

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Efeito da adição de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* nas características tecnológicas e nutricionais de pães de farinha de arroz

Márcia Spadari Selmo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos

Prof.^a Dr.^a Myriam de las Mercedes Salas Mellado
Orientadora

Rio Grande – RS

2014

S468e

Selmo, Márcia Spadari.

Efeito da adição de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* nas características tecnológicas e nutricionais de pães de farinha de arroz / Márcia Spadari Selmo. – 2014.

126 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande/FURG,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dr^a. Myriam de las Mercedes Salas Mellado.

1. Transglutaminase. 2. Metilcelulose. 3. *Spirulina*. 4. Pães. 5. Farinha de arroz. 6. Características tecnológicas. 7. Avaliação nutricional. I. Salas Mellado, Myriam de las Mercedes. II. Título.

CDU 664

Catálogo na fonte: Bibliotecária Flávia Reis de Oliveira CRB10/1946

DEDICATÓRIA

Às minhas filhas Isabel e Luiza,
com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e saúde para estar aqui e atingir meus objetivos.

À minha família, principalmente ao meu marido e filhas pelo apoio e paciência durante estes três anos de estudo que por vezes tive pouco tempo para me dedicar a eles.

Aos meus colegas do CAVG, que me substituíram em minhas atividades docentes para que eu pudesse cursar o doutorado.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Myriam de las Mercedes Salas-Mellado, por sua confiança, orientação, dedicação e apoio.

A todos meus colegas e amigos do LTA, por toda ajuda com programas de computação, análises estatísticas, análises de laboratório ou simplesmente, pelas palavras de incentivo na hora certa.

À Sabrine, pelas orientações e contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

À Islanda, muito obrigada pelas infinitas solicitações atendidas, sempre com bom humor.

Aos professores do programa, que sempre estiveram prontos a me auxiliar no caso de dúvidas.

Às professoras Rosane Rodrigues, Miriam Machado e Leonor Souza-Soares pela colaboração no ensaio biológico.

À Universidade Feral do Rio Grande e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade de estar aqui.

RESUMO

A doença celíaca é uma enfermidade causada pela intolerância ao glúten, substância proteica presente no trigo e seus derivados. O controle desta doença é feito através da total restrição ao glúten, ou seja, os celíacos não podem consumir qualquer tipo de alimento que contenha farinha de trigo. A farinha de arroz é um bom substituto do trigo na elaboração de pães livres de glúten, no entanto, a farinha de arroz produz pães de pouco volume, pois não possui as mesmas características tecnológicas do glúten, principalmente para a elaboração de pães. Desta forma, vários aditivos têm sido usados para melhorar a qualidade dos pães feitos com farinha de arroz, dentre eles enzimas, gomas ou hidrocolóides, amidos modificados e outras fontes proteicas. Para aumentar o teor proteico e melhorar a qualidade nutricional dos pães, várias fontes proteicas podem ser usadas. A alga *Spirulina platensis* é muito estudada para uso na alimentação humana por apresentar um bom perfil nutricional, tornando-a ideal como suplemento alimentar, pois combina diversos constituintes como proteínas, vitaminas e minerais de maneira equilibrada. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição da metilcelulose, enzima transglutaminase e *Spirulina* na qualidade tecnológica e nutricional de pães de farinha de arroz. Para isso foi utilizado um delineamento central composto rotacional (DCCR) a fim de avaliar os efeitos tecnológicos da adição de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* nos pães de farinha de arroz. As respostas do planejamento possibilitaram definir concentrações adequadas destes aditivos para a obtenção dos pães A, B e C com boas características tecnológicas, que foram avaliados pela composição proximal e sensorialmente por teste de preferência. A avaliação sensorial dos pães de farinha de arroz mostrou que a preferência dos consumidores independe da quantidade de *Spirulina* adicionada ao pão. A enzima transglutaminase teve maior eficiência na formação de ligações cruzadas na massa fermentada dos pães de farinha de arroz quando foi utilizada a concentração de 0,6% (em base à farinha de arroz), mas a proteína da *Spirulina* não aumentou a formação de “rede”. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) das massas fermentadas dos pães foi verificado que a transglutaminase torna a microestrutura da massa mais compactada, enquanto que a proteína da *Spirulina* forma estruturas fibrosas na massa. A avaliação nutricional do pão de arroz com *Spirulina* através de ensaio biológico utilizando ratos *Wistar* mostrou que a adição de *Spirulina* (4% em base de farinha) não provocou aumento do valor proteico, mas o valor de coeficiente de eficiência alimentar (CEA) não diferiu da dieta controle com caseína.

Palavras-chave: transglutaminase, metilcelulose, *Spirulina*, pães, farinha de arroz, características tecnológicas, avaliação nutricional.

ABSTRACT

Celiac disease is an illness caused by intolerance to gluten which is a protein substance found in wheat and its derivatives. The control of this disease is made by complete restriction to gluten, in other words, celiac people cannot eat any food containing wheat flour. Rice flour is a good substitute for wheat in the preparation of gluten free breads, however, the rice flour produces low volume breads once it does not have the same technological characteristics of gluten, especially for the preparation of breads. Thus, various additives have been used to improve the quality of rice flour breads, including enzymes, hydrocolloids or gums, modified starches and other protein sources. To increase the protein content and improve the nutritional quality for the breads, various protein sources may be used. The alga *Spirulina platensis* is widely studied for the use as food for human because it has a good nutritional profile so it becomes an ideal feed supplement, since it combines various constituents such as protein, vitamins and minerals in a balanced way. The objective of this study is to evaluate the effect of adding methylcellulose, *Spirulina* and transglutaminase enzyme on technological and nutritional quality of rice flour breads. The Rotational Central Composite Design (RCCD) method was used to assess the technological effects of adding methylcellulose, transglutaminase and *Spirulina* in rice flour breads. Responses from planning made it possible to define appropriate concentrations of these additives to obtain the A, B and C breads with good technological characteristics that were evaluated by proximate composition and sensory by means of preference test. The sensory evaluation of rice flour breads showed that consumers' preference is independent of the amount of *Spirulina* added to bread. The transglutaminase enzyme was more efficient at the crosslinking established in the sourdough of rice flour breads when the concentration of 0.6% (rice flour based) was used, but the *Spirulina* protein did not increase the network formation. By scanning electron microscopy (SEM) of the fermented dough of breads was found out that the mass microstructure becomes more compacted due to the transglutaminase enzyme while the *Spirulina* protein forms fibrous structures in the mass. The nutritional evaluation of the *Spirulina* based rice bread made through a biological test using rats showed that the addition of *Spirulina* (4% on flour basis) resulted in no increase for the protein value, but the amount of Food Efficiency Ratio (FER) did not differ from the control diet.

Keywords: transglutaminase, methylcellulose, *Spirulina*, breads, rice flour, technological characteristics, nutritional assessment.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Formulação* do pão de farinha de arroz | 45 |
| Tabela 2 - Variáveis e níveis do delineamento experimental fatorial completo 2 ³ , utilizados para a elaboração dos pães de farinha de arroz | 47 |
| Tabela 3 - Matriz do delineamento experimental com valores codificados e reais (%)..... | 47 |
| Tabela 4 - Níveis das variáveis utilizadas para os pães de farinha de arroz definidos pelas respostas do planejamento experimental | 50 |
| Tabela 5 - Composição das dietas Controle, Aroteica, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com <i>Spirulina</i>)..... | 52 |
| Tabela 6 - Composição proximal da farinha de arroz e microalga <i>Spirulina</i> seca moída | 58 |
| Tabela 7 - Matriz do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2 ³ , com os valores reais e codificados das variáveis e a resposta quantidade de grupos amino livres na massa fermentada | 60 |
| Tabela 8 - Análise de variância para o parâmetro quantidade de grupos amino livres na massa fermentada | 61 |
| Tabela 9 - Valores de volume específico e firmeza do miolo dos pães de farinha de arroz dos ensaios do delineamento experimental | 63 |
| Tabela 10 - Análise de variância para a resposta volume específico dos pães..... | 64 |
| Tabela 11 - Análise de variância para a variável firmeza do miolo dos pães..... | 67 |
| Tabela 12 - Valores dos parâmetros de cor (L*, a*, b*, h° e C*) do miolo dos pães | 68 |
| Tabela 13 - Análise de variância para a variável luminosidade do miolo dos pães | 69 |
| Tabela 14 - Análise de variância para a variável a* do miolo dos pães | 71 |
| Tabela 15 - Análise de variância para a variável b* do miolo dos pães..... | 72 |
| Tabela 16 - Análise de variância para a variável h° do miolo dos pães..... | 74 |
| Tabela 17 - Análise de variância para a variável C* do miolo dos pães | 75 |
| Tabela 18 - Características tecnológicas e composição proximal de pães A, B e C de farinha de arroz | 81 |
| Tabela 19 - Resultado do teste de ordenação-preferência dos pães de farinha de arroz | 84 |
| Tabela 20 - Composição proximal das dietas Controle, Aroteica, PA (pão de arroz) PAS (pão de arroz com <i>Spirulina</i>)..... | 86 |
| Tabela 21 - Respostas ponderais e nutricionais de ratos <i>Wistar</i> alimentados com dieta C (controle), A (aproteica), PA (pão de arroz) e PAS (pão B de arroz com <i>Spirulina</i>), durante 14 dias de experimento | 86 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 22 - Composição de aminoácidos essenciais das dietas C (controle), PA (pão de arroz), PAS (pão de arroz com <i>Spirulina</i>) e Padrão FAO/WHO para crianças de 2 a 5 anos . | 89 |
| Tabela 23 - Escore químico, Digestibilidade proteica verdadeira e Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS) das dietas C (controle), PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com <i>Spirulina</i>) | 90 |
| Tabela 24 - Testes bioquímicos de glicemia e colesterol total no plasma do sangue de ratos alimentados com dieta C (controle), PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com <i>Spirulina</i>) | 91 |
| Tabela 25 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta grupos amino livres da massa fermentada - DCCR | 119 |
| Tabela 26 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta volume específico dos pães - DCCR | 119 |
| Tabela 27 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta firmeza do miolo dos pães - DCCR | 119 |
| Tabela 28 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta Luminosidade do miolo – DCCR | 120 |
| Tabela 29 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta coroma a* - DCCR..... | 120 |
| Tabela 30 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta coroma b* - DCCR | 120 |
| Tabela 31 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta Ângulo h° do miolo - DCCR..... | 121 |
| Tabela 32 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta cromaticidade do miolo - DCCR | 121 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Resultado de pesquisa da ACELBRA sobre preferência de produtos livres de glúten | 20 |
| Figura 2 - Reação de acil-transferência catalisada pela enzima transglutaminase | 34 |
| Figura 3 - Fluxograma do processamento dos pães de farinha de arroz | 46 |
| Figura 4 - <i>Pellets</i> das dietas Controle, Aprroteica, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com <i>Spirulina</i>) | 53 |
| Figura 5 - Curva de contorno para a resposta grupos amino livres ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de massa) em função da concentração de <i>Spirulina</i> e transglutaminase | 62 |
| Figura 6 - Curvas de contorno para o volume específico (mL/g) em função do teor de <i>Spirulina</i> e metilcelulose (a), transglutaminase e metilcelulose (b) e <i>Spirulina</i> e transglutaminase (c) | 65 |
| Figura 7 - Curvas de contorno para a luminosidade do miolo em função do teor de <i>Spirulina</i> e de metilcelulose (a), de transglutaminase e de metilcelulose (b) e de <i>Spirulina</i> e transglutaminase (c) | 70 |
| Figura 8 - Curvas de contorno para a coordenada b^* do miolo em função do teor de <i>Spirulina</i> e metilcelulose (a), transglutaminase e metilcelulose (b) <i>Spirulina</i> e transglutaminase (c) | 73 |
| Figura 9 - Curvas de contorno para a variável C^* do miolo em função do teor de <i>Spirulina</i> e metilcelulose (a), transglutaminase e metilcelulose (b) e <i>Spirulina</i> e transglutaminase (c) | 76 |
| Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada do pão A (2,2% metilcelulose, 0,2% transglutaminase; 4,0% <i>Spirulina</i>); pão B (1,5% metilcelulose, 0,2% transglutaminase; 4,0% <i>Spirulina</i>) e pão C (2,2% metilcelulose, 0,6% transglutaminase; 1,0% <i>Spirulina</i>) (lado esquerdo:x400; lado direito: x1000) | 78 |
| Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada do pão C com transglutaminase (1) e sem transglutaminase (2) (lado esquerdo:x400; lado direito: x1000) .. | 79 |
| Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada do pão B (B) e pão B sem <i>Spirulina</i> (BSS) (lado esquerdo:x400; lado direito: x1000) | 80 |
| Figura 13 - Fotografias das fatias dos pães A, B e C de farinha de arroz | 82 |
| Figura 14 - Fotografias dos pães A, B e C de farinha de arroz | 83 |
| Figura 15 – Percentual* de preferência dos pães A, B e C | 85 |
| Figura 16 - Ganho de peso dos ratos (média do grupo de 6 animais) dos grupos Controle, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com <i>Spirulina</i>) durante 14 dias de experimento | 87 |

Figura 17 - Consumo de dieta e de proteína pelos ratos *Wistar* dos grupos Controle, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com *Spirulina*) durante os 14 dias do experimento 88

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos | 17 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1. Doença celíaca | 18 |
| 3.2. Produtos livres de glúten..... | 20 |
| 3.3. Panificação..... | 22 |
| 3.3.1. Ingredientes usados na panificação..... | 23 |
| 3.3.1.1. Farinha de trigo | 23 |
| 3.3.1.2. Água..... | 24 |
| 3.3.1.3. Açúcar..... | 24 |
| 3.3.1.4. Sal (cloreto de sódio) | 24 |
| 3.3.1.5. Fermento Biológico..... | 25 |
| 3.3.1.6. Gordura..... | 25 |
| 3.3.1.7. Agentes oxidantes | 26 |
| 3.3.1.8. Emulsificantes..... | 26 |
| 3.3.1.9. Enzimas | 27 |
| 3.3.1.10.Outros | 27 |
| 3.3.2. Etapas do processo de panificação | 28 |
| 3.3.2.1. Mistura e Amassamento | 28 |
| 3.3.2.2. Fermentação principal..... | 28 |
| 3.3.2.3. Divisão e boleamento..... | 29 |
| 3.3.2.4. Descanso | 29 |
| 3.3.2.5. Modelagem..... | 29 |
| 3.3.2.6. Fermentação final..... | 30 |
| 3.3.2.7. Assamento | 30 |
| 3.3.2.8. Resfriamento..... | 30 |
| 3.3.3. Métodos de panificação | 31 |
| 3.4. Qualidade dos pães | 31 |
| 3.5. Arroz | 32 |
| 3.5.1. Farinha de arroz | 33 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.6. | Enzima transglutaminase | 34 |
| 3.6.1. | Mecanismo de ação..... | 35 |
| 3.6.2. | Uso da enzima transglutaminase em produtos livres de glúten | 35 |
| 3.7. | Melhoradores de textura | 37 |
| 3.8. | <i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira platensis</i>) e seus efeitos na saúde | 38 |
| 3.9. | Avaliação da qualidade proteica dos alimentos..... | 41 |
| 3.10. | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 43 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 4.1. | Matéria-prima, coadjuvantes, aditivos e ingredientes..... | 44 |
| 4.2. | Métodos | 44 |
| 4.2.1. | Obtenção da microalga <i>Spirulina</i> em pó | 44 |
| 4.2.2. | Caracterização da farinha de arroz..... | 44 |
| 4.2.3. | Caracterização da <i>Spirulina</i> | 45 |
| 4.2.4. | Elaboração dos pães de farinha de arroz | 45 |
| 4.2.5. | Delineamento experimental..... | 46 |
| 4.2.6. | Avaliações realizadas nas massas fermentadas e nos pães | 48 |
| 4.2.6.1. | Quantificação dos grupos amino livres na massa fermentada | 48 |
| 4.2.6.2. | Avaliação tecnológica dos pães | 48 |
| a) | Volume específico | 48 |
| b) | Firmeza do miolo..... | 48 |
| c) | Cor do miolo | 49 |
| 4.2.6.3. | Análise estatística do delineamento experimental | 49 |
| 4.2.7. | Definição de formulações baseando-se nas respostas do planejamento experimental | 49 |
| 4.2.7.1. | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das massas fermentadas dos pães A, B e C | 50 |
| 4.2.7.2. | Avaliação tecnológica dos pães A, B e C | 50 |
| 4.2.7.3. | Composição proximal dos pães A, B e C | 50 |
| 4.2.7.4. | Análise estatística da avaliação dos pães A, B e C | 51 |
| 4.2.8. | Avaliação sensorial dos pães de farinha de arroz A, B e C | 51 |
| 4.2.8.1. | Análise estatística da avaliação sensorial..... | 51 |
| 4.2.9. | Avaliação nutricional do pão de farinha de arroz com <i>Spirulina</i> na resposta biológica de ratos Wistar | 52 |
| 4.2.9.1. | Preparo das dietas..... | 52 |

| | |
|---|----|
| 4.2.9.2. Ensaio biológico | 53 |
| 4.2.9.3. Indicadores biológicos..... | 55 |
| a) Razão proteica líquida (NPR)..... | 55 |
| b) Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)..... | 55 |
| c) Digestibilidade proteica aparente e verdadeira | 55 |
| d) Escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCAAS)..... | 56 |
| 4.2.9.4. Análises bioquímicas do sangue | 57 |
| 4.2.9.5. Análise estatística da avaliação nutricional | 57 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| 5.1. Caracterização da farinha de arroz e da microalga <i>Spirulina</i> | 58 |
| 5.2. Respostas do delineamento experimental | 59 |
| 5.2.1. Quantificação de grupos amino livres na massa fermentada | 59 |
| 5.2.2. Avaliação tecnológica dos pães | 63 |
| 5.2.2.1. Volume específico | 64 |
| 5.2.2.2. Firmeza do miolo | 66 |
| 5.2.2.3. Parâmetros de cor do miolo..... | 67 |
| a) Luminosidade (L*) do miolo..... | 68 |
| b) Croma a* do miolo..... | 70 |
| c) Croma b* do miolo | 72 |
| d) Ângulo de matiz (h°) do miolo | 74 |
| e) Saturação ou Cromaticidade (C*) do miolo | 75 |
| 5.3. Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada dos pães | 77 |
| 5.4. Avaliação tecnológica e composição proximal dos pães A, B e C de farinha de arroz..... | 80 |
| 5.5. Avaliação sensorial dos pães A, B e C de farinha de arroz..... | 84 |
| 5.6. Avaliação nutricional dos pães de farinha de arroz adicionados de <i>Spirulina</i> | 85 |
| 5.6.1. Composição proximal das dietas | 85 |
| 5.6.2. Indicadores biológicos | 86 |
| 5.6.3. Composição de aminoácidos das dietas comparadas ao padrão FAO/WHO e PDCAAS..... | 89 |
| 5.6.4. Testes bioquímicos de glicemia e colesterol total | 90 |
| 6. CONCLUSÕES | 93 |
| 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 95 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 96 |

| | |
|----------------------------|------------|
| 9. ANEXOS | 112 |
| 10. APÊNDICES | 114 |

1. INTRODUÇÃO

O pão é um dos alimentos mais consumidos e apreciados pelas populações sendo tradicionalmente elaborado a partir da farinha de trigo. O diagnóstico de doença celíaca em diferentes segmentos da população gera a procura por produtos isentos de trigo que possuam boa qualidade e aceitabilidade, principalmente para os portadores da patologia.

