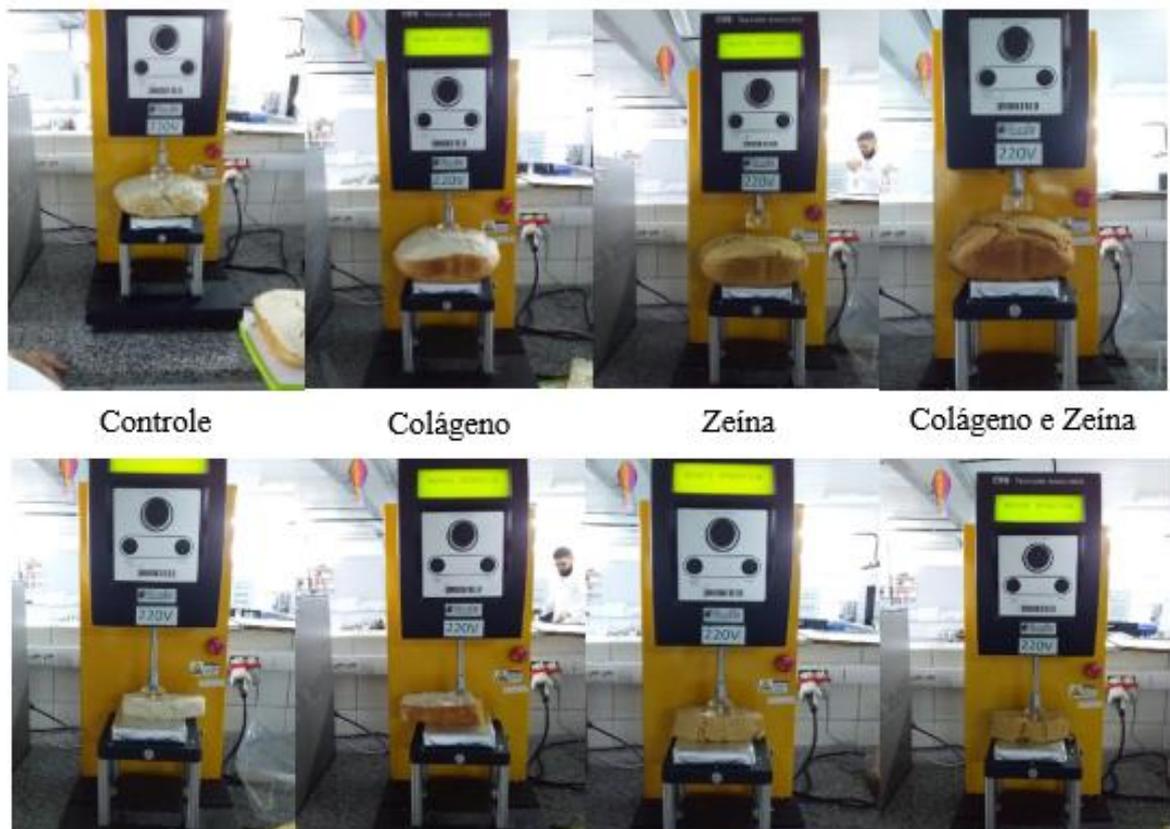
Miñarro *et al* (2012) encontrou valores entre 11,31 e 12,06% para perda de peso em pães sem glúten produzidos a partir de farinhas de legumes, como grão de bico, ervilha, soja e alfarroba. Já Miñarro *et al* (2010) em seu estudo da influência de proteínas unicelulares nas características dos pães sem glúten encontrou valores entre 13,87 e 20,09% de perda de peso ao assar.

Pães isentos de glúten tendem a apresentar volume inferior e problemas de textura em função do forneamento devido à ausência da rede proteica, pois, segundo Evangelho *et al* (2012) o volume é influenciado pela capacidade de retenção de água pela massa, portanto a adição de proteínas de diferentes fontes e que possam ser consumidas por celíacos, como o colágeno hidrolisado e a zeína, torna-se uma alternativa significativa ao nível de 95% de confiança para que este produto não perca características físicas importantes como a capacidade de reter água durante o processo de forneamento.

5.5. Determinação de firmeza

A firmeza dos pães está relacionada com a força aplicada para ocasionar uma deformação ou rompimento da amostra, avaliada por texturômetros mecânicos e correlacionada com a mordida humana durante a ingestão de alimentos (ESTELLER; LANNES, 2005). Os resultados para firmeza segundo o delineamento experimental utilizado para os pães sem glúten estão descritos na Tabela 16 e o experimento pode ser visualizado na Figura 12. Estes resultados foram analisados segundo a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$) para verificar o efeito do colágeno hidrolisado e zeína nos pães sem glúten (Tabelas 16, 17 e 18).

Figura 12- Análise de firmeza da crosta e do miolo (fatias) dos pães sem glúten para cada tratamento.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 16- Firmeza da crosta e do miolo dos pães sem glúten segundo delineamento experimental.

Tratamento	Firmeza (gf)	
	Crosta*	Miolo*
Controle	9314 ^a	6454±340 ^a
Colágeno	5002 ^d	5383±757 ^a
Zeína	7560 ^b	4995±526 ^a
Colágeno e Zeína	5668 ^c	5341±749 ^a

*Média da triplicata ± desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Todos os tratamentos aplicados nos pães sem glúten não diferiram estatisticamente entre si a 5% de significância quanto a firmeza do miolo (Tabela 16). No entanto, os valores da firmeza para a crosta dos pães obtiveram diferença significativa ($p \leq 0,05$) em todos os tratamentos. A formulação controle obteve maior valor de firmeza para a crosta (9314 gf) o que pode ser explicado pelo fato deste apresentar um aspecto compacto na superfície possivelmente por não apresentar uma rede estruturada tão definida. Já a formulação colágeno apresentou o menor valor de firmeza (5002 gf) seguido do tratamento colágeno e zeína (5668 gf), ou seja, a adição das proteínas acarretou na diminuição da dureza dos pães. As Tabelas 17 e 18 mostram detalhadamente o efeito das proteínas sobre a firmeza da crosta e do miolo dos pães.

Tabela 17- Efeito do colágeno hidrolisado na firmeza da crosta e do miolo dos pães sem glúten.

Colágeno (%)	Firmeza (gf)	
	Crosta*	Miolo*
0	8437±1240 ^a	5724,5±892 ^a
4	5335±471 ^b	5362±674 ^a

*Média da triplicata ± desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 18- Efeito da zeína na firmeza da crosta e do miolo dos pães sem glúten.

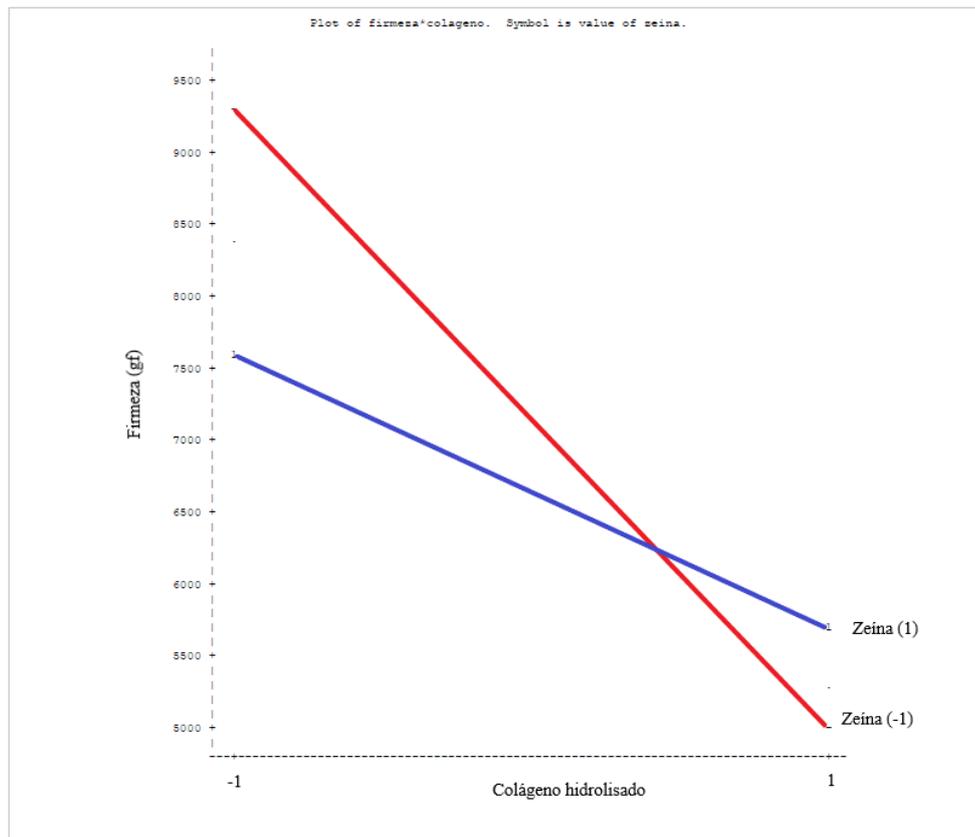
Zeína (%)	Firmeza (gf)	
	Crosta*	Miolo*
0	7158±3049 ^a	5918,5±787 ^a
8	6614±1338 ^b	5168±609 ^a

*Média da triplicata ± desvio padrão. Médias com letras em comum, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os pães sem glúten com a adição tanto do colágeno hidrolisado quanto da zeína obtiveram diferença significativa ($p \leq 0,05$) daqueles que não continham essas proteínas em sua formulação quanto a firmeza da crosta, ou seja, a presença dessas proteínas diminuiu significativamente a dureza da crosta dos pães sem glúten, reforçando o resultado observado na Tabela 16. Por outro lado, a presença destas proteínas não causou esse mesmo efeito na firmeza do miolo, pois não houve diferença estatística a 5% de significância entre nenhum dos tratamentos analisados.

Graça et al. (2017) em seu trabalho de adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz obteve valores de firmeza do miolo dos pães sem adição de colágeno (153,98 gf) e com adição de 4% de colágeno em pó (aproximadamente 240 gf), os quais não diferiram significativamente, enquanto que o pão com 8% de colágeno em pó apresentou a maior firmeza (1.143,13 gf). Eles também constataram que embora a adição de 4% de colágeno tenha influenciado significativamente ($p \geq 0,05$) no volume específico dos pães, não foi verificada influência significativa no seu valor de firmeza do miolo.

Figura 13- Interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre a firmeza da crosta.



Fonte: Software Statistical Analysis System (SAS®) Studio.

Segundo o teste ANOVA, não houve interação significativa entre as proteínas sobre a firmeza do miolo, pois seu pF obteve valor igual 0,0825, maior que 0,05. Portanto, apenas a interação entre o colágeno hidrolisado e a zeína sobre a firmeza da crosta foi graficamente analisada (Figura 13). Observa-se na Figura 13 que os pães que não continham em sua formulação nem o colágeno e nem a zeína (-1 e -1) obtiveram maior firmeza da crosta (9314 gf), contudo ao ser adicionado apenas o colágeno hidrolisado ao tratamento já se obtém uma diminuição significativo ($p \leq 0,05$) desta característica (5002 gf). Os pães sem glúten adicionados com a zeína obtiveram também uma diminuição da firmeza da crosta para as duas condições do colágeno (-1 e 1), onde a interação colágeno e zeína (1 e 1) torna-se estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em comparação ao controle, sendo o resultando igual a 5668 gf, ou seja, pães com maior capacidade de retenção de água na crosta.