A doença celíaca (DC) é uma enfermidade causada pela intolerância permanente à ingestão do glúten, presente em cereais como trigo, aveia, centeio e cevada. A DC afeta indivíduos geneticamente suscetíveis, provocando um processo inflamatório que altera a mucosa do intestino delgado, causando atrofia das vilosidades e má absorção de nutrientes (SDEPANIAN; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999; SILVA; FURLANETTO, 2010).

O glúten é a fração proteica constituída pelas classes das glutelinas e prolaminas após hidratação. No trigo, o glúten é formado pelas gliadinas (prolaminas) responsáveis pela coesão da massa e pelas gluteninas (glutelinas), responsáveis pela resistência à extensão da massa. Estas proteínas juntas formam o complexo proteico que confere propriedades viscoelásticas únicas aos produtos de panificação, principalmente em se tratando do pão (STEFANO; DAL BELLO; ARENDT, 2008).

O pão é um produto obtido a partir do trigo ou outro cereal, cujas características são promovidas pela fermentação alcoólica realizada por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O processo de fermentação exige uma massa bastante elástica e resistente para reter os gases produzidos durante a fermentação, produzindo pães de boa qualidade, e isso só é possível pela presença do glúten na massa.

Pesquisas realizadas pela ACELBRA (Associação dos Celíacos do Brasil) mostram que 47% dos celíacos têm preferência por encontrar pães sem glúten (ASSOCIAÇÃO DOS CELÍACOS DO BRASIL, 2012). Existem no mercado vários produtos isentos de glúten, entretanto, a sua qualidade ainda está longe de ser igualada ao pão com farinha de trigo.

A substituição da farinha de trigo por outros ingredientes capazes de formar uma rede proteica para reter o gás carbônico produzido na fermentação do pão tem sido bastante estudada (BLANCO et al., 2011; CLERICI; EL-DASH, 2006; FIGUEIRA et al., 2011; FIGUEIRA, 2010; GALLAGHER; GORMLEY; ARENDT, 2004; GUJRAL; ROSELL, 2004; MARCO; ROSELL, 2008a; MOORE et al., 2006; SIVARAMAKRISHNAN; SENGE; CHATTOPADHYAY, 2004; STORCK et al., 2009).

A farinha de arroz tem sido muito utilizada em substituição à farinha de trigo, principalmente na elaboração de pães livres de glúten, por sua cor e sabor suave, ampla faixa

de teor de amilose, propriedades nutricionais e hipoalergênicas. No entanto, a massa elaborada com farinha de arroz tem capacidade limitada de reter os gases durante o processamento de pães, pois não possui características viscoelásticas relevantes, produzindo pães de baixo volume específico (STORCK et al., 2009). Para melhorar a qualidade de pães feitos com farinha de arroz vários ingredientes podem ser adicionados, como gomas, amidos modificados, outras fontes proteicas e enzimas modificadoras da rede proteica.

A enzima transglutaminase vem sendo usada com sucesso em produtos livres de glúten por sua capacidade de formar rede proteica, através da promoção de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina, convertendo proteínas solúveis em polímeros insolúveis (LARRÉ et al., 2000). Isso faz com que a massa tenha maior elasticidade e viscosidade, melhorando a capacidade de retenção de gases durante a fermentação. No entanto, o uso de gomas ainda é necessário para melhorar o volume do pão e compensar a ausência da rede de glúten (CLERICI; EL-DASH, 2006; STEFANO; DAL BELLO; ARENDT, 2008).

As gomas ou hidrocolóides são muito utilizados na tecnologia de alimentos e têm como funções contribuir na melhoria da textura, retardo da retrogradação do amido, aumento da retenção de umidade, visando a melhoria da qualidade geral dos produtos de panificação, principalmente nos produtos livres de glúten. A metilcelulose (MC) tem propriedades funcionais que são vantajosas em produtos de panificação, particularmente em alimentos feitos de farinha de arroz, milho e centeio, que são de baixo teor ou isentas de glúten (PANDA, 2010).

Segundo Cauvain (2009), a adição de uma fonte proteica é útil no ajuste da massa quando se elabora um pão sem trigo, impedindo o colapso do produto. A microalga *Spirulina*, comercializada como suplemento na alimentação humana pode ser usada em pães isentos de glúten usando a farinha de arroz, visando aumentar o valor nutricional e melhorar a textura dos pães.

No caso dos celíacos, os quais necessitam de complementação nutricional devido à má absorção de nutrientes pelo intestino delgado, a microalga *Spirulina* pode ser usada para aumentar o valor proteico além de fornecer vitaminas e minerais aos pães isentos de glúten feitos com farinha de arroz. Existem muitos estudos realizados para a obtenção de pães feitos com farinha de arroz suplementados com diversas fontes proteicas, visando melhorar a qualidade tecnológica e o valor nutricional, no entanto, não existem trabalhos avaliando a qualidade nutricional de pães de farinha de arroz utilizando como fonte proteica a microalga *Spirulina*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da adição da metilcelulose, enzima transglutaminase e *Spirulina* na qualidade de pães sem glúten elaborados com farinha de arroz.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da enzima transglutaminase na massa fermentada dos pães;
- Avaliar as características tecnológicas de pães de farinha de arroz;
- Caracterizar físico-quimicamente pães de farinha de arroz;
- Determinar a preferência sensorial entre pães de farinha de arroz;
- Observar através da microscopia eletrônica de varredura a estrutura de massas fermentadas dos pães de farinha de arroz;
- Avaliar o efeito da adição de *Spirulina* no valor nutricional de pães de farinha de arroz, através de ensaio biológico utilizando ratos como modelo experimental.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doença celíaca

A clássica descrição da doença celíaca (DC) foi feita em 1888, por Samuel Gee sob a denominação de “afecção celíaca”, relatando as seguintes características: “indigestão crônica encontrada em pessoas de todas as idades, especialmente em crianças entre 1 e 5 anos” (AURICCHIO; TRONCONE, 1996; PAVELEY, 1988). A DC é definida como um estado permanente de sensibilidade ao glúten, composto proteico encontrado nos cereais, trigo, centeio, cevada e aveia, que provoca atrofia da mucosa do intestino delgado e consequente má absorção dos alimentos (SDEPANIAN et al., 2001). As proteínas deletérias presentes no glúten são a gliadina do trigo, hordeína da cevada, secalina do centeio e, possivelmente, a avidina presente na aveia (GONÇALVES, 2013). Segundo Sdepanian et al. (2001), caso o celíaco ingira esses alimentos sofrerá consequências gastrointestinais e nutricionais, podendo ocorrer perda de peso e apresentar sintomas associados à deficiência de vitaminas e minerais.

A DC ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis e se manifesta como uma enteropatia imunomediada, com sintomas gastrointestinais e não gastrointestinais (HILL et al., 2005). A DC clássica é o padrão mais frequente e manifesta-se nos primeiros anos de vida, com quadros clínicos de diarreia crônica, vômitos, irritabilidade, anorexia, emagrecimento, déficit de crescimento, dor e distensão abdominal, diminuição do tecido celular subcutâneo, comprometimento variável do estado nutricional, palidez por anemia ferropriva e atrofia da musculatura glútea (SILVA et al., 2006). Embora essa seja a forma mais frequente da doença, as formas atípicas e assintomáticas vêm sendo mais relatadas. As manifestações clínicas da DC podem envolver, além do trato gastrointestinal, a pele, o fígado, o sistema nervoso, o sistema reprodutivo, os ossos e o sistema endócrino (SILVA; FURLANETTO, 2010).

A doença também está associada a inúmeras enfermidades do tipo autoimunes e não autoimunes. Em várias delas a sensibilidade à gliadina já foi comprovada e em outras parece estar implicada. Por considerar que o glúten desempenha papel mais importante do que se pensava na gênese dessas doenças, alguns autores referem-se a esse grupo como doenças associadas ao glúten, sendo a redução dos sintomas com a retirada do glúten da dieta o fator unificador (OLIVEIRA, 2007).

A European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition considerou critérios fundamentais para o diagnóstico da DC: 1) presença de atrofia vilositária com hiperplasia

críptica e superfície anormal do epitélio, quando há ingestão de quantidades normais de glúten; 2) recuperação clínica total após a retirada do glúten da dieta; 3) presença de anticorpos antigliadina, anti-reticulina e antiendomísio da classe IgA no momento do diagnóstico, e seu desaparecimento com dieta livre de glúten (SILVA et al., 2006).

A partir da década de 1990, houve um significativo aumento do número de estudos sobre a DC e ela passou a ser um problema global de saúde (CATALDO et al., 2004). Atualmente a DC é comum em todo o mundo, afetando cerca de uma para cada 100 ou 300 pessoas, sendo que frequentemente não ocorrem sintomas gastrointestinais, fazendo com que haja mais casos não diagnosticados do que diagnosticados (KOTZE, 2006).

Estudos epidemiológicos realizados na Europa, na América do Sul, na Austrália e nos EUA, mostram que a DC é uma das doenças crônicas de maior prevalência na infância (BAPTISTA, 2006). Após a confirmação da doença através de testes sorológicos e biópsia do intestino delgado, o único tratamento da DC é basicamente dietético e baseia-se na exclusão do glúten da dieta, durante toda a vida, tanto dos indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos, devendo atender às necessidades nutricionais do paciente de acordo com a idade. Os cereais que contém glúten poderão ser substituídos pelo milho (farinha de milho, amido de milho, fubá), arroz (farinha de arroz), batata (fécula de batata) e mandioca (farinha de mandioca e polvilho) (SDEPANIAN; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999).

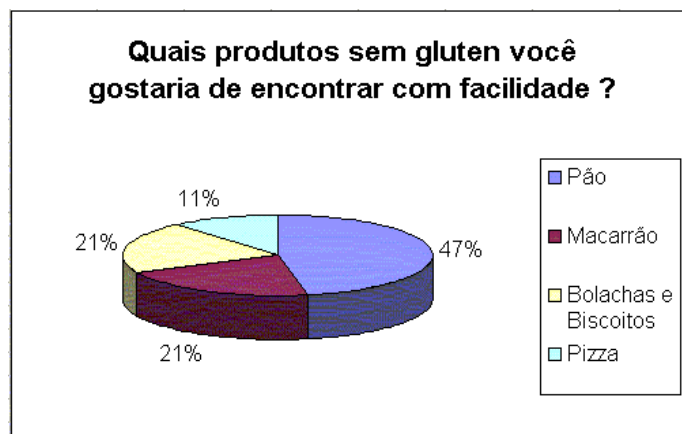
A quantidade máxima permitida de gliadinas nos alimentos para que sejam considerados isentos de glúten de acordo com a Comissão do *Codex Alimentarius* é de 10 mg de gliadinas/100 g de alimento, o que equivale a 200 ppm de glúten. Contudo alguns investigadores consideram este nível elevado para proteger a população susceptível. Segundo a Comissão do Codex, a ingestão de 10 mg gliadina/dia não deve ser ultrapassada por grupos susceptíveis (SDEPANIAN et al., 2001).

No Brasil, para garantir a prática da dieta isenta de glúten, em 1992 foi promulgada a Lei Federal número 8.543, que determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de alertar as pessoas portadoras da doença celíaca ou síndrome celíaca (BRASIL, 1992). Em 8 de fevereiro de 2002, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adotou a Resolução RDC nº 40, que obriga que todos os alimentos e bebidas que contenham glúten tragam a inscrição *contém glúten*, padronizando a advertência nos rótulos (BRASIL, 2002a). E a lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003 determinou que todos os alimentos industrializados contenham em seus rótulos e embalagens obrigatoriamente a inscrição *contém glúten* ou *não contém glúten*, conforme o caso (BRASIL, 2003).

Nos Estados Unidos, somente em agosto de 2013, a FDA promulgou uma normativa que define o termo “sem glúten” para a rotulagem de alimentos. Esta normativa garante ao consumidor, principalmente os celíacos, que os alimentos com a indicação “sem glúten” nos rótulos, possuam quantidade inferior a 20 ppm de glúten, sendo este o nível mais baixo que pode ser detectado com segurança em alimentos por métodos de análise validados cientificamente (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013).

Pesquisa realizada pela ACELBRA (Associação dos Celíacos do Brasil) mostrou que o pão isento de glúten é o produto que os celíacos gostariam de encontrar com maior facilidade, representando 47% da preferência, seguido pelo macarrão, bolachas e biscoitos, como mostra a Figura 1 (ASSOCIAÇÃO DOS CELÍACOS DO BRASIL, 2012).

Figura 1- Resultado de pesquisa da ACELBRA sobre preferência de produtos livres de glúten



Fonte: ACELBRA, 2012

A oferta de produtos isentos de glúten para o público celíaco ainda é pequena, principalmente fora dos grandes centros urbanos, além disso, a sua qualidade está longe de ser igualada aos produtos preparados a partir da farinha de trigo.

3.2. Produtos livres de glúten

Segundo Cauvain (2009), é possível elaborar produtos com características dos pães de farinha de trigo usando misturas de outros cereais, a partir das propriedades de gelatinização de seus amidos criando uma estrutura aerada semelhante à do pão de trigo. Mesmo assim, ainda seria necessário o uso de substâncias capazes de estabilizar as bolhas de ar, devido à falta de capacidade de retenção do gás pelas proteínas presentes.

A substituição da farinha de trigo por outros ingredientes capazes de formar uma rede proteica para reter o gás carbônico produzido na fermentação do pão tem sido investigada e testada (BLANCO et al., 2011; CLERICI; EL-DASH, 2006; MARCO; ROSELL, 2008a; SHIH et al., 1999; SHIN; GANG; SONG, 2010; SIVARAMAKRISHNAN; SENGE; CHATTOPADHYAY, 2004; STORCK et al., 2009).

O uso de amidos ou farinhas de cereais como arroz, sorgo, ou milho tem sido apresentado na literatura para a elaboração de pães livres de glúten e vários estudos têm sido feitos para melhoria das formulações e procedimentos originais (BLANCO et al., 2011; CAPRILES; ARÊAS, 2011; CÉSAR et al., 2006; MEZAIZE et al., 2009; MOORE et al., 2006; STORCK et al., 2009). Assim, o desenvolvimento de produtos livres de glúten exige o uso de aditivos como hidrocolóides, enzimas, produtos lácteos e outras proteínas sem glúten para melhorar sua estrutura, volume, sabor e aceitabilidade (GALLAGHER; GORMLEY; ARENDT, 2004).

Clerici e El-Dash (2006) produziram pães livres de glúten com volumes aceitáveis, além de textura e coloração semelhantes aos pães de trigo, utilizando 10 g de pasta cozida de arroz para cada 100 g de farinha de arroz.

César et al. (2006) desenvolveram uma fórmula de pão de forma substituindo a farinha de trigo por creme de arroz e polvilho doce e azedo que apresentou características satisfatórias de textura, sabor e aparência global.

Mezaize et al. (2009) desenvolveram uma formulação ideal para pão livre de glúten tipo francês, usando farinha de arroz e milho, além de amidos de milho e batata. Eles testaram primeiramente o efeito de quatro hidrocolóides (carboximetilcelulose (CMC), goma guar, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e goma xantana) e em um segundo estágio três diferentes fontes proteicas (farinha de trigo sarraceno, ovo em pó e soro de leite) foram usadas em adição à goma guar. A melhor formulação obtida no estudo foi aquela com 1,9% de goma guar e 5% de farinha de trigo sarraceno.

Almeida (2011) apresentou em sua tese, o desenvolvimento de uma formulação de pão de forma sem glúten à base de farinha de arroz. Das 50 formulações estudadas, a melhor foi aquela que utilizou farinha de arroz, fécula de mandioca, albumina de ovo acidificada e desidratada e o hidrocolóide carboximetilcelulose. A farinha de arroz combinada com os demais ingredientes mostrou-se uma boa base de formulação. A fécula de mandioca modificada promoveu consistência e coesividade à massa, enquanto que a albumina de ovo acidificada e desidratada substituiu o glúten, sendo a responsável pelo crescimento da massa.

O hidrocolóide carboximetilcelulose foi adicionado à receita, contribuindo como espessante, promovendo a absorção de água e o aumento da viscosidade da massa.

Segundo Alvarenga et al. (2011), o hidrocolóide agar-agar usado com farinhas de arroz, milho e tapioca, pode formar uma matriz para imitar o glúten na elaboração de produtos de panificação, devido ao seu arranjo estrutural e propriedades de ligação com a água.

Blanco et al. (2011) estudaram o enriquecimento de pães livres de glúten com aditivos alimentícios ácidos como o ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico e fosfato monossódico, visando melhorar a qualidade da formulação de pães de farinha de arroz com o hidrocolóide hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). A formulação de pães com fosfato monossódico aumentou o volume e melhorou a aparência, odor, sabor e textura dos pães livre de glúten.