Os pães sem glúten que obtiveram melhores resultados de firmeza neste estudo foram justamente os que continham proteínas em sua formulação e isso pode ser explicado, pois, a força aplicada para deformar uma amostra de produto panificado é dependente da formulação, umidade da massa e conservação do produto (ESTELLER; LANNES, 2005).

Berta et al. (2019) encontraram resultados que indicaram a diminuição da dureza da crosta com o aumento da concentração de zeína dos seus pães e essa redução pode ser explicada pela retenção de água adicional pela proteína na crosta. O aumento do teor de proteína zeína na farinha resultou em uma crosta de pão de maior atividade de água e, conseqüentemente, menor dureza, uma vez que a água age como um plastificador (BERTA et al., 2019).

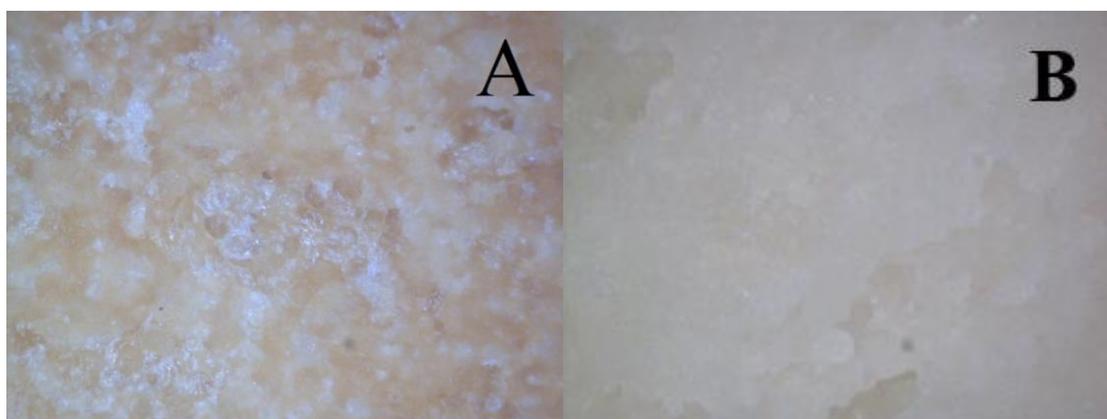
Segundo Ziobro et al. (2016) as mudanças de textura estão intimamente relacionadas com a migração da água para a crosta, e as mudanças causadas pela recristalização dos polímeros de amido. A proteína afeta significativamente esse processo, pois em um pão à base de amido, em que não há interações proteína-amido, a água é vinculada apenas por uma fração de carboidrato, endurecendo muito mais rápido do que um pão de trigo padrão que contendo glúten (ZIOBRO et al, 2016). Portanto, ao adicionar as proteínas, zeína e colágeno hidrolisado, essa interação proteína-amido é estabelecida, causando um efeito positivo na retenção de água na crosta e diminuição da dureza nos pães sem glúten.

5.6. Microscopia digital

A microscopia e outras técnicas de imagens, como ressonância magnética, são técnicas apropriadas para análise de estrutura de alimentos em termos de morfologia e composição, sendo somente um método analítico que fornece resultados em forma de imagens (ARIMATÉA, 2015).

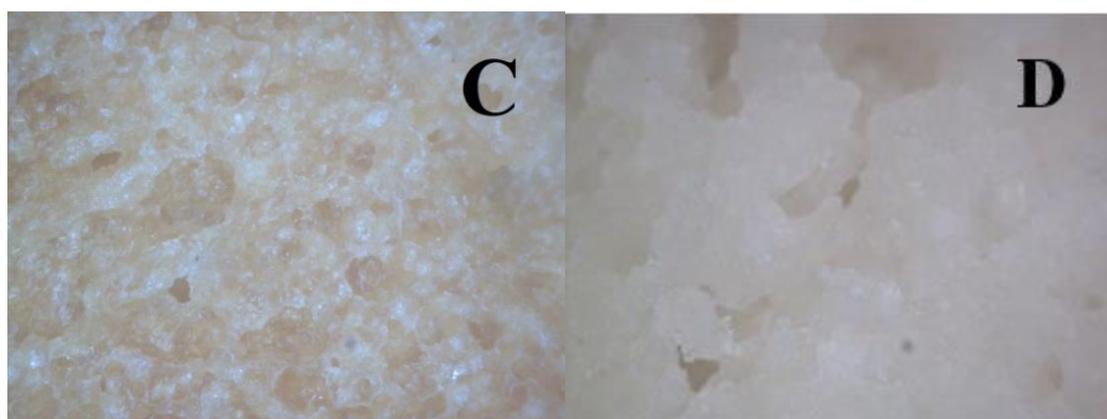
A microscopia aplicada em produtos de panificação tem sido utilizada com a finalidade de observar o formato e distribuição dos alvéolos na rede formada, contribuindo para a retenção do gás da fermentação e estruturação celular do miolo (CAUVAIN, 2009). Wolter et al. (2014) também descreve que análise de imagem digital é utilizada para caracterizar a estrutura do miolo e comparar os pães em termos de área de fatia, número de células, volume celular e porosidade. Neste intuito, a microscopia digital foi aplicada na crosta e no miolo dos quatro tratamentos dos pães sem glúten (Figuras 14, 15, 16 e 17).

Figura 14- Microscopia digital do tratamento controle.



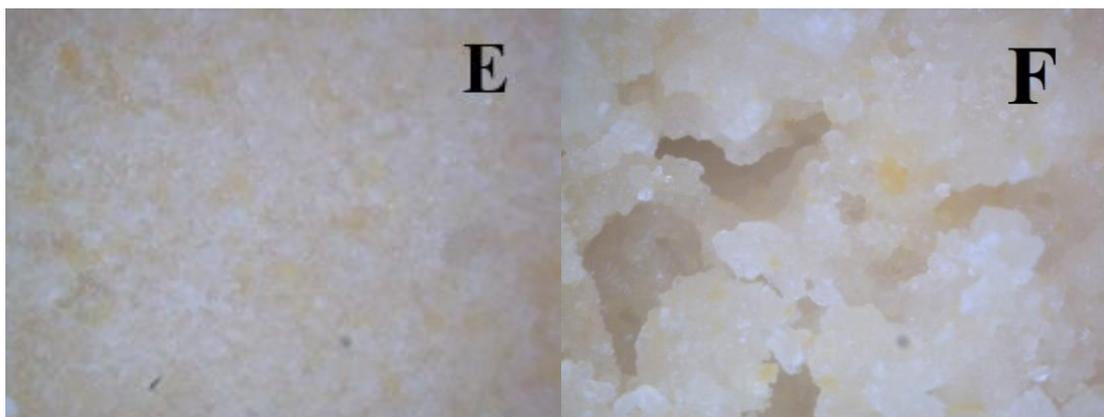
(A) Microscopia da crosta do tratamento controle; (B) Microscopia do miolo do tratamento controle.

Figura 15- Microscopia digital do tratamento colágeno.



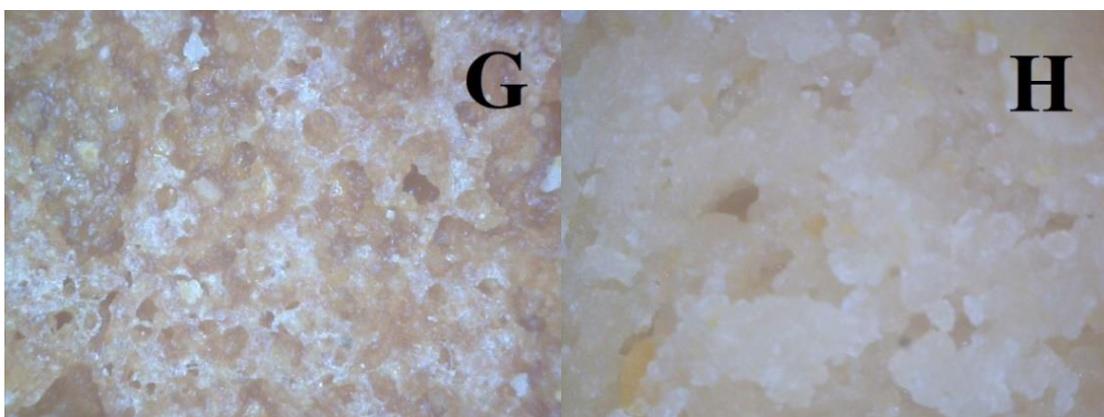
(C) Microscopia da crosta do tratamento colágeno; (D) Microscopia do miolo do tratamento colágeno.

Figura 16- Microscopia digital do tratamento zeína.



(E) Microscopia da crosta do tratamento zeína; (F) Microscopia do miolo do tratamento zeína.

Figura 17- Microscopia digital do tratamento colágeno e zeína.



(G) Microscopia da crosta do tratamento colágeno e zeína; (H) Microscopia do miolo do tratamento colágeno e zeína.

A análise das imagens da crosta dos pães sem glúten elaborados neste estudo indica que todos os tratamentos apresentaram uma maior densidade celular, ou seja, poros menores e mais unidos, e isso se deve a retrogradação do amido que ocorre durante o resfriamento. A retrogradação é um processo onde as moléculas de amilose auto associam-se, e formam um gel que resulta num aumento da consistência final e também é responsável pelo endurecimento de produtos à base de amido (COULTATE, 2002; SILVA, 2014). Contudo os tratamentos controle (Figura 14A) e zeína (Figura 16E) apresentaram uma estrutura celular mais uniforme ao serem comparados com os tratamentos colágeno (Figura 15C) e colágeno e zeína (Figura 17G), tornando assim sua crosta mais firme em comparação com as duas últimas formulações e esse resultado é confirmado pelos valores encontrados de firmeza da crosta (Tabela 16).

As imagens do miolo dos pães sem glúten demonstraram que o tratamento controle apresentou menor número de células, portanto baixa formação de bolhas de ar, e maior homogeneidade da rede celular devido a geleificação do amido presente na farinha de arroz, portanto um miolo mais uniforme e denso. Os tratamentos colágeno, zeína, colágeno e zeína também demonstraram a geleificação do amido da farinha de arroz, contudo foi visualizada uma maior quantidade de número de células no miolo, sendo estas células pequenas, alongadas e desuniformes. Além disso, foi possível verificar a presença de partículas de coloração amarelada (Figura 16F e Figura 17H), provenientes da zeína e que contribuíram também para coloração amarelada dos pães.

O aumento da quantidade de células no miolo pode ser explicado pela presença das proteínas nas formulações, pois estas proteínas formaram pequenas estruturas celulares, retendo as bolhas de ar e resultando em miolos mais porosos. Ziobro et al (2016) cita que as mudanças observadas na porosidade refletem diferenças nas propriedades físico-químicas das proteínas analisadas (estrutura, solubilidade, hidratação etc.), que levam à capacidade de retenção de gás modificada. Este resultado também foi encontrado por Berta et al. (2019) no seu estudo de pães sem glúten com concentração de zeína crescente são comparados a uma receita de controle com farinha de trigo, onde verificaram que a estimativa qualitativa da porosidade do miolo sugere que a adição de zeína ao pão produz maior tamanho de bolha, mas que não afetou significativamente o volume do pão (BERTA et al, 2019).