Pereira et al. (2013) avaliaram físico-quimicamente e sensorialmente pães de batata isentos de glúten enriquecidos com farinha de chia, onde a farinha de trigo foi substituída por creme de arroz e fécula de batata. Neste estudo foi mostrado que o pão de batata com substituição da base amilácea por 25% de farinha de chia, apresentou aumento no seu valor nutricional e boa aceitação pelos consumidores.

3.3. Panificação

O processo tecnológico de elaboração dos pães baseia-se na fermentação alcoólica produzida por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que convertem o açúcar em gás carbônico (CO₂) o qual juntamente com o vapor de água produzido no forno durante o aquecimento, provocam a expansão da massa (PAVANELLI, 2000).

Os pães são produtos obtidos da farinha de trigo e ou outras farinhas, adicionados de líquidos, resultantes do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem os produtos (BRASIL, 2005).

Os ingredientes usados na elaboração dos pães são basicamente: farinha de trigo, água, fermento biológico e sal (cloreto de sódio). Entretanto, outros componentes como gordura vegetal, açúcares, emulsificantes, agentes oxidantes e enzimas são adicionados em pequenas quantidades para melhorar as características da massa durante o processamento e do produto final (MATUDA, 2004).

3.3.1. Ingredientes usados na panificação

A farinha e a água são os ingredientes mais importantes de uma formulação de pão, afetando a textura do miolo. A farinha é sempre considerada como 100% e o restante dos ingredientes uma porcentagem do valor da farinha em peso (ARPITA MONDAL, 2008).

3.3.1.1. Farinha de trigo

A farinha de trigo, matéria-prima mais utilizada para a elaboração de diversos alimentos como pães, biscoitos, bolos e massas, é o produto obtido a partir da espécie *Triticum aestivum* ou de outras espécies do gênero *Triticum* conhecidas (BRASIL, 2005). A farinha de trigo é composta de amido (70 a 75%), água (12 a 14%), proteínas (8 a 16%) e outros constituintes (MORITA et al., 2002). A presença das proteínas formadoras do glúten é que tornam a farinha de trigo a mais apropriada à elaboração de produtos de panificação, pois a rede proteica formada pelo glúten promove a retenção do dióxido de carbono produzido durante o processo de fermentação (GOESAERT et al., 2005). As proteínas do trigo estão divididas em proteínas solúveis e proteínas de reserva, as quais formam o glúten (SGARBIERI, 1996).

O glúten é uma massa viscoelástica formada a partir da mistura das proteínas gliadina (prolaminas) e glutenina (glutelinas) presentes na farinha de trigo quando adicionada a água. A gliadina é responsável pela viscosidade da massa e não é elástica, enquanto que a glutenina é elástica, porém não viscosa (FENNEMA, 2010). O trigo é o único cereal que tem as frações de gliadina e de glutenina em proporções adequadas à formação da rede de glúten durante a obtenção da massa (ARAÚJO et al., 2009). Este fato justifica a dificuldade em se substituir o trigo na elaboração de pães.

Em geral, as farinhas destinadas à elaboração de pães, são ricas em glúten, enquanto farinhas próprias para a elaboração de bolos apresentam baixos teores. O desenvolvimento de glúten afeta a textura dos produtos de panificação. A elasticidade do glúten é proporcional ao seu conteúdo de gluteninas com pesos moleculares baixos, porque essa fração contém a preponderância dos átomos de enxofre responsáveis pela ligação cruzada na rede (ALVARENGA et al., 2011).

A farinha de trigo pode ser classificada quanto à qualidade do glúten para panificação em: muito boa (Índice de Glúten > 90), boa (90 > Índice de Glúten > 60), média (60 > Índice de Glúten > 40) e fraca (Índice de Glúten < 40) (BIONDI, 2003).

No Brasil, toda farinha de trigo deve ser enriquecida com ácido fólico e ferro, conforme a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Essa medida visa auxiliar a redução de problemas de saúde como a anemia ferropriva e as doenças de má formação fetal do tubo neural (BRASIL, 2002b).

3.3.1.2. Água

A água, depois da farinha, é o ingrediente mais utilizado nas formulações de pão, em termos de quantidade. Pode ser usada em concentrações que variam de 50 a 75% (ARPITA MONDAL, 2008). Ela hidrata as proteínas da farinha de trigo tornando possível a formação da rede de glúten (PAVANELLI, 2000). Sua utilização determina a consistência da massa e executa um papel muito importante na gelatinização do amido, contribuindo para a elasticidade e textura do pão. Sua temperatura é geralmente alterada para controlar a temperatura final da massa, conforme as necessidades de cada processo (SLUIMER, 2005).

Nos pães isentos de glúten, a massa é geralmente mais cremosa que a produzida com farinha de trigo, semelhante a uma massa de bolo onde não há o desenvolvimento do glúten (CAUVAIN, 2009).

3.3.1.3. Açúcar

O açúcar é um elemento muito importante nas formulações por duas razões principais: serve como fonte de carboidratos fermentáveis para as leveduras e contribui para melhorar o sabor, o aroma e a cor do pão (PAVANELLI, 2000).

O açúcar reage com os aminoácidos presentes, através da reação de Maillard, influenciando na coloração e aroma do pão assado. Além disso, os açúcares adicionados melhoram a conservação do pão, pois permitem melhor retenção da umidade, mantendo por mais tempo seu frescor e retardando o processo de endurecimento (QUAGLIA, 1991).

3.3.1.4. Sal (cloreto de sódio)

O sal atua principalmente na formação do glúten, já que a gliadina tem menor solubilidade em água salgada, deixando a massa obtida com maior quantidade de glúten. (QUAGLIA, 1991). Além disso, tem a função de controlar a fermentação e a atividade de água, atuando diretamente na vida útil do produto; contribui para o aroma e o sabor do pão;

relaciona-se com as propriedades reológicas da massa, pois o sal aumenta a resistência à extensão do glúten. A quantidade de sal geralmente adicionada aos pães salgados é de 1 a 2% em base de farinha (SLUIMER 2005; ESTELLER, 2004).

3.3.1.5. Fermento Biológico

O fermento biológico é composto por uma levedura denominada *Saccharomyces cerevisiae*, cujo papel principal é fazer a conversão dos açúcares fermentáveis presentes na massa a gás carbônico (CO₂) e etanol. Além de produzir CO₂, que é responsável pelo crescimento do pão, o fermento também exerce influência sobre as propriedades reológicas da massa, tornando-a mais elástica (PAVANELLI, 2000).

O fermento biológico pode se apresentar na forma seca ou fresca. O fermento biológico fresco é o mais utilizado pelas panificadoras e possui 75% de umidade e por essa razão deve ser mantido sob refrigeração para sua conservação. O fermento biológico seco possui umidade inferior a 8% e equivale a 1/3 da quantidade do fermento biológico fresco (QUAGLIA, 1991). O fermento biológico seco pode ser utilizado nos pães em concentrações que variam de 1 a 5% (PHILIPPI, 2003).

3.3.1.6. Gordura

A gordura é um ingrediente opcional na produção dos pães. Quando utilizada, a gordura atua como lubrificante da massa, como melhorador da cor e do sabor, além de enriquecer nutricionalmente o produto (ESTELLER, 2004). Pode ser de origem vegetal (soja, palma, milho etc.) ou animal (banha ou manteiga). Dependendo da concentração utilizada, as gorduras conferem aumento em torno de 10% do volume do pão. As gorduras também tornam a massa mais macia, melhorando a textura do miolo e contribuindo para retardar o envelhecimento do pão (PAVANELLI, 2000).

Os lipídios incorporados na matriz de proteica interagem com as proteínas durante a mistura da massa e contribuem para as propriedades viscoelásticas da rede de glúten, necessárias para a expansão e retenção de gás (DEMIRALP; CELIK; KÖKSEL, 2000).

3.3.1.7. Agentes oxidantes

Segundo Pavanelli (2000), os agentes oxidantes atuam diretamente sobre a estrutura das proteínas do glúten, reforçando a rede de glúten através da formação de ligações dissulfídicas. Estas ligações formadas afetam a reologia da massa, aumentando a resistência à extensão e diminuindo a extensibilidade. Como consequência direta da ação reforçadora dos oxidantes sobre o glúten, a capacidade de retenção de gases é aumentada, o que resulta em pães com maior volume. Os agentes oxidantes também aumentam o “oven-rise”, ou salto de forno, que é o aumento rápido de volume que ocorre nos primeiros minutos após a massa entrar no forno.

O ácido ascórbico é um agente oxidante que fortalece a rede de glúten através da criação de ligações dissulfídicas, responsável pelo aumento no tamanho do pão nos primeiros minutos de assamento (NAKAMURA; KURATA, 1997).

3.3.1.8. Emulsificantes

A adição de emulsificantes é importante para a panificação industrial, pois confere uma maior resistência à massa para suportar manuseio na máquina, melhora a taxa de hidratação, a estrutura do miolo, a característica de corte, a capacidade de retenção de gás e aumenta a vida útil (ARPITA MONDAL, 2008).

Os emulsificantes comerciais apresentam uma mistura de mono e diglicerídeos, sendo obtidos a partir de uma interesterificação de triglicerídeos com glicerina, ou a partir da esterificação direta com ácidos graxos (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2008).

Os emulsificantes são divididos em duas classes: os que formam complexos com o amido, favorecendo a maciez do miolo e prevenindo o envelhecimento, como por exemplo os monoglicerídeos; e os que atuam na interação de proteínas, fortalecedores de massa que aumentam a habilidade do glúten de formar um filme que retém o gás produzido pelas leveduras, como por exemplo, o SSL (Estearoil-2-lactil lactato de sódio) e o CSL (Estearoil-2-lactil lactato de cálcio) (MATUDA, 2004).

3.3.1.9. Enzimas

O efeito das enzimas na qualidade de produtos de panificação está relacionado com sua capacidade de alterar a reologia da massa e portanto, influenciar as operações de moldagem e processamento (OWENS, 2001).

A enzima alfa-amilase atua sobre as moléculas de amilose e amilopectina, quebrando-as em cadeias menores, enquanto que a beta-amilase ataca somente as extremidades das cadeias de amilose e amilopectina, formando moléculas de maltose (MATUDA, 2004). A maioria das farinhas contém um nível natural adequado de beta-amilase, enquanto que o de alfa-amilase deve ser ajustado, assegurando o nível ideal de açúcar para as leveduras durante o processo de fermentação (WILLIAMS; PULLEN, 2009).

As enzimas proteases catalisam reações de hidrólise do glúten enfraquecendo sua rede e provocando um aumento da extensibilidade e viscoelasticidade da massa o que resulta em aumento de volume, uniformidade da crosta e maciez do pão (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010)

As hemicelulases são enzimas que tem efeito de modificar as pentosanas do trigo, resultando em uma massa com melhores propriedades de manejo e mais extensível. O pão assado apresenta maior volume e estrutura celular mais fina, o que torna o miolo mais claro e macio (WILLIAMS; PULLEN, 2009).

As lipases são enzimas importantes na melhoria da qualidade dos pães, pois provoca hidrólise dos lipídios da massa gerando agentes emulsificantes que reduzem a tendência à retrogradação do amido e conseqüentemente o envelhecimento do pão (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010)

3.3.1.10. Outros

Nos produtos panificados isentos de glúten deve-se buscar formas alternativas para reter e estabilizar as bolhas de gás. Ingredientes como gomas, estabilizantes e amido pré-gelatinizado podem ser usados para proporcionar a oclusão do gás e estabilização da massa. A adição de uma fonte proteica de certos cereais também é útil no ajuste da massa do pão isento de glúten, impedindo o seu colapso (CAUVAIN, 2009).

3.3.2. Etapas do processo de panificação

As etapas do processo de panificação podem variar dependendo do tipo de pão que se deseja produzir, maquinário e método de panificação utilizado.

3.3.2.1. Mistura e Amassamento

A mistura consiste em homogeneizar os ingredientes, dispersar, solubilizar e hidratar uniformemente os componentes da massa. O trabalho mecânico contribui para o desenvolvimento da estrutura do glúten e incorpora bolhas de ar, assim uma mistura heterogênea e espessa de água e farinha é convertida em uma massa viscoelástica homogênea de aspecto seco (MARSH e CAUVAIN, 2009).

Nas massas elaboradas com farinha de trigo, a formação do glúten acontece em diferentes estágios: no primeiro, as moléculas de proteína são hidratadas e as suas fibrilas aderem umas às outras, formando uma rede desorganizada de fios espessos. A ação mecânica torna os fios mais finos e os orienta na direção em que foram submetidos à força, permitindo a interação entre eles. No último estágio aparece o pico de consistência, no qual as fibrilas de proteína têm seu diâmetro reduzido significativamente e interagem mais bidimensionalmente que em um único eixo. Neste estágio a massa pode ser estendida em forma de filme contínuo (STAUFFER, 2009).

Quando se produz pães isentos de glúten, a etapa de mistura tem a função de homogeneizar todos os ingredientes, dispersar, solubilizar e hidratar uniformemente os componentes da massa, além de permitir a incorporação de ar.

3.3.2.2. Fermentação principal

A fermentação principal tem início durante a mistura da massa. É uma fermentação alcoólica e anaeróbica produzida pela ação do fermento biológico (leveduras) sobre os açúcares presentes na massa. Seu papel é produzir gás carbônico e modificações físico-químicas, as quais interferem nas propriedades plásticas da massa participando da formação do sabor e aroma do pão, além de contribuir para sua boa conservação (AQUARONE et al., 2001; PAVANELLI, 2000).

3.3.2.3. Divisão e boleamento

Segundo Gould (2009), a massa deve ser dividida em pedaços de peso especificado para produzir pães com peso líquido indicado, sem causar danos à estrutura de bolhas da massa. A massa é então boleada para adquirir uma forma arredondada e apresentar uma superfície lisa. Assim como na divisão, esse processo pode ser manual ou mecânico, com utilização de equipamentos apropriados (EL-DASH; CAMARGO; DIAZ, 1982).

Estas etapas não ocorrem no processo de elaboração de pães isentos de glúten devido à consistência cremosa da massa, não permitindo o corte e a formação de bolas de massa. A massa de pães isentos de glúten é normalmente depositada em formas.

3.3.2.4. Descanso

Após o boleamento, a massa é descansada por alguns minutos. Durante esse tempo, ocorre relaxamento da rede de glúten, de modo que a massa possa readquirir a elasticidade estrutural perdida pelo esforço mecânico sofrido durante as fases de divisão e boleamento (EL-DASH; CAMARGO; DIAZ, 1982). O objetivo do descanso é produzir uma peça de massa suficientemente macia, extensível e descansada, para possibilitar o desempenho ideal no estágio de modelagem (GOULD, 2009).

No processo de elaboração de pães sem farinha de trigo, a etapa de descanso não ocorre, pois não existe glúten na massa.

3.3.2.5. Modelagem

Segundo Gould (2009), o objetivo da modelagem é criar uma peça de massa de formato adequado e ao mesmo tempo produzir uma estrutura que resultará em uma melhor textura, tanto do miolo quanto da casca do produto final.

Nessa etapa, a massa é achatada, alongada e enrolada sob baixa pressão para obter um formato uniforme, perdendo parcialmente o gás produzido no descanso, e colocada em formas retangulares (EL-DASH; CAMARGO; DIAZ, 1982).

Nos produtos isentos de glúten a massa apresenta consistência cremosa e por isso não possui características viscoelásticas (GALLAGHER; GORMLEY; ARENDT, 2004). Assim, ela não pode ser manuseada ou modelada, simplesmente é vertida nas formas e levada à fermentação final.

3.3.2.6. Fermentação final

O objetivo da fermentação final é permitir que a massa modelada se expanda para produzir uma massa aerada que depois de assada terá formato e volume adequados (GOULD, 2009).

A fermentação final é realizada em câmaras de fermentação, com condições controladas de temperatura e umidade, garantindo que a massa tenha o tempo e as condições suficientes para obtenção da textura e do volume correto para o pão (EL DASH; CAMARGO; DIAZ, 1982). A temperatura tem um profundo efeito sobre a taxa de fermentação. À temperaturas de fermentação mais elevadas, a massa tem a tendência de desenvolver mais rapidamente, enquanto que em temperaturas mais baixas a massa precisa de um tempo maior para se desenvolver (BOEKHOUT; ROBERT, 2003). Quando são usadas temperaturas de fermentação entre 22° a 24°C, a massa pode levar de 2 a 3 horas para dobrar de volume (WAYNE, 2009), no entanto, este tempo pode ser reduzido para 1 hora a 1 hora e meia se a temperatura de fermentação for aumentada para 28°C (QUAGLIA, 1991).

No caso do pão isento de glúten, o objetivo da fermentação final é o mesmo do pão com farinha de trigo, ou seja, permitir uma boa expansão e aeração da massa para produzir um pão com volume adequado.

3.3.2.7. Assamento

Normalmente, as condições mais comuns para o assamento de pães são as temperaturas de 200°C à 230°C por tempos variáveis, de acordo com o tipo e tamanho do pão confeccionado (AQUARONE et al., 2001).

O assamento resulta em uma série de alterações físicas, químicas e bioquímicas em um produto de panificação, que incluem a expansão do volume, a evaporação da água, a formação de uma estrutura porosa, a desnaturação das proteínas, a gelatinização do amido, a formação de crosta e reações de escurecimento (SABLANI; BAIK; MARCOTTE, 2002).

3.3.2.8. Resfriamento

Ao saírem do forno, os pães apresentam temperatura muito alta e devem ser resfriados à temperatura ambiente antes de serem cortados e embalados, a fim de evitar a deformação e a deterioração (AQUARONE et al., 2001).