Ziobro et al. (2016) em seu estudo dos efeitos das proteínas isoladas (albumina, colágeno, ervilha, lupina e soja) sobre a qualidade e estrutura do pão sem glúten avaliaram parâmetros que caracterizam a estrutura do miolo a partir da análise de imagens digitais e relataram que a menor porosidade foi encontrada para o pão de controle, enquanto que a adição de outros tipos de proteínas teve um impacto positivo na porosidade, especialmente quando o colágeno foi usado. Tendência semelhante também pôde ser observada para uma série de poros grandes (com diâmetro acima de 5mm), e a relação oposta foi notada para a densidade celular, que diminuiu em comparação com o controle. A diminuição mais acentuada da densidade celular pôde ser encontrada para o pão com colágeno, que também continha a maior porcentagem de poros grandes (ZIOBRO et al, 2016).

Graça et al. (2017), aplicou diferentes concentrações de colágeno em pão de arroz sem glúten e observou a presença de estruturas da massa mais contínuas com adição crescente de colágeno comparadas com as proteínas presentes no padrão e que as massas adicionadas de 6% e 8% de colágeno apresentaram a maior quantidade de estruturas alongadas e contínuas.

Wolter et al. (2014) verificaram que a incorporação do fermento natural com *W. cibaria* levou a um número significativamente menor de células, mas simultaneamente a um aumento significativo no volume celular indicando uma estrutura mais aberta para os pães com fermento natural. Assim, os miolos dos pães com fermento natural pareciam mais grossos do que os dos respectivos pães de controle e a maior porosidade foi encontrada no pão de sorgo com fermento natural.

Evangelho et al. (2012) encontrou em seu estudo sobre propriedades tecnológicas e nutricionais de pães preparados com diferentes proporções de farinha de arroz que o tratamento com 75% de farinha de arroz extrusada apresentou grandes bolhas de ar, alvéolos desuniformes e miolo úmido, além de ter sido verificado o maior volume específico dos pães. Já os pães com 10% e com 25% de farinha de arroz extrusada apresentaram miolo uniforme, mas volume semelhante ao do pão controle.

Matos e Rosell (2013) citam que uma grande variedade de estruturas pode ser encontrada entre os pães sem glúten, alguns apresentando maior área alveolar e um maior número de alvéolos e este fato se deve à diversidade de ingredientes adicionados à massa. O presente estudo pode verificar esta afirmação, pois com a adição das proteínas zeína e colágeno hidrolisado na formulação de pão sem glúten foi observado o aumento da porosidade da crosta, tornando-as menos firme, e o aumento do número de células no miolo e conseqüentemente maior retenção de gás.

6. CONCLUSÃO

A adição da zeína isolada e do colágeno hidrolisado influenciou positivamente as características físicas do pão sem glúten desenvolvido neste estudo. A coloração da crosta e do miolo dos pães tiveram influência da zeína e dos pigmentos do milho tornando-os pães amarelados. A adição dessas proteínas também influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) quanto ao volume específico, perda de peso ao assar e firmeza, tornando os pães com maior volume específico ($2,19 \pm 0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$), menor percentual de perda de peso ($10,16 \pm 0,02\%$) e menor firmeza da crosta (5668 gf) em comparação com o controle. A microscopia digital comprovou visualmente o aumento da porosidade da crosta e do número de células do miolo nos pães adicionados das proteínas, os tornando menos firmes.

Portanto, a adição de proteínas que possam ser consumidas por celíacos mostrou-se influenciar significativamente ao nível de 95% de confiança com relação as características físicas, tornando-se efetiva na obtenção de pães sem glúten com a qualidade esperada pelo consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13170. Teste de ordenação em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1994.

ACELBRA. Associação dos Celíacos do Brasil. Dados estatísticos. Disponível em: < <http://www.ancelbra.org.br/2004/estatisticas.php> > Acesso em 18 de agosto de 2017.

ALMEIDA, O. P. Pão de forma sem glúten a base de farinha de arroz. 2011. 289 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

ALMEIDA, E. A.; SZLAPAK, R. Y. Elaboração de pão sem glúten adicionado de farinhas de batata yacon, batata doce e batata cará. Universidade Federal do Paraná, Medianeira, 2015.

ALVAREZ-JUBETE, L. et al. Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *European Food Research and Technology*, v. 230, n. 3, p. 437-445, 2010a.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – AACC. Approved methods of the AACC. 10th ed. St. Paul, 2000.

ANDERSSON H., OHGREN C., JOHANSSON D., KNIOLA M., STADING M. Extensional flow, viscoelasticity and baking performance of gluten-free zein-starch doughs supplemented with hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*. 25(6):1587–95. 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.028> >.

ARAÚJO, H. M. C.; ARAÚJO, W. M. C. Coeliac disease. Following the diet and eating habits of participating individuals in the Federal District, Brazil. *Appetite*, London, v. 57, p. 105–109, 2011.

ARGOS, P. et al. A structural model for maize zein proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v.257, n.17, p.9984-9990, 1982. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/257/17/9984.short>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

ARIMATÉA, C. C. Elaboração, aceitação sensorial e composição química de pão de forma enriquecido com resíduos agroindustriais de frutas. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Sergipe, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS (ABIA). *Compêndio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde*. São Paulo, 2000. Não paginado.

AUTRAN, J.C. Soft Wheat: view from France. *Cereal Foods World*, St. Paul, v. 34, n. 9, p. 667-676, 1989.

BENASSI, V.T.; WATANABE, E. *Fundamentos da tecnologia de panificação*. Rio de Janeiro: EMBRAPA – CTAA, 1997.

BERTA M, KOELEWIJN I, ÖHGREN C, STADING M. Effect of zein protein and hydroxypropyl methylcellulose on the texture of model gluten-free bread. *Journal of Texture Studies*. 2019. 50:341–349. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12394>

BILEK, S. E.; BAYRAM, S. K. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. *Journal of Functional Foods*, 2015. 14, 562.

BOYE, J., ZARE, F., PLETCH, A. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International* 43 (2010) 414–431. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.003

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº61, de 3 de fevereiro de 2016. Dispõe sobre o enriquecimento obrigatório das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico. Brasília, DF: ANVISA, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Brasília, DF: ANVISA, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Brasília, DF: ANVISA, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. LEI nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Brasília, DF: ANVISA, 2003. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393963/lei_10674.pdf/eb3ab49c-5d38-4633-8c15-2031101ae27e >. Acesso em 18 de agosto de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão. Brasília, DF: ANVISA, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 383 de 09 de agosto de 1999. Aprovou o Regulamento Técnico sobre o uso de aditivos alimentares. Brasília, DF: ANVISA, 1999.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 21 out., 1978. p.20.

BRITO, V. H. S.; CEREDA, M. P. Método para determinação de volume específico como padrão de qualidade do polvilho azedo e sucedâneos. Brazilian Journal of Food Technology. Campinas, v. 18, n. 1, p. 14-22, jan./mar. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.0214>

CARLI, E. M.; SEIDEL, L. B.; MARAN, M. H. S. Elaboração de produtos panificados livres de glúten. Unoesc & Ciência - ACET Joaçaba, v. 8, n. 1, p. 53-60, jan./jun. 2017.

CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. Tecnologia da panificação. vTrad. Carlos David Szlak. 2 ed. Editora Manole, Braueri, São Paulo, 2009.

CJAZABULSA, G. Non-coeliac Gluten Sensitivity- A new disease with gluten intolerance. Clinical Nutrition Poland. 2014.

CLERICI, M. T. P. S.; AIROLDI, C.; EL-DASH, A. Production of acidic extruded rice flour and its influence on the qualities of gluten-free bread. LWT Food Science and Technology, v. 42, n. 2, p. 618–623, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 28th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Joint FAO/WHO Food Standards Program, 28th Session, ALINORM 07/30/26-Rev., 2006.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Draft Revised Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten, Joint FAO/WHO Food Standards Program, 30th Session, ALINORM08/31/26 Appendix III, 2008.

CONSTANT, P. B. L.; CRUZ, R. S. Tecnologia de Panificação. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2017.

COULTATE, T.P. Food the Chemistry of its Components. The Royal Society of Chemistry, 4. ed., Cambridge: RSC Paperbacks, 2002. 448 p.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K., FENNEMA, O. R. Química de alimentos de fennema. São Paulo: Artmed, 2010.

DEMIRKESEN, I. et al. Rheological properties of gluten-free bread formulations. Journal of Food Engineering, v. 96, n. 2, p. 295-303, 2010.

DENIS, A.; BRAMBATI, N.; DESSAUVAGES, B.; GUEDJI, S.; RIDOUX, C. MEFFRE, N. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocolloids*, v. 22, n. 1, p. 989-994, 2008.

DIAS, A. R. G. COLUSSI, R.; ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L. M. *Ciência e Tecnologia de Panificação – Pelotas: Cópias Santa Cruz*, 2019. Vários autores. 324p. ISBN 978-85-479-0093-9.

Diretiva 67/548/CEE do Conselho, de 27 de junho de 1967, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas. Disponível em: < <https://publications.europa.eu/pt/publication-detail/-/publication/8e12a450-cb71-4356-bd3b-8a9f980208a0> >.

EL-DASH, A.; CABRAL, L.C.; GERMANI, R. *Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinha mista de trigo e soja na produção de pães*. Brasília: EMBRAPA, 1994.

EL-DASH, A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N.M. *Fundamentos da tecnologia de panificação*. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 400p.

EL-DASH, A.A. Standardized mixing and fermentation procedure for experimental baking test. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.55, n.4, p.436-446, 1978.

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

EMBRAPA. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes / editor técnico, Fábio Cesar da Silva – 2. Ed. Ver. Ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica*, 2009. 627 p.

ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 25, núm. 4, outubro-diciembre, 2005, pp. 802-806. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil

EVANGELHO, J. M.; PINTO, V. Z.; ZAVOREZE, E. R.; BARBOSA, L. M. P. Propriedades tecnológicas e nutricionais de pães preparados com diferentes proporções de farinha de arroz e farinha de arroz extrusada. *Revista Brasileira Agrociência*, Pelotas, v. 18, n. 4, p. 264-282, 2012.

FERREIRA, P. M.; ROBERTO, B. S. CAMISA, J.; Caracterização de aceitabilidade de barras de cereais enriquecidas de colágeno hidrolisado. *Rev. Virtual Quim.*, 2018, 10 (1), 155-171.

FERREIRA, S. M. R.; OLIVEIRA, P. V.; PRETTO, D. Parâmetros de qualidade de pão francês. *B. CEPPA*, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 301-318, jul/dez 2001.

FRANCO, V. A. Desenvolvimento de Pão Sem Gluten Com Farinha de Arroz e De Batata-Doce. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2015.

GARCÍA-SEGOVIA, P.; IGUAL, M.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Physicochemical properties and consumer acceptance of bread enriched with alternative proteins. *Foods Journal*, 9, 933, 2020. DOI:10.3390/foods9070933.

GOMEZ, M; RONDA, F.; BLANCO, C.A.; CABALLERO, P.A.; APESTEGUIA, A. Effects of dietary fibre on dough rheology and Bread quality. *European Food Research and Technology*, v.216, n.1, p.51-56, 2003.

GORHAM, J. Analysis of Indian corn. *Quarterly Journal of Science, Literature and the Arts*. 2:206-208, 1821.

GOUVEIA, P. F. Avaliação de contaminação por glúten em alimentos isentos de glúten comercializados em panificadoras. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

GRAÇA, C. S.; BARBOSA, J. B.; SOUZA, M. Z.; MOREIRA, A. S.; LUVIELMO, M. M.; MELLADO, M. M. S. Adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz. *Campinas*, v. 20, e2016105, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.10516>. ISSN 1981-6723.