O início do resfriamento indica o começo do processo de envelhecimento do pão que é percebido pelo aumento da firmeza do miolo e perda do frescor. Isso se deve em parte à transição gradual de um amido amorfo, a um amido parcialmente cristalino e retrogradado. Nos produtos de panificação, em que existe quantidade suficiente de umidade para a gelatinização do amido, a retrogradação da amilose pode ser completada durante o período de resfriamento, em temperatura ambiente. A taxa de envelhecimento do produto depende da formulação, do método de panificação e das condições de armazenamento (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.3.3. Métodos de panificação

Além dos ingredientes, o procedimento para elaboração do pão é também fundamental. Segundo Hosney (1994) os produtos de panificação feitos com farinha de trigo, são produzidos principalmente de acordo com três métodos de mistura:

- O método de massa direta é aquele em que a mistura dos ingredientes é realizado em uma única etapa;
- O método esponja é aquele em que uma segunda mistura de ingredientes é realizada. O fermento é preparado durante a primeira etapa juntamente com determinada quantidade de água e farinha. A mistura é deixada fermentar durante algumas horas e depois é misturada com o restante dos ingredientes;
- O Chorleywood é o método em que todos os ingredientes são misturados num misturador de ultra-alta velocidade em alguns minutos.

Segundo Cauvain (2009), o método de mistura para as massas isentas de glúten pode variar do básico ao mecânico, planetário e até o proporcionado por amassadeiras contínuas e de alta velocidade.

3.4. Qualidade dos pães

Ao avaliar a qualidade do pão, Cauvain (2009) cita dentre as características externas dos pães, as dimensões, o volume, a aparência, a cor e a formação da casca como as mais frequentes. Dentre as características internas, o tamanho, a quantidade e a distribuição das

células de ar no miolo, a textura e a cor do miolo são as mais usadas para avaliar a qualidade dos pães.

O pão de trigo fresco geralmente apresenta cor marrom e crosta crocante, aroma de tostado, textura do miolo macia e elástica e um paladar úmido (GIANNOU; KESSOGLOU; TZIA, 2003). Segundo Bourne (2002), o sabor é o atributo mais apreciado em um alimento e a textura o principal fator para rejeitá-lo.

A estrutura do miolo dos produtos à base de cereais como o pão é um fator muito importante para determinar a qualidade sensorial, podendo ser quantificado, por exemplo, como textura ou crocância, bem como armazenamento e propriedades de envelhecimento (ARPITA MONDAL, 2008).

Segundo Cauvain (2009), a textura e a qualidade sensorial são propriedades importantes dos produtos de panificação. A maciez ou firmeza do miolo é a propriedade de textura que atrai mais a atenção na avaliação do pão devido a sua relação com o frescor.

A textura pode ser definida como todos os atributos mecânicos, geométricos e de superfície de um produto que sejam perceptíveis por meios instrumentais e sensoriais (ESTELLER; AMARAL; LANNES, 2004). O procedimento para determinação da firmeza e demais parâmetros de textura consiste em submeter os pães à compressão e analisar a curva força-tempo resultante (ESTELLER et al., 2004). A força máxima avaliada para produtos panificados é dependente da formulação (qualidade da farinha, quantidade de açúcares, gorduras, emulsificantes, enzimas e mesmo a adição de glúten e melhoradores de farinha), umidade da massa e conservação (tempo de fabricação do produto e embalagem) (ESTELLER; LANNES, 2005).

Segundo Ylimaki et al. (1988), pães produzidos com farinhas isentas de glúten geralmente apresentam miolo firme e gomoso. Clerici e El-Dash (2006) estudaram a substituição da farinha de trigo por farinha de arroz na produção de pães livres de glúten e obtiveram pães com textura e coloração semelhantes aos pães de trigo, indicando que novas pesquisas devem ser feitas visando melhorar o volume dos pães.

3.5. Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados do mundo, constituindo a base da alimentação de mais da metade da população, sendo para alguns povos, especialmente na Ásia, alimento de sobrevivência. A produção asiática de arroz representa 96,68% da produção mundial (FUNGUETTO et al., 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial de arroz, fora da Ásia, com colheita que se aproxima de 12,8 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (CARVALHO et al., 2014). A produção nacional de arroz está distribuída pelos seguintes estados: Rio Grande do Sul, 64,4%, Santa Catarina, 8,3%, Mato Grosso, 5,4% e Maranhão, 4,4% (BRASIL, 2011). Segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção nacional de arroz na safra 2011/2012 foi de 11,599 milhões de toneladas, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 8.984 milhões de toneladas (BRASIL, 2012).

Quanto ao valor nutricional, o arroz é constituído basicamente de amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas, estando sujeitas a variações dependendo da cultivar, fatores ambientais, condições de cultivo, manejo e armazenamento dos grãos (ZHOU et al., 2002).

Pesquisadores relataram que o arroz produz efeitos benéficos à saúde, como auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, entre outros, auxiliando na prevenção e no controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (BRAND-MILLER; PANG; BRAMALL, 1992; KOIDE et al., 1996; QURESHI et al., 2001; RONG; AUSMAN; NICOLOSI, 1997; XIA et al., 2003).

O arroz é uma boa opção para a elaboração de produtos isentos de glúten, pois além de ser um alimento livre de inibidores enzimáticos que prejudicam a absorção na dieta, apresenta uma elevada proporção de carboidratos facilmente digeríveis (SCHAMNE, 2007). Além disso, o arroz é um cereal que possui a fração prolamina com composição amino-acídica diferente da do trigo e talvez por essa razão os celíacos não possuam a mesma sensibilidade a esse cereal (CÉSAR et al., 2006).

3.5.1. Farinha de arroz

A farinha de arroz é produzida a partir de grãos inteiros e quebrados durante a etapa de beneficiamento e contém de 6 a 7% de proteína (SHIH, 2004), sendo conhecida por sua fácil digestão no organismo. Basicamente, o processo de produção da farinha de arroz envolve as etapas de recepção, pré-higienização, limpeza e moagem dos grãos e peneiração e ensacamento da farinha (BUHLER SA, 2013).

A moagem consiste no cisalhamento dos grãos polidos em rolos raiados, para reduzir a granulometria a partículas de tamanhos menores do que 250 µm. Através do peneiramento, há remoção de partículas com granulometrias maiores, garantindo um produto dentro dos

padrões tecnológicos, com redução e/ou eliminações de sujidades ou focos de contaminação microscópica (CARDOSO, 2003; ELIAS; FRANCO, 2006).

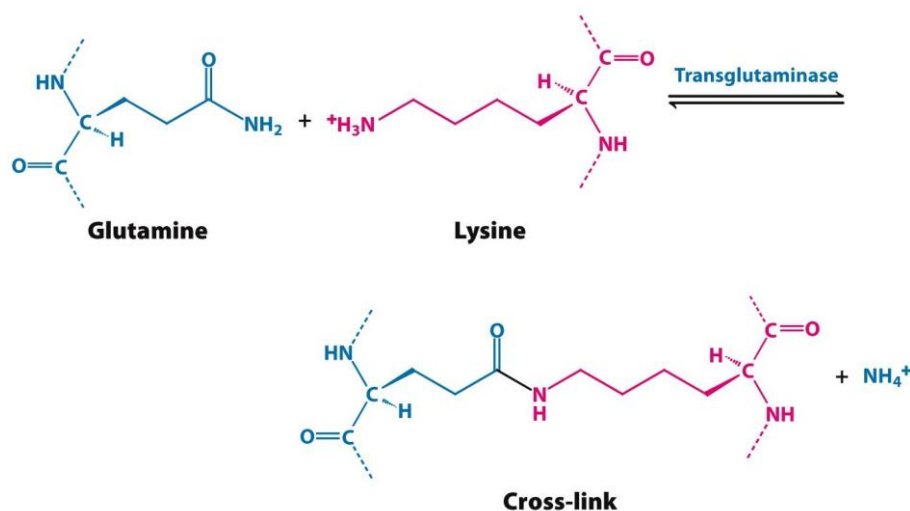
A farinha de arroz constitui o substituto da farinha de trigo mais utilizado em razão de apresentar sabor suave, cor branca, ampla faixa de teor de amilose, propriedades nutricionais e hipoalergênicas (CAPRILES; ARÊAS, 2011; STORCK et al., 2009).

A industrialização de produtos livres de glúten à base de farinha de arroz é tecnologicamente difícil, porque esta farinha não tem as propriedades viscoelásticas características das proteínas do glúten (SIVARAMAKRISHNAN; SENGE; CHATTOPADHYAY, 2004) o que prejudica a qualidade, dando origem a produtos de pequenos volumes específicos, mais firmes e menos duráveis que os elaborados com farinha de trigo. Por esse motivo, o desenvolvimento de produtos de panificação livres de glúten é um desafio para a ciência e a tecnologia dos alimentos, entretanto, essencial para os pacientes celíacos (PREICHARDT, 2009).

3.6. Enzima transglutaminase

A enzima transglutaminase (TG) (EC 2.3.2.13) é conhecida por catalisar reações de transferência de grupos acil formando ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e várias aminas primárias, principalmente pelas ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina (NONAKA et al., 1989) como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Reação de acil-transferência catalisada pela enzima transglutaminase



3.6.1. Mecanismo de ação

O mecanismo de reação catalisado pela transglutaminase é explicado da seguinte forma: o grupo tiol de uma cisteína ataca a cadeia lateral de um resíduo de glutamina acessível no meio proteico. Esse ataque forma um complexo acil-enzima e amônia. Em seguida, uma amina primária entra no lugar da enzima formando uma glutamina carboxamida modificada. Caso a ligação proteica envolva lisina, a ligação cruzada entre peptídeos, intra ou intermolecular, ocorre via N(γ -glutaminil) L-lisina. Essas reações com transglutaminase resultam na formação de agregados proteicos irreversíveis (MACEDO; SATO, 2006).

As reações que podem ser utilizadas para modificar as propriedades das proteínas são a formação de ligações cruzadas entre aminas primárias com resíduos de glutamina acessível no substrato proteico, ou na ausência de resíduos de lisina ou outras aminas primárias, a água poderia reagir como nucleófilo, resultando na hidrólise de um resíduo de glutamina, formando um resíduo de glutamato (GERRARD et al., 2001).

Na área de panificação, a enzima transglutaminase provoca a formação de ligações covalentes entre as frações de proteína conduzindo a uma melhora nas propriedades viscoelásticas do glúten que têm um efeito positivo no comportamento reológico das massas em geral (CABALLERO et al., 2005).

No Brasil, a enzima transglutaminase está disponível na linha ACTIVA®, preparações produzidas pela Ajinomoto, que usam a enzima como ingrediente chave para oferecer vários benefícios à indústria de alimentos. Na panificação, estudos preliminares sugerem que a ACTIVA® auxilia na redução do tempo de batimento da massa de pães, aumentando significativamente a produtividade. Além disso, observou-se aumento do crescimento da massa com uma quantidade menor de fermento, resultando em redução de custo para a indústria (AJINOMOTO, 2013).

3.6.2. Uso da enzima transglutaminase em produtos livres de glúten

A enzima transglutaminase vem sendo usada com sucesso em produtos livres de glúten por sua capacidade de formar rede proteica, através da promoção de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina, convertendo proteínas solúveis em polímeros insolúveis (LARRÉ et al., 2000). Isso faz com que a massa tenha maior elasticidade e viscosidade, melhorando a capacidade de retenção de gases durante a fermentação de pães.

Moore et al. (2006) estudaram a adição da enzima transglutaminase nos níveis 0,0; 0,1; 1,0 e 10,0 U/g de proteína, em formulações de pães com farinhas de arroz, batata e milho, goma xantana e várias fontes de proteína (soro de leite em pó, soja e ovo em pó). Os resultados mostraram ser possível criar uma rede de proteínas para a produção de pão sem glúten com a utilização da enzima, sendo que melhores resultados foram dependentes da quantidade de enzima e das fontes de proteína usadas.

Gujral e Rosell (2004) trabalharam com diferentes concentrações de transglutaminase e as mais utilizadas variaram de 0,1 a 1,5 g/100 g de farinha. Huang et al. (2010) estudaram o efeito da transglutaminase na massa de farinha de aveia e observaram diminuição progressiva na quantidade de grupos amino livres quando foi adicionado de 0 a 1% da enzima. Estes autores concluíram que teores maiores de enzima não afetaram o teor de grupos amino livres devido à baixa quantidade de lisina na massa, o que pode limitar a ação da enzima transglutaminase.

Storck et al. (2009), estudando a influência da enzima transglutaminase nas características tecnológicas de pães de farinha de arroz de alto teor de amilose, obtiveram melhor volume específico dos pães quando usaram 1,5% de transglutaminase em base à farinha.

Autio et al. (2005) estudaram a cinética de intercruzamento das proteínas do trigo em massas de pães com uso da transglutaminase. Verificou-se que a adição da enzima deixou a massa mais rígida e menos extensível logo após o amassamento. Houve ainda um retardo do crescimento das bolhas de gás durante a fermentação, o que reduziu o diâmetro médio dos alvéolos. E foi constatado que a enzima promoveu o desenvolvimento do glúten, no entanto, quando usada na maior concentração (0,06%) provocou uma distribuição não homogênea das proteínas no pão.

A transglutaminase permitida pela legislação para a utilização na indústria de alimentos deve ser obtida apenas dos microrganismos *Streptomyces mobaraense* ou *Streptoverticillium mobaraense* (BRASIL, 2009). Segundo a Resolução RDC nº 348, de 02 de dezembro de 2003 da ANVISA, a transglutaminase está incluída na tabela de enzimas, cujo parágrafo único informa que o limite de uso será em “*quantum satis*”, ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito desejado no alimento (BRASIL, 2003).

3.7. Melhoradores de textura

Estabilizantes (gomas e hidrocolóides) são usados para regular a consistência dos alimentos. São produtos que hidratam quando se juntam à água e durante este processo, as moléculas maiores de estabilizantes desagregam-se e dissolvem-se. Isto leva à formação de enlaces ou “pontes” de hidrogênio que através de todo o líquido formam uma “rede”, reduzindo assim a mobilidade da água restante não ligada. Quando se trabalha com estabilizantes, estes efeitos são facilmente observáveis, resultando em alta viscosidade e formação de gel (ROSS - MURPHY, 2001).

Os hidrocolóides são amplamente utilizados como aditivos na tecnologia de alimentos e tem como funções a melhoria da textura, retardo da retrogradação do amido, aumento da retenção de umidade, enfim, a melhoria da qualidade, em geral, dos produtos de panificação. O principal efeito produzido pelos hidrocolóides é o atraso da retrogradação da amilose pela formação de complexos entre os hidrocolóides e as cadeias da amilose (ROJAS; ROSELL; BARBER, 1998). O motivo pelo qual a formação de gel pode ser importante nos produtos livres de glúten é que a geleificação envolve a formação de uma rede tridimensional viscoelástica, tal como é o glúten na massa feita com farinha de trigo (BEMILLER, 2008).

A incorporação de hidrocolóides em soluções de amido modifica as propriedades reológicas e causa aumento da viscosidade. Por este motivo, as gomas são utilizadas para conferir estabilidade a produtos como pudins e sobremesas. Estudos sobre a interação de amido de milho a 5% com goma guar e LBG (goma locusta) nas concentrações de 0-0,2% mostraram que, à medida que aumenta a concentração dos hidrocolóides, diminui a temperatura de gelatinização e aumenta a viscosidade a frio da solução (SUDHAKAR; SINGHAL; KULKARNI, 1996).

O retardo do envelhecimento dos pães pode ser devido à interação dos hidrocolóides com os componentes do amido através de pontes de hidrogênio, tornando-os menos disponíveis para a cristalização do amido (MUNHOZ, 2003). Pequenas quantidades de hidrocolóide (<1%) aumentam a absorção de água e o volume específico do pão, reduzem a firmeza do pão e a retrogradação do amido (COLLAR et al., 1999).

Onyango, Unbehend, e Lindhauer (2009) estudaram o efeito de hidrocolóides e emulsificantes nas propriedades do miolo de pães livres de glúten preparados a partir de sorgo e amido de mandioca gelatinizado. Os hidrocolóides utilizados (celulose microcristalina, carboximetilcelulose, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e hidroxipropilcelulose) não

diminuíram a firmeza do miolo e tampouco a taxa de endurecimento dos pães livres de glúten em relação ao controle.

Os hidrocolóides HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) e MC (metilcelulose) são preparados por modificação química da celulose e são aprovados pela FDA (BURDOCK, 2007). A metilcelulose (MC) é utilizada na preparação do pão não convencional, de baixo conteúdo de glúten, para aumentar a absorção de água e melhorar a consistência do miolo (QUAGLIA, 1991).

A metilcelulose (MC) tem propriedades funcionais que são vantajosas em produtos de panificação, particularmente em alimentos feitos de farinha de arroz, milho e centeio, que são de baixo teor ou isentas de glúten. A metilcelulose, que está disponível numa larga gama de pontos de geleificação, contribui para a estruturação das células e redução da desintegração do miolo. O uso de metilcelulose permite que mais água possa ser adicionada em uma massa de pão, permitindo gelatinização mais completa do amido (PANDA, 2010).

Em geral, os hidrocolóides são adicionados em níveis que variam de 1 a 4% (base farinha) e os melhores resultados em termos de volume e textura são obtidos pela incorporação de 1 a 2%. Os resultados são variáveis em função da formulação e das condições de processamento (CAPRILES E ARÊAS, 2011).

3.8. *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) e seus efeitos na saúde

Spirulina é o nome comercial do gênero *Arthrospira platensis* pertencente ao grupo das Cyanobacterias (SANTOS, 2013). Tradicionalmente, as cianobactérias foram conhecidas como algas verde-azuladas e classificadas pelos botânicos entre as algas, sendo a sistemática do grupo regida pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica, atualmente designado como “Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas” (Código de Melbourne 2011). As algas verde-azuladas são, talvez, as formas mais antigas e primitivas de vida na Terra. Têm sido utilizadas como alimento humano desde os tempos antigos em várias partes do mundo, como China, Índia, México, América do Norte, Peru, Japão, entre outros (MORAES et al., 2013).

No Brasil, a *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) foi identificada na Lagoa Mangueira (RS) e na Lagoa Salina do Meio e Salitrada Campo Dora (Pantanal, MS) (SANTOS, 2013). As microalgas são cultivadas de forma contínua em curto tempo, requerendo pequenas áreas para seu cultivo, cuidados como reposição mineral, controle de pH e luminosidade (BERTOLDI; SANT’ANNA; OLIVEIRA, 2008).