GUSMÃO, T. A. S. Desenvolvimento de pão de forma sem glúten com farinha de arroz vermelho, enzima transglutaminase microbiana e prebiótico: avaliação tecnológica, sensorial e armazenabilidade. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Campina Grande, 2017.

GUTKOSKI, L. C.; NETO, R. J. Procedimento para teste laboratorial de panificação – Pão tipo forma. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.5, p.873-879, 2002.

HABOUBI, N.Y.; TAYLOR, S.; JONES, S. Coeliac disease and oats: a systematic review. *Postgraduate Medical Journal*. v.82, p.672-678, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2653911/> >. Acesso em 08 de fevereiro de 2018.

HAYATA, M.; ERTOP, M. H. Evaluation of microtextural properties of sourdough wheat bread obtained from optimized formulation using scanning electron microscopy and image analysis during shelf life. *J Food Sci Technol* (January 2018) 55(1):1–9. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2823-1>

HERA, E.; MARTINEZ, M.; GOMÉZ, M. Influence offlour particle size on quality of gluten-free rice bread. *LWT – Food Science and Technology*, v. 54, n. 1, p. 199-206, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos / coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KOHAJDOVÁ Z, KAROVIČOVÁ J, SCHMIDT Š. Lupin composition and possible use in bakery – a review. *Czech J Food Sci*, 29(3):203–211, 2011.

KOHMANN, L. M. Desenvolvimento de pão branco e integral livres de glúten e fortificados com cálcio e ferro. Monografia (Especialização em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LACERDA, L. D. Avaliação das propriedades físico-químicas de proteína isolada de soja, amido e glúten e suas misturas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LAWTON J.W. Viscoelasticity of zein-starch doughs. *Cereal Chem.* 69:351–55. 1992.

LEONEL, M. Processamento de batata: fécula, flocos, produtos de extrusão. Seminário Mineiro Sobre Processamento De Batatas, Pouso Alegre, Minas Gerais. Anais...Pouso Alegre: EPAMIG, 2005.

LIMA, C. C. Aplicação das Farinhas de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e Maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) no Processamento de Pães com Propriedades Funcionais. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MARIOTTI, M.; PAGANI, M. A.; LUCISANO, M. The role of buckwheat and HPMC on the breadmaking properties of some commercial gluten-free bread mixtures. *Food Hydrocolloids*, v. 30, n. 1, p. 393-400, 2013.

MARTÍNEZ, M. M.; MARCOS, P.; GÓMEZ, M. Texture development in gluten-free breads: effect of different enzymes and extruded flour. *Journal of Texture Studies*, v. 44, n. 6, p. 480-489, 2013.

MATOS, M. E.; ROSELL, C. M. Quality indicators of rice-based gluten-free bread-like products: relationships between dough rheology and quality characteristics. *Food Bioprocess Technology*, v. 6, p. 2331-2341, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0903-9>.

MENEZES, J. M. B.; ZAMBELLI, R. A.; CHINELATE, G. C. B.; RODRIGUES, M. C. P.; PONTES, D. F. Adição de colágeno hidrolisado na qualidade de farinha de trigo para a

produção de pães tipo forma. *Revista Brasileira de Agrotecnologia (Garanhus-PE-Brasil)* v.3, n.1, p. 10-22, jul-set, 2014.

MEZAIZE, S. et al. Optimization of gluten-free formulations for French-style breads. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 3, p. E140-146, 2009.

MIÑARRO, B.; ALBANELL, E.; AGUILAR, N.; GUAMIS, B.; CAPELLAS, M. Effect of legume flours on baking characteristics of glúten-free bread. *Journal of Cereal Science* 56, 2012, 476-481. DOI: 10.1016/j.jcs.2012.04.012.

MIÑARRO, B.; NORMAHOMED, I.; GUAMIS, B. CAPELLAS, M. Influence of unicellular protein on glúten-free bread characteristics. *European Food Research and Technology*, 2010, 231: 171-179. DOI: 10.1007/s00217-010-1269-8.

MOORE, M.M.; SCHOBER, T.J.; DOCKERY, P.; ARENDT, E.K. Textural comparisons of gluten-free and wheat-based doughs, batters, and breads. *Cereal Chemistry*, v.81, n.5, p.567-575, 2004.

NAGATA, C. L. P. Otimização de uma pré-mistura para pão de queijo. Tese de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras-Minas Gerais, 2011.

NASCIMENTO, A. B. Desenvolvimento de produto alimentício sem glúten elaborado a partir da percepção de consumidores celíacos. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014.

NOBRE, A. R. M. O. Utilização de farinha de quinoa no desenvolvimento de pães sem glúten. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, SP, 2015.

ONYANGO, C. et al. Creep-recovery parameters of gluten-free batter and crumb properties of bread prepared from pregelatinised cassava starch, sorghum and selected proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, n. 12, p. 2493-2499, 2009.

ONYANGO, C. et al. Batter rheology and bread texture of sorghum-based gluten-free formulations modified with native or pregelatinised cassava starch and α -amylase. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, n. 6, p. 1228-1235, 2010.

OSBORNE, T. Process of extracting zein. US patent 456,773, 1891.

O'SHEA N.; ARENDT, E. and GALLAGHER, E. State of the Art in Gluten Free Research. *Journal of Food Science* Vol. 79, Nr. 6, 2014.

PAPALIA, I. S.; LONDERO, P. M. G.; Extração de zeína e sua aplicação na conservação de alimentos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.45, n.2, p.552-559, fev, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131649>

PERESSINI, D.; PIN, M.; SENSIDONI, A. Rheology and breadmaking performance of rice-buckwheat batters supplemented with hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 3, p. 340-349, 2011.

PICO, J.; REGUILÓN, M. P.; BERNAL, J.; GÓMEZ, M. Effect of rice, pea, egg white and whey proteins on crust quality of rice flour corn starch based gluten-free breads. *Journal of Cereal Science* 86 (2019) 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.01.014>

PONGJARUVAT, W. et al. Influence of pregelatinised tapioca starch and transglutaminase on dough rheology and quality of gluten-free jasmine rice breads. *Food Hydrocolloids*, v. 36, p. 143-150, 2014.

ROLIM, P. M.; SALGADO, S. M.; PADILHA, V. M.; LIVERA, A. V. S.; GUERRA, N. B.; ANDRADE, S. A. C. Análise de componentes principais de pães de forma formulados com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.). *Revista Ceres, Viçosa*, v.57, n.1, p. 12-17, 2010.

SAKAČ, M. et al. Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flours. *Food Research International*, v. 44, n. 9, p. 2806-13, 2011.

SANT'ANA, R. C. O. Isolamento e identificação do perfil de zeínas do germoplasma tropical de milho para produção de cobertura comestível e biofilme. Tese de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais, 2012.

SANT'ANA, R. C. O., PAES, M. C. D., BARBOSA, N. A., PIRES, C. V., OLIVEIRA, M. G. de A. Novo Método de Extração de Zeína utilizando Agente Redutor Não Tóxico. XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Embrapa, agosto de 2012. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/72634/1/Novo-metodo.pdf> >.

SANTOS, S. M. M. Aceitabilidade sensorial e composição centesimal de pão de forma isento de glúten elaborado com biomassa de banana verde. São Luís: UFMA, 2014.

SAS. Statistical Analysis System. SAS OnDemand for Academics. Copyright © 2021, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Disponível em: < <https://welcome.oda.sas.com/login> >. Acesso em 02 de Agosto de 2021.

SCHEUER, P. M et al. Trigo: Características e utilização na panificação. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campo Grande, v. 13, n. 2, p.211222, 3 maio 2011.

SCHOBER T.J., BEAN S.R., BOYLE D.L., PARK S-H. Improved viscoelastic zein-starch doughs for leavened gluten-free breads: their rheology and microstructure. J. Cereal Sci. 48:755–67. 2008.

SCHOBER T.J., MOREAU R.A., BEAN S.R., BOYLE D.L. Removal of surface lipids improves the functionality of commercial zein in viscoelastic zein-starch dough for gluten-free breadmaking. J. Cereal Sci. 52:417–25. 2010.

SCIARINI, L. S. et al. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. Food and Bioprocess Technology, v. 3, n. 4, p. 577–585, 2010a.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M.; DE VOR, R.E. Solvent extraction of zein from dry-milled corn. Cereal Chem., v. 77, p. 724-730, 2000.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. Elsevier, *Industrial Crops and Products*, v.13, p.171-192, 2001. DOI: 10.1016/S0926-6690(00)00064-9.

SILVA, J. F. Desenvolvimento de mixes de panificação isentos de glúten a partir de subprodutos alimentares. Tese de mestrado. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res*, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

SINGH, J.; SINGH, N. Studies on the morphological, thermal and rheological properties of starch separated from some Indian potato cultivars. *Food Chemistry*, v.75, p.67-77, 2001.

SMITH, B. M.; BEAN, S. R.; SELLING, G.; SESSA, D.; ARAMOUNI, F. M. Effect of salt and ethanol addition on zein-starch dough and bread quality. *Journal of Food Science*. Vol. 82, Nr. 3, 2017. DOI: 10.1111/1750-3841.13637

SOARES, M. S. J.; BASSINELLO, P. Z.; LACERDA, D. B. C. L.; K, S. N.; GEBIN, P. F. C.; JUNQUEIRA, T. L.; GOMES, V. A. Características físicas e tecnológicas de pães elaborados com farelo de arroz torrado. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 29, n. 4, p. 815-828, out./dez. 2008.

SOSA, M.; CALIFANO, A.; LORENZO, G. Influence of quinoa and zein content on the structural, rheological, and textural properties of gluten-free pasta. *European Food Research and Technology* (2019) 245:343–353 <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3166-5>

STORCK, C. R. et al. Características tecnológicas de pães elaborados com farinha de arroz e transglutaminase. *Brazilian Journal of Technology*, v. II SSA, p. 71-77, 2009.

STORCK, C. R. et al. Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. *LWT – Food Science and Technology*, v. 53, n. 1, p. 346-354, 2013.

TORBICA, A.; HADNAĐEV, M.; DAPČEVIĆ, T. Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloids*, v. 24, n. 6-7, p. 626-32, 2010.

WIESER, H. Chemistry of Gluten proteins. *Food Microbiology* 24 115–119, Germany, 2006.

WOLTER, A.; HAGER, A. S.; ZANNINI E.; CZERNY, M.; ARENDT, E. K. Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads. *International Journal of Food Microbiology*, 172 (2014) 83–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.015>.

WRONKOWSKA, M.; HAROS, M.; SORAL-SMIETANA, M. Effect of starch substitution buckwheat flour on gluten-free bread quality. *Food Bioprocess Technology*, v. 6, p. 1820-1827, 2013.

ZANDONADI, R. P.; BOTELHO, R. B. A.; ARAÚJO, W. M. C. Psyllium as a substitute for gluten in bread. *Journal of American Dietetic Association*, v. 109, n. 10, p. 1781-1784, 2009.

ZANNINI E., JONES, J. M. RENZETTI, S. ARENDT, E. K. Functional Replacements for Gluten. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012. 3:227–45

ZIOBRO, R.; JUSZCZAK, L.; WITCZAK, M.; KORUS, J. Non-gluten proteins as structure forming agents in gluten free bread. *J Food Sci Technol*, January 2016. 53(1):571–580. DOI 10.1007/s13197-015-2043-5.