Para a elaboração de alimentos é necessário primeiramente separar a biomassa da microalga do meio de cultura. O processo de separação envolve etapas como floculação, centrifugação e filtração. Após, a biomassa deve ser desidratada através de técnicas, como a secagem ao sol, o “spray-drying” e a liofilização (MOLINA GRIMA; ACIÉ FERNÁNDEZ; ROBLES MEDINA, 2004).

A FDA (Food and Drug Administration) certificou esta microalga como GRAS (Generally Recognized as Safe), baseada em pesquisas científicas realizadas por Cyanotech Corporation (Havaí) e Earthrise Nutritionals (Califórnia). Nestes estudos, a *Spirulina* foi adicionada a diversos alimentos e bebidas, consumida em quantidades de 0,1 a 6 g/indivíduo/dia e a média das estimativas de consumo de 3 g/indivíduo/dia (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003). No Brasil, a *Spirulina* é classificada como um novo ingrediente e sua ingestão diária não deve exceder 1,6 g/indivíduo (BRASIL, 2004).

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido à sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006). Estudos nutricionais mostram que esses microrganismos têm um dos mais altos teores de proteína já encontrado, boa digestibilidade e todos os aminoácidos essenciais nas proporções recomendadas pela FAO, com exceção da metionina (AVILA - LEON, 2010).

As espécies *S. platensis* e *S. maxima* são as mais estudadas para uso na alimentação humana por apresentarem um perfil nutricional que as torna ideais como suplemento alimentar, pois substituem satisfatoriamente as fontes artificiais de nutrientes, por combinar diversos constituintes de maneira equilibrada. Entre estes constituintes incluem proteínas de alta qualidade, vitaminas do complexo B, minerais, antioxidantes β -caroteno e vitamina E (AMBROSI et al., 2008).

Segundo Becker (2007), a composição geral da *Spirulina platensis* inclui de 46 a 63% de proteína, 8 a 14% de carboidratos e 4 a 9% de lipídios. A *Spirulina* possui proteínas com composição equilibrada de aminoácidos, com as concentrações de metionina, triptofano e outros aminoácidos quase semelhantes aos de caseína, embora isto dependa dos meios de cultura utilizados. O carboidrato de maior relevância do ponto de vista nutricional é o mesoinositol fosfato que confere à *Spirulina* a característica de ser excelente fonte de fósforo (HABIB et al., 2008). A cianobactéria *Spirulina platensis* é considerada uma fonte potencial do γ -linolênico, o qual representa cerca de 20% do total de ácidos graxos presentes (COHEN; VONSHAK; RICHMOND, 1987; DESHNIUM et al., 2000). A microalga *Spirulina* contém vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (nicotinamida), B6 (piridoxina), B9 (ácido fólico), vitamina B12 (cianocobalamina), vitamina C, vitamina D e vitamina E e é uma rica

fonte de potássio, e também contém cálcio, crômio, cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, selênio, sódio e zinco (HABIB et al., 2008).

A *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira, em Santa Vitória do Palmar, cultivada em diferentes meios de cultivo apresentou teor proteico variando de 60 a 63%, teor de lipídico de 5%, carboidratos de 15 a 21% e cinzas de 11 a 16% (BORGES et al., 2013).

Segundo Karam e Soccol (2007), grande número de estudos nutricionais foram feitos em dietas de diferentes animais: ratos, suínos, aves e bezerros, utilizando *Spirulina*, proporcionando aumento de peso e de deposição de nitrogênio comparáveis a outras fontes de proteína.

Em estudo com o uso de *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à uma dieta de restrição proteica, onde o teor proteico da *Spirulina platensis* utilizada nas dietas foi de 59 a 65%, houve redução nos teores de colesterol total e triglicérides nos grupos que consumiram as dietas proteicas à base da microalga (DONATO et al., 2010).

No estudo realizado por Colla, Muccillo-Baisch e Costa (2008) para avaliar os efeitos da suplementação com *S. platensis* sobre o colesterol sérico em coelhos induzidos a hipercolesterolemia, os níveis de colesterol foram reduzidos e os níveis de HDL foram aumentados com a suplementação.

Moreira (2010) testou diferentes concentrações de *Spirulina* como fonte de proteína durante a recuperação nutricional de ratos submetidos à desnutrição proteica. A dieta que se mostrou mais eficiente na recuperação nutricional dos ratos foi a com 8,8% de *Spirulina*, apresentando respostas equivalentes à dieta controle e superiores as demais dietas com teores superiores de *Spirulina*, demonstrando que o uso de concentrações superiores de *Spirulina* não melhoram as condições dos animais.

Figueira et al. (2011) obtiveram aumento significativo no teor proteico de pães de farinha de arroz com acréscimo de *S. platensis* (LEB-18) a partir de 2%. Quanto ao teor de aminoácidos, os mesmos autores encontraram aumento dos aminoácidos essenciais treonina, metionina, isoleucina e leucina, o que colocou o pão com 3% de *S. platensis*, no mesmo nível do pão feito com farinha de trigo em termos de aminoácidos essenciais.

Rabelo et al. (2013) desenvolveram “sonhos” de mandioca enriquecidos com *Spirulina platensis*, variando a concentração da biomassa seca e açúcar invertido em suas formulações. A formulação com maior porcentagem de *Spirulina* permitiu uma melhor qualidade nutricional dos “sonhos” de mandioca em termos de proteínas, sais minerais, fibras e lipídios. Além disso, os “sonhos” com maior concentração de biomassa foram bem aceitos pelos consumidores, obtendo resultados semelhantes aos da formulação padrão.

O Conselho Econômico e Social das Nações Unidas, em plenária realizada no dia 15 de julho de 2003, nos Estados Unidos, reuniu delegações de vários países com o intuito de estabelecer algumas metas visando intensificar programas de assistência humanitária. Entre as delegações estava a da França, representada por Gilles Grillet (Membro-Chefe da Instituição Inter-Governamental para o uso da microalga *Spirulina* no combate à Desnutrição). Grillet, em sua fala, propôs ao Conselho o consumo da *Spirulina* como meio de combate à desnutrição severa e a utilização dessa microalga como suporte para o desenvolvimento rural, além de defender a criação de centros produtores de *Spirulina* para abastecer populações acometidas pela desnutrição (VOLTARELLI, 2008).

3.9. Avaliação da qualidade proteica dos alimentos

A qualidade nutricional de uma proteína está relacionada à sua capacidade de satisfazer as necessidades do organismo humano quanto à promoção de crescimento normal em crianças e manutenção no adulto (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998). O corpo humano é incapaz de manter as reservas de proteínas, portanto, um fornecimento constante de proteína de boa qualidade é necessário para manter o crescimento e outras funções fisiológicas (BOYE; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2012). O valor nutritivo de uma proteína depende não somente do seu teor no alimento, mas também do perfil de aminoácidos e da sua digestibilidade, ou seja, da sua biodisponibilidade. As proteínas devem fornecer todos os aminoácidos indispensáveis na dieta para garantir a síntese proteica (BORGES et al., 2010).

Podem ser utilizados vários parâmetros para avaliar a qualidade da proteína, dentre eles o Coeficiente de Eficiência Proteica (PER- Protein Efficiency Ratio) que mede o quociente do ganho de peso em gramas pela quantidade de proteína ingerida. O PER foi o padrão muito utilizado pela indústria alimentícia dos EUA para avaliar a qualidade da proteína na alimentação e também foi usado para calcular a recomendação diária para a proteína apresentada nas tabelas de alimentos nos Estados Unidos (ENDRES, 2001).

Outro indicador biológico utilizado é a Razão Proteica Líquida (NPR – Net Protein Ratio) que é obtido pela soma do ganho de peso do grupo em estudo e a perda de peso de um grupo aprotéico, dividido pelo consumo de proteína do grupo em estudo. A vantagem do NPR sobre o PER é que a soma da perda de peso do grupo aprotéico elimina a variabilidade dos valores de PER em resposta a diferentes concentrações de proteína na dieta (SGARBIERI, 1987).

A digestibilidade proteica é medida pela quantidade de proteína hidrolisada pelas enzimas digestivas até aminoácidos, portanto, disponível para a absorção como aminoácidos pelo organismo animal ou humano (SGARBIERI, 1987). A digestibilidade é o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização proteica da dieta, sendo, portanto, um condicionante de sua qualidade. A maioria das proteínas de origem animal apresenta boa digestibilidade, o que significa eficaz absorção de aminoácidos. As proteínas de origem vegetal geralmente são inferiores em razão de terem estruturas mais organizadas, apresentarem fatores antinutricionais e, por isso, serem mais resistentes ao ataque enzimático (CARIAS; CIOCCIA; HEVIA, 1995).

O Escore Químico (EQ) estabelece uma comparação entre o teor de cada aminoácido essencial da proteína teste com o aminoácido correspondente de um padrão ou uma proteína tomada como referência. O padrão de referência mais utilizado é da FAO/WHO (1991). O aminoácido que apresenta o menor EQ é considerado o limitante e uma proteína que apresenta EQ maior que 1,0 para todos os aminoácidos é considerada de alto valor nutricional (FAO/WHO, 1991).

A avaliação da qualidade proteica permite classificar as proteínas de acordo com o seu potencial nutritivo, detectar mudanças no valor nutritivo devido ao processamento e/ou estocagem, contribuindo para avaliar as necessidades de nitrogênio e aminoácidos para o crescimento e a manutenção da vida. O método mais utilizado para avaliar a qualidade proteica é o escore de aminoácidos corrigidos pela digestibilidade verdadeira (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score - PDCAAS), que consiste no produto do escore químico do aminoácido limitante multiplicado pela digestibilidade verdadeira da proteína. Recentemente, tem-se considerado este método como sendo o mais usual para a avaliação da qualidade proteica, por ser um procedimento que combina métodos químicos e biológicos (SCHAAFSMA, 2005).

Segundo Quaglia (1991), o valor biológico da proteína contida no arroz é alto em comparação a outros cereais e sua fácil digestibilidade faz com que este cereal tenha fundamental importância na alimentação humana. Segundo Sgarbieri (1996), a proteína do arroz é uma das mais nutritivas, igualando-se à aveia e ao centeio. A proteína do arroz, como um todo, é ligeiramente deficiente em lisina. Seu coeficiente de eficiência proteica (gramas de ganho de peso/gramas de proteína ingerida) varia entre 1,38 e 2,56, dependendo da variedade, concentração proteica e condições experimentais.

3.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução menor que 1 nm (NAGATANI et al., 1987).

A sua grande vantagem quando comparada com a técnica de microscopia óptica é a sua alta resolução e em relação à microscopia eletrônica de transmissão (MET) é a sua maior facilidade no preparo das amostras. Por microscopia eletrônica de varredura (MEV), se consegue obter uma impressão sobre a estrutura tridimensional que não é possível por microscopia óptica ou por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (AMEND; BELITZ, 1990; PARADES-LOPEZ; BUSHUK, 1982).

A análise da estrutura do pão utilizando a microscopia eletrônica de varredura tem sido estudada por vários pesquisadores (INDRANI et al., 2003; KIM et al., 2003; ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012). Através de técnicas microscópicas é possível verificar a estrutura da rede do glúten, células de gás, estruturas celulares e gelatinização do amido (AUTIO; LAURIKAINEN, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima, coadjuvantes, aditivos e ingredientes

Os materiais utilizados na elaboração dos pães foram: Farinha de Arroz Inativada cedida por Cerealle Indústria e Comércio Ltda, Enzima Transglutaminase Activa WM (81-135 U/g), cedida pela Ajinomoto Co., Hidrocolóide Metilcelulose Methocel A4M®, cedida por Colorcon, Ácido Ascórbico, P.A. da marca Synth e Microalga *Spirulina sp.* cepa LEB-18, do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Rio Grande, produzida na Planta Piloto localizada às margens da Lagoa Mangueira em Santa Vitória do Palmar, RS. Para elaboração das dietas do ensaio biológico foram usados os seguintes materiais: caseína P.A. (90% de proteína) da marca Synth, mistura de vitaminas e de minerais, L-cistina e bitartarato de colina adquiridos em farmácia de manipulação na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Os demais ingredientes utilizados (fermento biológico seco marca Fleischmann, sal refinado iodado, açúcar refinado, óleo de soja, amido de milho, farelo de trigo e sacarose) foram adquiridos no comércio de Rio Grande e Pelotas, RS, Brasil.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção da microalga *Spirulina* em pó

A microalga *Spirulina sp.* LEB-18, fornecida seca e congelada a -18 °C na forma de pellets, foi descongelada e moída em moinho de bolas até a granulometria de 80 mesh. A *Spirulina* moída e peneirada foi embalada a vácuo em sacos de polietileno e mantida congelada até o uso.

4.2.2. Caracterização da farinha de arroz

A farinha de arroz foi caracterizada por seus percentuais de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos. A umidade foi determinada, baseando-se em gravimetria, pela perda de peso após secagem em estufa à temperatura de 105°C até peso constante (método 925.10); o teor de cinzas foi determinado por método gravimétrico, em mufla à temperatura de 550°C (método 900.02A); o teor proteico foi determinado pelo nitrogênio total, utilizando o micro-Kjeldahl e o fator 5,95 para a conversão (método 955.04C) e o teor

lipídico foi determinado por extração com éter etílico em extrator de Soxhlet (método 920.39C). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e segundo a AOAC (2000). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença (100 g – gramas totais de umidade, proteínas, lipídios e cinzas).

4.2.3. Caracterização da *Spirulina*

Foi realizada a caracterização da *Spirulina* em pó a fim de determinar seus percentuais de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos. A umidade foi determinada baseando-se em gravimetria, pela perda de peso após secagem em estufa à temperatura de 105°C até peso constante (método 925.10); o teor de cinzas foi determinado, por método gravimétrico, em mufla à temperatura de 550°C (método 900.02A) e o teor proteico foi determinado pelo nitrogênio total, utilizando o micro-Kjeldahl e o fator 6,25 para a conversão (método 955.04C). Todas as determinações foram realizadas conforme a AOAC (2000). O teor lipídico foi determinado pelo método de Bligh & Dyer (1959). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença (100 g – gramas totais de umidade, proteínas, lipídios e cinzas).

4.2.4. Elaboração dos pães de farinha de arroz

Os pães de farinha de arroz foram elaborados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), localizado no Campus Cidade da Universidade Federal do Rio Grande.

A formulação dos pães de farinha de arroz foi baseada naquela usada por Figueira et al. (2011), com modificações, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Formulação* do pão de farinha de arroz

| Ingredientes | g/100g de farinha de arroz ** |
|---|-------------------------------|
| Farinha de arroz | 100 |
| Água | 120 |
| Sal | 2 |
| Açúcar | 5 |
| Fermento biológico seco | 1,5 |
| Óleo | 6 |
| Ácido ascórbico | 90ppm |
| Metilcelulose; Transglutaminase; <i>Spirulina</i> | Variáveis independentes *** |

* Segundo Figueira et al. (2011) modificada; ** Com base em farinha de arroz; *** Conforme delineamento experimental

A quantidade de fermento utilizada foi reduzida de 2% na formulação original para 1,5%. As quantidades de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* adicionadas à formulação seguiram um delineamento experimental DCCR, fatorial completo 2^3 (Tabela 3).

Os pães de farinha de arroz foram elaborados como descrito a seguir e visualizado no fluxograma da Figura 3. Os ingredientes secos foram pesados e misturados em uma batedeira planetária marca KitchenAid em velocidade baixa por 1 minuto. A seguir, a água e o óleo foram adicionados e misturados por mais 9 minutos mantendo a velocidade baixa. A massa obtida foi levada à estufa (Quimis) a 30°C por 60 minutos (1ª fermentação). Após, cada porção de 175 g de massa foi colocada em formas metálicas de 13,3 x 5,5 cm de base menor 15,5 x 7,4 cm de base maior superior e altura de 4,5 cm, untadas com óleo. As formas foram levadas à estufa (Quimis) a 30°C por mais 55 minutos (2ª fermentação). Após a 2ª fermentação, a massa fermentada foi assada em forno elétrico marca Fischer (modelo Diplomata) pré-aquecido a 200°C por 20 minutos. Os pães assados foram removidos das formas e deixados à temperatura ambiente por 1 hora para esfriar. De cada formulação foram elaborados 3 pães.

Figura 3- Fluxograma do processamento dos pães de farinha de arroz



4.2.5. Delineamento experimental

Para avaliação das três variáveis independentes (metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina*) foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) fatorial

completo 2^3 segundo Box e Wilson (1951). A Tabela 2 apresenta as variáveis independentes e níveis usados no delineamento experimental.

Os níveis das variáveis foram determinados a partir de faixas de valores usualmente utilizados na literatura para a elaboração de pães isentos de glúten.

Tabela 2 - Variáveis e níveis do delineamento experimental fatorial completo 2^3 , utilizados para a elaboração dos pães de farinha de arroz

| Variável independente | código | Nível de variação | | | | |
|-----------------------|----------------|-------------------|------|------|------|-------|
| | | -1,68 | -1 | 0 | +1 | +1,68 |
| Metilcelulose (%) | X ₁ | 0,80 | 1,08 | 1,50 | 1,92 | 2,20 |
| Transglutaminase (%) | X ₂ | 0,20 | 0,36 | 0,60 | 0,84 | 1,00 |
| <i>Spirulina</i> (%) | X ₃ | 1,00 | 1,60 | 2,50 | 3,40 | 4,00 |

(%) g de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* / 100g de farinha de arroz

A matriz que representa o delineamento experimental com valores codificados e reais é apresentada na Tabela 3. Foram realizados 17 ensaios, sendo seis pontos axiais, oito pontos cúbicos e três repetições do ponto central.

Tabela 3 - Matriz do delineamento experimental com valores codificados e reais (%)

| Ensaio | Valores codificados | | | Valores reais* | | |
|--------|---------------------|----------------|----------------|----------------|------|------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | MC | TG | <i>Spirulina</i> |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 1,08 | 0,36 | 1,60 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | 1,92 | 0,36 | 1,60 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | 1,08 | 0,84 | 1,60 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | 1,92 | 0,84 | 1,60 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | 1,08 | 0,36 | 3,40 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | 1,92 | 0,36 | 3,40 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | 1,08 | 0,84 | 3,40 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | 1,92 | 0,84 | 3,40 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 0,80 | 0,60 | 2,50 |
| 10 | +1,68 | 0 | 0 | 2,20 | 0,60 | 2,50 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 1,50 | 0,20 | 2,50 |
| 12 | 0 | +1,68 | 0 | 1,50 | 1,00 | 2,50 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 1,50 | 0,60 | 1,00 |
| 14 | 0 | 0 | +1,68 | 1,50 | 0,60 | 4,00 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 1,50 | 0,60 | 2,50 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 1,50 | 0,60 | 2,50 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 1,50 | 0,60 | 2,50 |

* (%) g de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* / 100g de farinha de arroz; MC- metilcelulose e TG- transglutaminase; X₁ – metilcelulose, X₂ – transglutaminase, X₃ - *Spirulina*

As variáveis resposta avaliadas, foram: quantificação de grupos amino na massa fermentada (μg de serina/mg de massa), volume específico do pão (mL/g), firmeza do miolo (g-força) e cor do miolo.

4.2.6. Avaliações realizadas nas massas fermentadas e nos pães

4.2.6.1. Quantificação dos grupos amino livres na massa fermentada

A quantificação dos grupos amino livres foi realizada na massa após a 2ª fermentação utilizando o método baseado na reação entre aminas primárias e o-oftaldialdeído (OPA) segundo metodologia usada por Figueira (2010), citando Gujral e Rosell (2004) (Apêndice 1), utilizando espectrofotômetro Kasuaki modelo IL 592. Os resultados foram calculados mediante curva padrão de serina (Apêndice 2).

4.2.6.2. Avaliação tecnológica dos pães

Após assados e arrefecidos à temperatura ambiente, os pães de farinha de arroz foram avaliados tecnologicamente pelas características de volume específico (mL/g), firmeza do miolo (g-força) e cor do miolo.

a) Volume específico

Os pães foram pesados em balança semi analítica modelo AS200 da marca Marte e o seu volume determinado através do método 10-05 da AACC (2000), por deslocamento de sementes de painço. O cálculo do volume específico foi realizado pela razão entre o volume e o peso do pão assado (mL/g).

b) Firmeza do miolo

A avaliação da firmeza do miolo dos pães de farinha de arroz foi realizada segundo a metodologia 74-09 da AACC (2000), utilizando o Analisador de Textura TA.XTplus e o software Exponent. A medição foi realizada em cada um dos 3 pães de cada ensaio, utilizando 2 fatias centrais de cada um dos pães, cada uma medindo 25 mm de espessura. A firmeza foi expressa como a força em gramas (g-força) necessária para comprimir cada fatia dos pães. Cada uma das fatias foi colocada no centro da plataforma do analisador de textura, sendo comprimidas com probe cilíndrico de 36 mm de diâmetro, utilizando as condições: velocidade pré-teste: 1 mm/s; velocidade de teste: 1,7 mm/s; velocidade pós-teste: 10 mm/s; compressão: 40% e trigger force: 5 g.

c) Cor do miolo

A cor do miolo dos pães foi determinada utilizando um colorímetro marca Minolta®, modelo CR400. A análise foi realizada em triplicata, seguindo o sistema de cor no espaço $L^*a^*b^*$ ou CIELab, definido pela CIE (Comissão Internacional de Iluminação) em 1976, avaliando os valores L^* (luminosidade), a^* e b^* (coordenadas de cromaticidade). Neste sistema de cor, os valores L^* variam de zero (preto) a 100 (branco), os valores de a^* variam de $-a^*$ (verde) até $+a^*$ (vermelho), e os valores de b^* variam de $-b^*$ (azul) até $+b^*$ (amarelo) (HUNTERLAB, 1998). Os valores correspondentes às coordenadas de cromaticidade L^* , a^* e b^* foram obtidos por meio de leitura direta das fatias de pão com o colorímetro.

Foram calculados também o valor de cromaticidade ou C^* e ângulo de tonalidade ou h° , referidos como sistema de cor CIELCh, de acordo com Minolta (1993). As Equações 1 e 2 mostram o cálculo dos parâmetros C^* e h° :

$$\text{Cromaticidade } (C^*) = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{1/2} \quad (1)$$

$$h^\circ_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (2)$$

4.2.6.3. Análise estatística do delineamento experimental

Para a análise das respostas da avaliação da massa fermentada e das características tecnológicas dos pães de farinha de arroz, foi utilizado o programa Statistica 7 (StatSoft, EUA), que permitiu calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas ao nível de 10% de significância.

4.2.7. Definição de formulações baseando-se nas respostas do planejamento experimental

Com base nas respostas obtidas do planejamento experimental, foram selecionados níveis para as variáveis independentes estudadas e definidas três formulações de pães de farinha de arroz, denominados Pão A, Pão B e Pão C, a fim de se obter pães com características tecnológicas adequadas. A Tabela 4 apresenta os níveis de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* selecionados para os pães de farinha de arroz.

Tabela 4 - Níveis das variáveis utilizadas para os pães de farinha de arroz definidos pelas respostas do planejamento experimental

| Variáveis | Pão A | Pão B | Pão C |
|--------------------|-------|-------|-------|
| Metilcelulose* | 2,2 | 1,5 | 2,2 |
| Transglutaminase* | 0,2 | 0,2 | 0,6 |
| <i>Spirulina</i> * | 4,0 | 4,0 | 1,0 |

*(%) g de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* / 100g de farinha de arroz

4.2.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das massas fermentadas dos pães A, B e C

Amostras de massa fermentada (após 2ª fermentação) dos pães A, B, C, B sem *Spirulina* e C sem transglutaminase foram liofilizadas e eletromicrografadas por microscopia eletrônica de varredura. As amostras de massa fermentada foram congeladas a - 86°C em ultrafreezer Indrel, modelo IULT 90 D e imediatamente desidratadas em liofilizador LÍOTOP, modelo L 108. As amostras liofilizadas foram fragmentadas em tamanho próprio para a fixação no *stub* e em seguida recobertas com carbono utilizando um *sputtering* marca Desk V, modelo Denton Vacuum (USA). As imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura marca JEOL, modelo JSM-6610 LV (Japão), no Centro de Microscopia da Região Sul do Brasil (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande.

4.2.7.2. Avaliação tecnológica dos pães A, B e C

Os pães A, B e C de farinha de arroz foram avaliados segundo suas características tecnológicas de volume específico (mL/g), firmeza do miolo (g-força) e cor do miolo como descrito no item 4.4.2.

4.2.7.3. Composição proximal dos pães A, B e C

A composição química dos pães foi determinada através das determinações de proteína realizada por micro-Kjeldahl utilizando como fator de conversão de 5,95, lipídios pelo método de Soxhlet, umidade e cinzas, todos de acordo com a AOAC (2000), além de carboidratos totais estimados por diferença (100 g – gramas de umidade, proteínas, lipídios e cinzas).

4.2.7.4. Análise estatística da avaliação dos pães A, B e C

As avaliações tecnológicas de volume específico, firmeza e cor do miolo e as análises de composição proximal foram realizadas em triplicata e os resultados analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA), comparando-se as médias através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância, empregando-se o programa Estatística 7.0.

4.2.8. Avaliação sensorial dos pães de farinha de arroz A, B e C

A avaliação sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Área da Saúde (CEPAS) da Universidade Federal do Rio Grande, através do parecer nº 130/2012 (Anexo 1) e cadastrado na Plataforma Brasil sob o nº 09676912600005324.

Os pães A, B e C foram avaliados sensorialmente através de um teste de ordenação por preferência (Apêndice 3), segundo o Instituto Adolfo Lutz (2008).

Cinquenta consumidores de pão, não celíacos, de ambos os sexos, foram convidados a participar do teste. Os julgadores que mostraram interesse em participar do teste assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que estivessem cientes da pesquisa (Apêndice 4).

Amostras dos três pães foram cortadas em fatias de aproximadamente 1 cm de espessura, as quais foram codificadas aleatoriamente. As amostras codificadas dos pães A, B e C juntamente com a ficha de avaliação, foram apresentadas aos julgadores para que eles as provassem e na ficha as ordenassem de forma decrescente de sua preferência, ou seja, da amostra mais preferida (pontuação 1) à menos preferida (pontuação 3). A avaliação foi realizada em cabines individuais com luz branca no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal do Rio Grande.

4.2.8.1. Análise estatística da avaliação sensorial

O resultado da avaliação sensorial foi calculado pela soma das ordens (pontuação) obtidas dos julgadores a cada uma das amostras através do teste de Friedman. O valor de Fr calculado foi comparado com valores críticos apresentados em tabela Newell e MacFarlane (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.9. Avaliação nutricional do pão de farinha de arroz com *Spirulina* na resposta biológica de ratos *Wistar*

O pão de farinha de arroz com 4% de *Spirulina*, 0,2% de transglutaminase e 1,5% de metilcelulose (Pão B) foi avaliado nutricionalmente através de ensaio biológico.

4.2.9.1. Preparo das dietas

Foram preparadas quatro dietas conforme recomendações para atender as necessidades nutricionais de roedores em crescimento (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993):

Dieta controle (C) – elaborada com caseína comercial (90% de proteína);

Dieta aprroteica (A) - sem adição de fonte proteica;

Dieta Pão de arroz (PA) - elaborada com Pão B sem *Spirulina*;

Dieta Pão de arroz com *Spirulina* (PAS) - elaborada com o Pão B.

A Tabela 5 apresenta a composição das dietas controle, aprroteica e experimentais: PAS e PA, elaboradas segundo Reeves, Nielsen e Fahey (1993).

Tabela 5 - Composição das dietas Controle, Aprroteica, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com *Spirulina*)

| Ingredientes (g/kg) | Dietas | | | |
|-----------------------------------|----------|-----------|-------|-------|
| | Controle | Aproteica | PA | PAS |
| Pão de arroz | - | - | 704,5 | - |
| Pão de arroz com <i>Spirulina</i> | - | - | - | 716,5 |
| Caseína | 120,0 | - | 58,0 | 50,0 |
| Óleo de soja | 70,0 | 70,0 | 35,0 | 35,0 |
| Mistura de minerais | 35,0 | 35,0 | 20,0 | 15,0 |
| Mistura de vitaminas | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| L-cistina | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| Bitartarato de colina | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Fibras | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| Sacarose | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Amido de milho | 609,5 | 729,5 | 17,0 | 18,0 |
| Total | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |

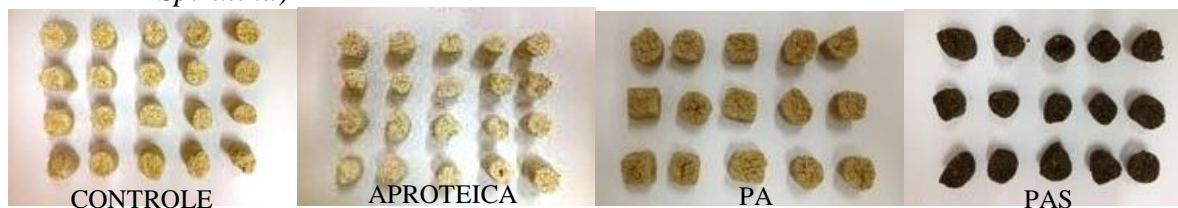
A formulação da dieta controle foi preparada com 10% de caseína, enquanto que a dieta aprroteica foi formulada a partir da dieta controle, retirando-se a caseína e complementando-se com mais amido de milho. Apesar da recomendação da AIN93G ser de 20% de proteína, as dietas controle e experimentais foram preparadas com aproximadamente

10%, pois segundo Miller e Bender (1955) e Sgarbieri (1996), fontes proteicas apresentam maior utilização nesta quantidade.

Para elaboração das duas dietas experimentais, a caseína foi substituída pelo material em estudo (Pão de arroz e Pão com *Spirulina*) e complementadas com caseína, para atingir o teor aproximado de 10% de proteína. As quantidades de óleo de soja e minerais foram reduzidas, em comparação com a dieta controle, devido aos lipídios e as cinzas já presentes nos pães. O amido de milho foi adicionado na quantidade necessária para completar 1000 g de cada dieta.

Para elaboração das duas dietas experimentais, PAS e PA, os pães de arroz e de arroz com *Spirulina* foram triturados e misturados aos demais ingredientes de cada dieta. À mistura foi adicionado um gel a 8% preparado com parte do amido da formulação para possibilitar a modelagem manual dos *pellets*. As dietas na forma de *pellets* foram secas em secador com circulação de ar a $\pm 50^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente 18 h (Figura 4).

Figura 4 - *Pellets* das dietas Controle, Aprroteica, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com *Spirulina*)



As dietas foram analisadas fisico-quimicamente, em triplicata, quanto aos percentuais de umidade, cinzas, lipídios e proteínas segundo a AOAC (2000). A umidade foi determinada, baseando-se em gravimetria, pela perda de peso após secagem em estufa à temperatura de 105°C até peso constante (método 925.10); o teor de cinzas foi determinado por método gravimétrico, em mufla à temperatura de 550°C (método 900.02A); o teor proteico foi determinado pelo nitrogênio total, utilizando o micro-Kjeldahl e o fator 6,25 para a conversão (método 955.04C) e o teor lipídico foi determinado por extração com éter etílico em extrator de Soxhlet (método 920.39C).

4.2.9.2. Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado na Sala de Experimentação Animal da área de Alimentos do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade

Federal de Pelotas, de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA (BRASIL, 2008) e o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – RS/Brasil, processo nº 23110009867/2012-21 (Anexo 2).

Para o ensaio, foram utilizados 24 ratos da espécie *Rattus norvegicus* cepa *Wistar*/UFPel, machos, recém-desmamados, de 21 dias, com peso médio entre 41,6 g e 73,4 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. O experimento foi conduzido por um período de 17 dias, dos quais os 3 primeiros dias foram de adaptação dos animais às condições do ambiente e à dieta padrão da espécie (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993, adaptado).

Ao final do período de adaptação, os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Controle (n=6); Aporteico (n=6); PA (n=6) e PAS (n=6), tendo-se o cuidado para manter o peso médio dos grupos de maneira que a diferença entre os mesmos fosse a mínima possível.

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais de arame galvanizado, com tela coletora de fezes e fundo em aço inoxidável, nas medidas 27x19x20 cm, comedouro externo e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 mL. Durante o período do ensaio, o laboratório permaneceu sob condições controladas de fotoperíodo de 12 horas (ciclo claro/escuro de 12 h cada) e temperatura de 22±2°C, com troca periódica do ar por sistema de exaustão. Os animais receberam diariamente 20 g de dieta e água *ad libitum*.

Durante o experimento, foi realizada diariamente, pesagem da dieta remanescente com o objetivo de se determinar a quantidade diária ingerida por animal. O peso corporal dos animais foi registrado a cada três dias para avaliação do ganho de peso dos mesmos. Estes dados também foram utilizados para o cálculo do coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

A partir dos últimos sete dias do experimento, as fezes foram coletadas (amostra = *pool* de fezes de dois ratos, totalizando 3 amostras de fezes por grupo), pesadas em balança analítica, secas em estufa a 50±1°C por 48 h e armazenadas congeladas para determinação do teor de nitrogênio e cálculo da digestibilidade aparente e verdadeira. O teor proteico de cada amostra de excreta foi determinado através do método de Kjeldahl, sendo os resultados expressos em % de proteína (AOAC, 2000). O fator de conversão proteico utilizado para todas as amostras foi de 6,25.

Ao término do período específico para os testes nutricionais e as respectivas coletas de dados, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e após a pesagem, realizada a eutanásia por decapitação utilizando uma guilhotina, seguindo a recomendação do Conselho

Federal de Medicina Veterinária – CFMV (2012). As carcaças dos animais foram colocadas em sacos adequados e congeladas, sendo remetidas, com os demais materiais perfurocortantes, para o Biotério e recolhidas por firma especializada.

4.2.9.3. Indicadores biológicos

Os indicadores biológicos avaliados foram Razão Proteica Líquida (NPR), Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), Digestibilidade Aparente (DA), Digestibilidade Verdadeira (DV) e Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS).

a) Razão proteica líquida (NPR)

A Razão Proteica Líquida foi calculada segundo Bender e Doell (1957), através da soma do ganho de peso no grupo alimentado com a proteína testada e a perda de peso no grupo aprotéico, dividida pela quantidade de proteína consumida pelo grupo teste, de acordo com a Equação 3.

$$NPR = \frac{\text{ganho de peso grupo teste (g)} + \text{perda de peso grupo aprotéico (g)}}{\text{proteína consumida pelo grupo teste (g)}} \quad (3)$$

b) Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

O Coeficiente de Eficiência Alimentar foi calculado pela razão entre o ganho de peso (g) e a quantidade de alimento ingerido (g) de cada animal ao final do experimento (JOOD; KAPOOR; SINGH, 1992), conforme Equação 4.

$$CEA = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo de dieta (g)}} \quad (4)$$

c) Digestibilidade proteica aparente e verdadeira

A digestibilidade aparente (DA) é a quantidade de proteína digerida que é obtida mediante a diferença entre a proteína ingerida na dieta e o nitrogênio eliminado nas excretas pelos animais, dividido pela quantidade de proteína ingerida, segundo a Equação 5.

$$\%DA = \frac{I - F \times 100}{I} \quad (5)$$

A digestibilidade verdadeira (DV) leva em consideração o nitrogênio proveniente do próprio animal que é excretado nas fezes juntamente com as proteínas de origem alimentar não digeridas, conforme a Equação 6 (SGARBIERI, 1996).

$$\%DV = \frac{I - (F - F_k) \times 100}{I} \quad (6)$$

Onde:

I = nitrogênio ingerido pelo grupo teste

F = nitrogênio fecal do grupo teste

F_k = nitrogênio fecal do grupo aprotéico

d) Escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCAAS)

Para a determinação do PDCAAS (Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade) foram utilizadas as determinações de aminoácidos essenciais (HPLC), escore de aminoácidos (AAS) e digestibilidade verdadeira das dietas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991).

A determinação dos aminoácidos essenciais nas dietas foi realizada pela empresa CBO - Análises Laboratoriais (Campinas/SP), utilizando um analisador de aminoácidos SPC1000 adaptado para o método de derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato PITC e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa, utilizando detecção em UV a 254 nm. O conjunto é constituído de desgaseificador, módulo de bomba quaternária, válvula de injeção Rheodyne, módulo de forno e módulo de detecção UV, equipado com coluna LUNA C18 100 Å 5u, 250x4,6 mm 00G-4252-EQ.

O escore de aminoácidos foi calculado através da razão entre os valores de aminoácidos essenciais das dietas (mg/g) e valores padrão FAO/WHO. O PDCAAS foi calculado multiplicando o valor do escore do aminoácido limitante pela digestibilidade verdadeira, conforme Equação 7.

$$PDCAAS = \text{Escore químico} \times \text{Digestibilidade verdadeira} \quad (7)$$

4.2.9.4. Análises bioquímicas do sangue

No momento da eutanásia por decapitação, alíquotas de sangue dos ratos foram recolhidas em tubos de ensaio com anticoagulante EDTA para a realização das análises de glicemia e colesterol total. O sangue foi centrifugado a 1000 g x 15 min a 4°C e o plasma extraído foi congelado e armazenado a -18°C para posterior análise. Para a determinação de glicemia e colesterol total foram utilizados Kits Liquiform da Labtest[®] e as concentrações medidas em analisador bioquímico LabMax 240.

4.2.9.5. Análise estatística da avaliação nutricional

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo programa Statistica 7.0 através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação das médias dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da farinha de arroz e da microalga *Spirulina*

A Tabela 6 apresenta a composição proximal da farinha de arroz e da microalga *Spirulina* utilizadas na elaboração dos pães. A composição proximal da farinha de arroz utilizada no experimento se assemelha àquela encontrada em estudo sobre a caracterização físico-química e propriedades funcionais da farinha de arroz, onde Latorres e Salas-Mellado (2011) obtiveram, em base úmida, valores de umidade de 7,8%, proteína de 7,8%, lipídios de 0,5%, cinzas de 0,4% e carboidratos de 83,5%. Também Figueira (2010), em seu estudo sobre a adição de *Spirulina platensis* em pães de farinha de arroz, obteve os mesmos resultados para proteína (7,5%), lipídios (0,7%) e carboidratos calculado por diferença (84%). O teor de umidade da farinha foi maior ao encontrado neste estudo (7,4%), enquanto que o teor de cinzas foi menor (0,2%).

Tabela 6 - Composição proximal da farinha de arroz e microalga *Spirulina* seca moída

| Características (%) | Farinha de arroz b.u.* | <i>Spirulina</i> b.u.* | <i>Spirulina</i> b.s.* |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Umidade | 6,8 ±0,24 | 12,9 ±0,04 | - |
| Cinzas | 0,5 ±0,03 | 10,6 ±0,07 | 12,2 ±0,07 |
| Proteína | 7,5 ±0,02 | 46,2 ±1,54 | 53,1 ±1,77 |
| Lipídios | 0,7 ±0,01 | 8,9 ±0,96 | 10,2 ±1,10 |
| Carboidratos** | 84,0 ±0,27 | 21,4 ±1,62 | 24,5 ±1,84 |

*Média de três repetições; **Obtido por diferença

Segundo Miao e Wu (2004), a composição química da biomassa das microalgas é determinada pela natureza de cada espécie algal, de fatores como a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e concentração de CO₂. De acordo com Habib et al. (2008), a *Spirulina* teria a seguinte composição química: proteínas de 50 a 70%, carboidratos de 15 a 25%, lipídios de 6 a 8%, minerais de 7 a 13% e fibras de 8 a 10%.

A microalga *Spirulina* apresentou teor proteico de 53,1%, valor semelhante ao encontrado por Moreira et al. (2013) em seu estudo do valor nutricional da proteína desta mesma cepa, onde obtiveram valores de 56% de proteína. Segundo Pelizer et al. (2003), o valor proteico da *Spirulina* pode variar de 55% a 63,2%, dependendo das condições de cultivo, que influenciam tanto a quantidade quanto a qualidade do perfil aminoacídico da proteína. Barros (2010), estudando a produção de biomassa de *Spirulina platensis*, encontrou teores de proteína que variaram de 49,3% e 60,6% em cultivos na fase exponencial e 10,4%

na fase estacionária. Isso mostra que além das condições de cultivo, a fase de cultivo em que se encontra a microalga também pode influenciar nos teores proteicos. Babadzhanov et al. (2004), estudando a composição química da *Spirulina platensis* obtiveram valor de 68% de proteína.

Os teores de cinzas (12,2%) e lipídios (10,2%) encontrados foram superiores àqueles encontrados por Donato et al. (2010), no uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos em ensaio biológico, que foram 7,5% e 3,3% respectivamente. Moreira et al. (2013) encontraram valores inferiores aos obtidos neste estudo, de 9,5% para cinzas e de 7,4% para lipídios. Babadzhanov et al. (2004) estudando a composição química da *Spirulina platensis*, obtiveram valor de 14,3% de lipídios, sendo bem superior ao encontrado neste estudo.

5.2. Respostas do delineamento experimental

5.2.1. Quantificação de grupos amino na massa fermentada

A Tabela 7 mostra a matriz do planejamento com valores reais e codificados das variáveis independentes e a resposta quantidade de grupos amino livres.

Analisando os valores obtidos, observa-se que a variação na quantidade de grupos amino livres foi de 0,21 a 0,65 µg/mg de massa. A enzima transglutaminase catalisa a reação entre grupos amino de resíduos de lisina e resíduos de glutamina formando ligações cruzadas entre as proteínas. Desta forma, devido ao envolvimento dos grupos amino livres nas ligações cruzadas, ocorre uma diminuição da quantidade destes grupos, podendo indicar que a transglutaminase está catalisando a reação de formação de ligações cruzadas.

Tabela 7 - Matriz do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2³, com os valores reais e codificados das variáveis e a resposta quantidade de grupos amino livres na massa fermentada

| Ensaio | Metilcelulose* (%) | Transglutaminase* (%) | <i>Spirulina</i> * (%) | Grupos amino livres (µg de serina/mg de massa) |
|--------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|---|
| 1 | 1,08 (-1) | 0,36 (-1) | 1,60 (-1) | 0,21 |
| 2 | 1,92 (1) | 0,36 (-1) | 1,60 (-1) | 0,22 |
| 3 | 1,08 (-1) | 0,84 (1) | 1,60 (-1) | 0,40 |
| 4 | 1,92 (1) | 0,84 (1) | 1,60 (-1) | 0,26 |
| 5 | 1,08 (-1) | 0,36 (-1) | 3,40 (1) | 0,52 |
| 6 | 1,92 (1) | 0,36 (-1) | 3,40 (1) | 0,55 |
| 7 | 1,08 (-1) | 0,84 (1) | 3,40 (1) | 0,65 |
| 8 | 1,92 (1) | 0,84 (1) | 3,40 (1) | 0,49 |
| 9 | 0,80 (-1,68) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 0,53 |
| 10 | 2,20 (+1,68) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 0,51 |
| 11 | 1,50 (0) | 0,20 (-1,68) | 2,50 (0) | 0,62 |
| 12 | 1,50 (0) | 1,00 (+1,68) | 2,50 (0) | 0,61 |
| 13 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 1,00 (-1,68) | 0,21 |
| 14 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 4,00 (+1,68) | 0,55 |
| 15 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 0,43 |
| 16 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 0,30 |
| 17 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 0,32 |

* (%) g de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* / 100g de farinha de arroz

Os resultados da análise da regressão mostraram que o termo quadrático do teor de transglutaminase e o termo linear do teor de *Spirulina* influenciaram significativamente ($p < 0,10$) na resposta quantidade de grupos amino livres na massa fermentada, pois a enzima transglutaminase atua sobre as proteínas formando ligações cruzadas e reduzindo os grupos amino livres.

A análise de variância para a resposta quantidade de grupos amino livres, considerando somente os termos significativos, está apresentada na Tabela 8, mostrando o coeficiente de correlação (R), o coeficiente de determinação (R^2), os valores de F calculado e tabelado e a relação F_{cal}/F_{tab} .

Tabela 8 - Análise de variância para o parâmetro quantidade de grupos amino livres na massa fermentada

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F calculado | F tabelado | F _{cal} /F _{tab} |
|-------------------|--------|----|--------|-------------|------------|------------------------------------|
| Regressão | 0,2649 | 2 | 0,1324 | 16,97 | 2,73 | 6,21 |
| Resíduo | 0,1094 | 14 | 0,0078 | | | |
| Total | 0,3743 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; R²=0,71; R=0,84

A análise de variância apresentou uma porcentagem de variação explicada de 71% e o valor da relação F_{cal}/F_{tab} de 6,21, possibilitando estabelecer um modelo matemático preditivo. A Equação 8 demonstra que a quantidade de transglutaminase e de *Spirulina* influenciaram positivamente a resposta.

$$\text{Grupos amino livres} = 0,38 + 0,07X_2^2 + 0,12X_3 \quad (8)$$

Onde:

X₂: transglutaminase

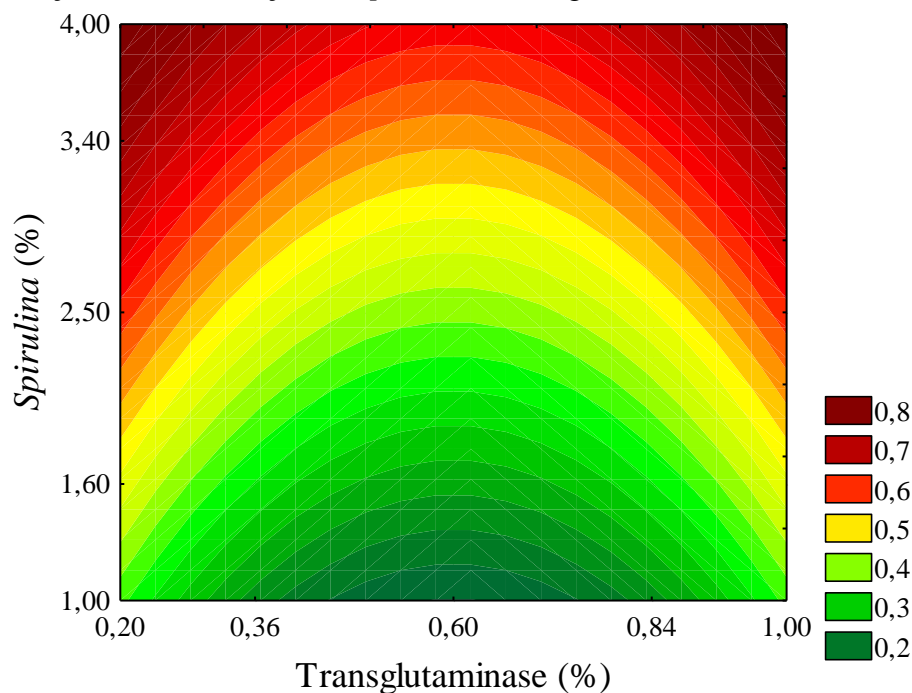
X₃: *Spirulina*

A Figura 5 representa a curva de contorno gerada a partir do modelo para a resposta quantidade de grupos amino livres em função da enzima transglutaminase e *Spirulina*. A curva de contorno mostra que a quantidade de grupos amino foi menor quando foi utilizada a menor concentração de *Spirulina* e teor de transglutaminase em torno de 0,6%, obtendo-se 0,2µg de grupos amino livre/g de massa. O aumento no teor de *Spirulina* aumenta a quantidade de grupos amino livres, indicando que a enzima está atuando mais sobre as proteínas da farinha de arroz do que sobre as proteínas da microalga na formação de ligações cruzadas.

Foi reportada, por Gujral e Rosell (2004), uma diminuição na quantidade de grupos amino livres na massa de farinha de arroz tratada com teores de 0,5 a 1% de transglutaminase. Também Figueira (2010) obteve menor quantidade de grupos amino livres (0,20 µg/mg) na massa fermentada de pão de farinha de arroz, quando usou maior teor de transglutaminase (0,8%). No entanto, quando uma segunda fonte proteica está envolvida na reação de

catalisação pela enzima transglutaminase, dependendo do tipo de proteína, podem ocorrer alterações na quantidade de grupos amino livres.

Figura 5 - Curva de contorno para a resposta grupos amino livres ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de massa) em função da concentração de *Spirulina* e transglutaminase



Marco e Rosell (2008b) estudando o efeito de diferentes isolados proteicos e transglutaminase nas propriedades da farinha de arroz, obtiveram redução da quantidade de grupos amino livres na massa de farinha de arroz com isolado de ervilha, soja e soro do leite, mas, quando a enzima transglutaminase foi adicionada à massa de farinha de arroz com isolado proteico da albumina do ovo, houve aumento na quantidade de grupos amino livres.

Segundo Matsumura et al. (1996), a formação de ligações cruzadas entre proteínas pela ação da transglutaminase é determinada pela estrutura molecular da proteína e da acessibilidade da enzima aos resíduos de lisina e glutamina.

A carência em aminoácidos sulfurados e lisina é característico do perfil aminoacídico de algas verdes azuis (JACOB-LOPES et al., 2006; VOLKMANN et al., 2008), como a *Spirulina*. Desta forma, a escassez de lisina na amostra para a reação poderia limitar a ação da enzima transglutaminase.

5.2.2. Avaliação tecnológica dos pães

A matriz do planejamento com valores reais e codificados das variáveis e as respostas volume específico e firmeza do miolo dos pães podem ser visualizados na Tabela 9. Observa-se que os valores de volume específico dos pães apresentaram uma variação de 2,23 a 2,90 mL/g e os valores de firmeza do miolo apresentaram variação de 331,54 a 743,21 g-força.

Tabela 9 – Valores de volume específico e firmeza do miolo dos pães de farinha de arroz dos ensaios do delineamento experimental

| Ensaio | Metilcelulose* (%) | Transglutaminase* (%) | <i>Spirulina</i> * (%) | VE** (mL/g) | Firmeza (g-força) |
|--------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|------------------------|
| 1 | 1,08 (-1) | 0,36 (-1) | 1,60 (-1) | 2,43 | 544,17 |
| 2 | 1,92 (1) | 0,36 (-1) | 1,60 (-1) | 2,68 | 415,12 |
| 3 | 1,08 (-1) | 0,84 (1) | 1,60 (-1) | 2,27 | 743,21 |
| 4 | 1,92 (1) | 0,84 (1) | 1,60 (-1) | 2,72 | 376,81 |
| 5 | 1,08 (-1) | 0,36 (-1) | 3,40 (1) | 2,62 | 531,35 |
| 6 | 1,92 (1) | 0,36 (-1) | 3,40 (1) | 2,90 | 401,94 |
| 7 | 1,08 (-1) | 0,84 (1) | 3,40 (1) | 2,41 | 609,43 |
| 8 | 1,92 (1) | 0,84 (1) | 3,40 (1) | 2,67 | 574,80 |
| 9 | 0,80 (-1,68) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 2,23 | 694,02 |
| 10 | 2,20 (+1,68) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 2,69 | 641,39 |
| 11 | 1,50 (0) | 0,20 (-1,68) | 2,50 (0) | 2,80 | 331,54 |
| 12 | 1,50 (0) | 1,00 (+1,68) | 2,50 (0) | 2,72 | 385,78 |
| 13 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 1,00 (-1,68) | 2,59 | 452,11 |
| 14 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 4,00 (+1,68) | 2,66 | 409,99 |
| 15 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 2,71 | 358,09 |
| 16 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 2,65 | 481,24 |
| 17 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 2,55 | 423,61 |

* (%) g de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* / 100g de farinha de arroz; **VE: volume específico

5.2.2.1. Volume específico

Pelos resultados da análise de regressão, para o volume específico, foram significativos ($p < 0,10$) os termos lineares das variáveis metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* e o termo quadrático da variável metilcelulose. Na Tabela 10, estão apresentados os resultados da análise de variância com o coeficiente de correlação (R), o coeficiente de determinação (R^2), os valores de F calculado e tabelado e o valor da relação F_{cal}/F_{tab} para a resposta volume específico dos pães.

Tabela 10 - Análise de variância para a resposta volume específico dos pães

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F calculado | F tabelado | F_{cal}/F_{tab} |
|-------------------|--------|----|--------|-------------|------------|-------------------|
| Regressão | 0,4328 | 4 | 0,1082 | 16,90 | 2,48 | 6,81 |
| Resíduo | 0,0768 | 14 | 0,0064 | | | |
| Total | 0,5096 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; $R^2=0,85$; $R=0,92$

A análise de variância mostra que o valor da relação F_{cal}/F_{tab} foi significativo e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 85%. Isto possibilitou estabelecer um modelo matemático preditivo, com as variáveis codificadas, que representa a resposta de volume específico dos pães em função das variáveis metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina*, como mostra a Equação 9.

$$\text{Volume específico} = 2,67 + 0,15.X_1 - 0,07.X_1^2 - 0,05.X_2 + 0,05.X_3 \quad (9)$$

Onde:

X_1 : metilcelulose

X_2 : transglutaminase

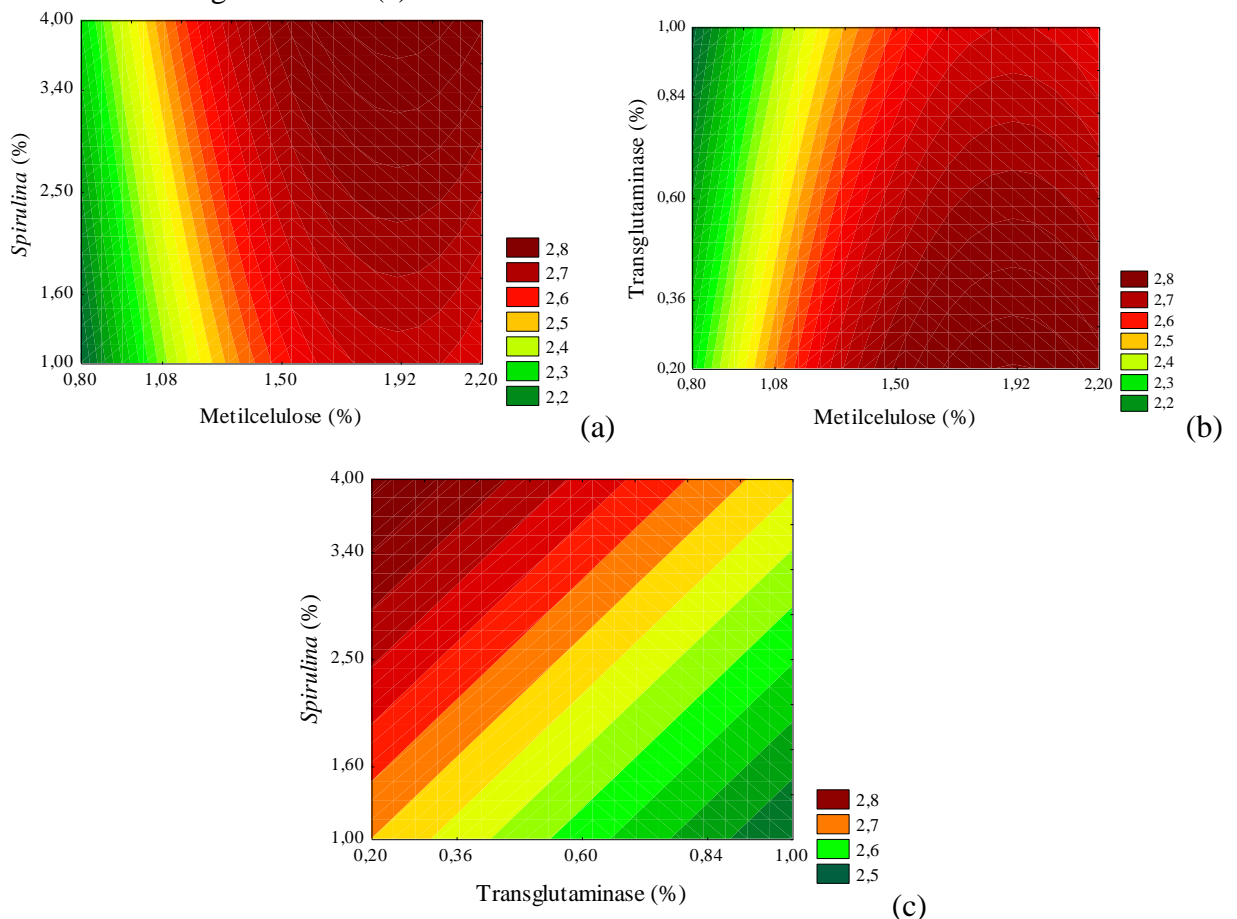
X_3 : *Spirulina*

De acordo com a equação do modelo, a variável concentração de transglutaminase afetou negativamente o volume específico, enquanto que as quantidades de metilcelulose e de *Spirulina* influenciaram positivamente no aumento do volume específico dos pães. Com base

neste modelo matemático, na Figura 6, estão representadas as curvas de contorno para a resposta volume específico dos pães.

A Figura 6 mostra que o volume específico dos pães foi maior quando foram adicionadas concentrações de *Spirulina* entre 3,4 e 4%, concentração de metilcelulose em torno de 1,92 e teor de transglutaminase de 0,2%, obtendo-se um valor de 2,8 mL/g. Este resultado nos mostra que o uso de hidrocolóides é importante em produtos livres de glúten, porque envolve a formação de uma rede tridimensional semelhante ao glúten. O hidrocolóide metilcelulose contém grupos hidrofóbicos que provocam o aumento da atividade interfacial no sistema da massa durante a fermentação e a formação de rede de gel pelo aquecimento durante o processo de panificação (LAZARIDOU et al., 2007).

Figura 6 - Curvas de contorno para o volume específico (mL/g) em função do teor de *Spirulina* e metilcelulose (a), transglutaminase e metilcelulose (b) e *Spirulina* e transglutaminase (c)



Marco e Rosell (2008a) constataram um aumento no volume específico de pães de arroz com isolado proteico de soja quando foi adicionado HPMC na formulação. O aumento

do volume específico do pão pela adição do hidrocolóide pode ser devido à sua capacidade de reter água e também à formação de uma rede de gel durante o aquecimento no processo de panificação. Esta rede irá aumentar a viscosidade e também dará mais resistência à massa para a expansão das células de gás. Como resultado, haverá maior retenção de gás durante o cozimento, melhorando o volume do pão.

Figueira et al. (2011) observaram que a adição de *Spirulina platensis* até 4%, em base à farinha de arroz, não causou diferença significativa no volume dos pães de farinha de arroz, quando as concentrações de hidrocolóide e de transglutaminase foram de 2,0% e 0,5%, respectivamente. Contrariamente, no presente estudo, o aumento da concentração de *Spirulina* afetou positivamente o volume específico dos pães. O aumento do volume específico dos pães pelo incremento da concentração de *Spirulina* pode ser explicado pela ação geleificante e emulsificante de exopolissacarídeos produzidos pelas cianobactérias. Estes polissacarídeos podem ser encontrados formando cápsulas ou como massa mucilaginosa ligada às células (OTERO; VINCENZINI, 2003).

O aumento da concentração da transglutaminase provocou um efeito negativo no volume específico dos pães. Gujral e Rosell (2004) verificaram aumento de 46% no volume específico de pão com farinha de arroz quando foi adicionado 1% de transglutaminase. No entanto, Marco e Rosell (2008a), estudando o efeito da adição individual de isolado proteico de soja, HPMC e transglutaminase em pães de arroz, constataram que a adição da enzima transglutaminase não alterou o volume específico de pães de arroz com isolado proteico de soja e HPMC.

5.2.2.2. Firmeza do miolo

Pelos resultados da análise de regressão para a firmeza do miolo, foram significativos ($p < 0,10$) os termos linear e quadrático da variável teor de metilcelulose. Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da análise de variância com o coeficiente de correlação (R), o coeficiente de determinação (R^2), os valores de F calculado e tabelado e a relação F_{cal}/F_{tab} para a resposta firmeza do miolo dos pães.

Tabela 11 - Análise de variância para a variável firmeza do miolo dos pães

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F calculado | F tabelado | F _{cal} /F _{tab} |
|-------------------|----------|----|----------|-------------|------------|------------------------------------|
| Regressão | 160245,7 | 2 | 80122,85 | 13,00 | 2,73 | 4,76 |
| Resíduo | 86260,9 | 14 | 6161,49 | | | |
| Total | 246506,0 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; $R^2=0,65$; $R=0,80$

A Tabela 11 mostra que o valor da relação F_{cal}/F_{tab} foi significativo (4,76), no entanto, a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi baixa (65%), concluindo então que o modelo não se ajusta bem aos dados experimentais, portanto não foi possível gerar a equação do modelo e tampouco as curvas de contorno para a resposta firmeza do miolo dos pães.

Na Tabela 9, pode-se observar que a menor firmeza do miolo encontrada foi de 331,54 g-força observada no ensaio 11 (1,50% de metilcelulose, 0,20% de transglutaminase e 2,50% de *Spirulina*) e a maior firmeza foi de 743,21 g-força no ensaio 3 (1,08% de metilcelulose, 0,84% de transglutaminase e 1,60% de *Spirulina*). Pode-se observar que o pão de miolo mais macio foi o que obteve o segundo maior volume específico (2,80 mL/g), enquanto que o pão de miolo mais firme foi aquele que apresentou o segundo menor volume específico (2,27 mL/g). A firmeza do miolo dos pães está relacionada com o seu volume específico; geralmente, pães com alto volume específico apresentam miolo mais macio, enquanto que, pães de baixo volume específico possuem miolo mais firme. Isso ocorre pela compactação do miolo devido à maior ou menor formação, expansão e retenção de células de gás na massa durante a fermentação e assamento do pão.

5.2.2.3. Parâmetros de cor do miolo

A cor é o primeiro critério utilizado na aceitação ou rejeição do produto pelo consumidor, por isso na indústria de alimentos a cor é um atributo importante (Bobbio e Bobbio, 1992). A Tabela 12 mostra a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis e das respostas luminosidade (L^*), croma a^* , croma b^* , ângulo Hue (h°) e C^* do miolo dos pães.

Analisando a Tabela 12, verifica-se que os valores obtidos para a luminosidade do miolo variaram de 34,12 (ensaio 7) a 50,00 (ensaio 4); para o parâmetro croma a^* , os valores variaram de 2,38 (ensaio 13) a 4,27 (ensaio 8); no parâmetro croma b^* , os valores variaram

de 26,82 (ensaio 7) a 34,96 (ensaio 10); os valores encontrados para o h° (ângulo de matiz) foram de 72,74° (ensaio 8) a 85,66° (ensaio 13); para a C^* (saturação ou cromaticidade), houve variação de 27,06 (ensaio 7) a 35,13 (ensaio 10).

Tabela 12 – Valores dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , h° e C^*) do miolo dos pães

| Ensaio | MC (%) | TG (%) | <i>Spirulina</i> (%) | L^* | a^* | b^* | h° | C^* |
|--------|--------------|--------------|----------------------|-------|-------|-------|-----------|-------|
| 1 | 1,08 (-1) | 0,36 (-1) | 1,60 (-1) | 41,25 | 2,62 | 30,05 | 85,00 | 30,16 |
| 2 | 1,92 (1) | 0,36 (-1) | 1,60 (-1) | 47,64 | 2,98 | 34,39 | 85,04 | 34,52 |
| 3 | 1,08 (-1) | 0,84 (1) | 1,60 (-1) | 40,97 | 3,10 | 29,91 | 84,07 | 30,07 |
| 4 | 1,92 (1) | 0,84 (1) | 1,60 (-1) | 50,00 | 2,90 | 34,68 | 85,20 | 34,80 |
| 5 | 1,08 (-1) | 0,36 (-1) | 3,40 (1) | 34,38 | 2,86 | 27,23 | 83,88 | 27,31 |
| 6 | 1,92 (1) | 0,36 (-1) | 3,40 (1) | 41,18 | 3,70 | 33,61 | 83,70 | 33,81 |
| 7 | 1,08 (-1) | 0,84 (1) | 3,40 (1) | 34,12 | 3,58 | 26,82 | 82,40 | 27,06 |
| 8 | 1,92 (1) | 0,84 (1) | 3,40 (1) | 40,77 | 4,27 | 33,55 | 72,74 | 33,82 |
| 9 | 0,80 (-1,68) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 34,70 | 3,25 | 27,19 | 83,19 | 27,39 |
| 10 | 2,20 (+1,68) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 46,58 | 3,44 | 34,96 | 84,38 | 35,13 |
| 11 | 1,50 (0) | 0,20 (-1,68) | 2,50 (0) | 39,25 | 2,67 | 30,46 | 84,97 | 30,55 |
| 12 | 1,50 (0) | 1,00 (+1,68) | 2,50 (0) | 40,80 | 3,39 | 31,70 | 83,89 | 31,88 |
| 13 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 1,00 (-1,68) | 49,36 | 2,38 | 31,42 | 85,66 | 31,51 |
| 14 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 4,00 (+1,68) | 35,13 | 2,56 | 28,79 | 84,92 | 28,91 |
| 15 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 41,53 | 3,34 | 32,72 | 84,17 | 32,89 |
| 16 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 39,70 | 3,26 | 31,22 | 84,02 | 31,39 |
| 17 | 1,50 (0) | 0,60 (0) | 2,50 (0) | 35,11 | 3,14 | 28,64 | 83,72 | 28,81 |

MC= metilcelulose; TG= transglutaminase; % de MC, TG e *Spirulina* em base à farinha de arroz

a) Luminosidade (L^*) do miolo

Para se obter uma estimativa do escurecimento, a coordenada L^* tem sido frequentemente utilizada; assim, quanto maior seu valor, mais clara é a amostra e, portanto, menor é o escurecimento. Segundo Cohen e Jackix (2005), os valores de L^* variam de 0 (preto) a 100 (branco) e normalmente valores abaixo de 50 ($L^* < 50$) são consideradas cores escuras.

A análise da regressão dos valores de luminosidade do miolo mostrou que foram significativos ($p < 0,10$) o termos lineares das variáveis teor de metilcelulose e de *Spirulina* e o termo quadrático da *Spirulina*. A Tabela 13 mostra os resultados da análise de variância com o coeficiente de correlação (R), o coeficiente de determinação (R^2), os valores de F calculado e tabelado e a relação F_{cal}/F_{tab} para a resposta luminosidade do miolo dos pães.

Tabela 13 - Análise de variância para a variável luminosidade do miolo dos pães

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F calculado | F tabelado | F_{cal}/F_{tab} |
|-------------------|--------|----|--------|-------------|------------|-------------------|
| Regressão | 395,92 | 3 | 131,97 | 50,37 | 2,56 | 19,67 |
| Resíduo | 34,09 | 13 | 2,62 | | | |
| Total | 430,01 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; $R^2=0,92$; $R=0,96$

O valor da relação F_{cal}/F_{tab} foi significativo (19,67) e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi alta (92%). Assim as variáveis independentes apresentaram efeito significativo sobre os valores de luminosidade do miolo, possibilitando estabelecer um modelo matemático preditivo, dentro das condições de estudo.

O modelo matemático com as variáveis codificadas que representa as respostas de luminosidade do miolo dos pães em função das variáveis metilcelulose e *Spirulina*, está representado na Equação 10.

$$L^* \text{ do miolo} = 39,93 + 3,57X_1 - 3,90X_3 + 0,99X_3^2 \quad (10)$$

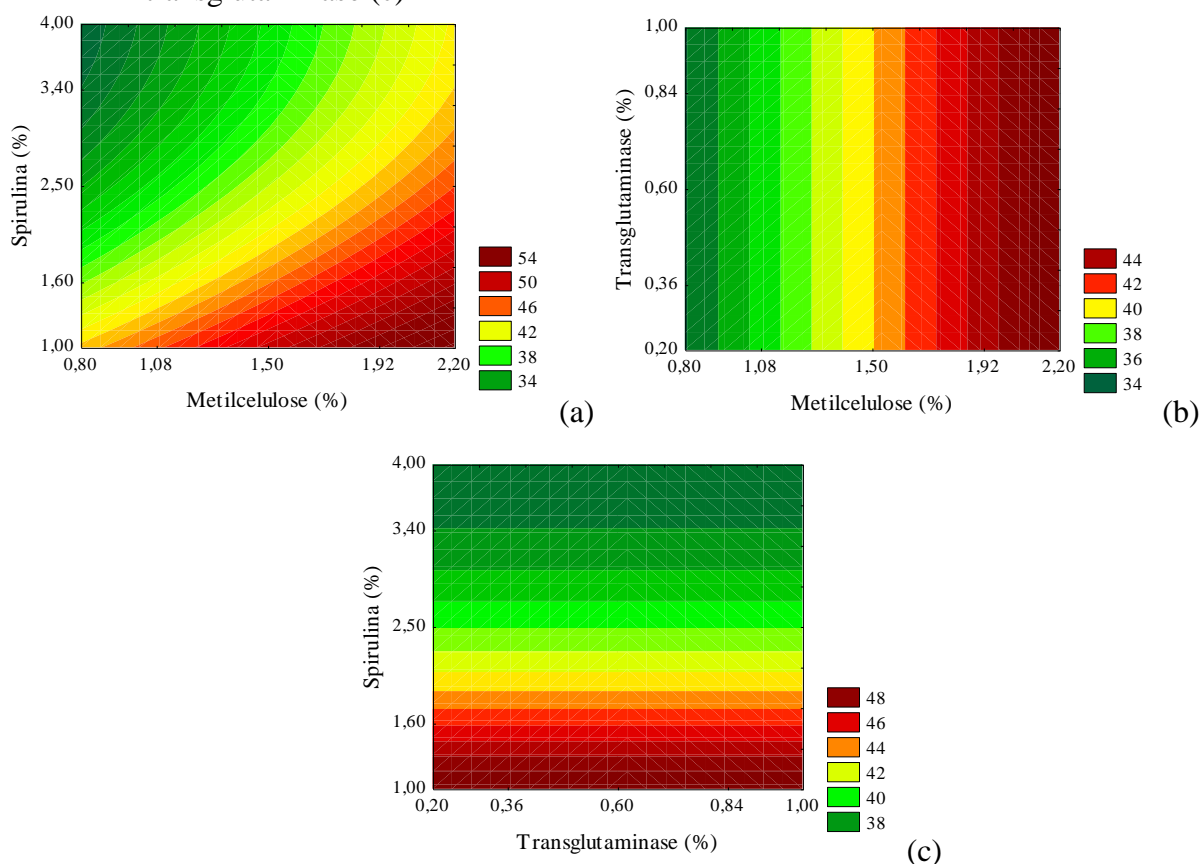
Onde:

X_1 : teor de metilcelulose

X_3 : teor de *Spirulina*

De acordo com os resultados apresentados nas curvas de contorno da Figura 7, o aumento da luminosidade do miolo foi decorrente do aumento do teor de metilcelulose e diminuição do teor de *Spirulina*. Assim, maiores quantidades de metilcelulose e menores quantidades de *Spirulina* tornam o miolo do pão de farinha de arroz mais claro.

Figura 7 - Curvas de contorno para a luminosidade do miolo em função do teor de *Spirulina* e de metilcelulose (a), de transglutaminase e de metilcelulose (b) e de *Spirulina* e transglutaminase (c)



A adição progressiva de *Spirulina* causa uma diminuição da luminosidade, ou seja, torna o miolo do pão mais escuro, devido à cor verde escura da microalga. Figueira et al. (2011) também obtiveram redução da luminosidade do miolo com o aumento da concentração de *Spirulina* adicionada. O aumento da concentração de metilcelulose afeta a luminosidade dos pães tornando-os mais claros provavelmente devido à melhor retenção do oxigênio no interior da massa durante o amassamento, tornando mais fina e uniforme a distribuição das células do miolo.

b) Cromo a* do miolo

Observando a Tabela 12, nota-se que os valores encontrados para a resposta cromia a* do miolo são positivos, variando de 2,38 (ensaio 13) a 4,27 (ensaio 8). Através da análise de regressão foi verificado que os termos lineares das variáveis teor de transglutaminase e de *Spirulina* e o termo quadrático do teor de *Spirulina* foram estatisticamente significativos ao nível de 10%.

A Tabela 14 mostra a análise da variância para a resposta croma a^* do miolo dos pães com o coeficiente de correlação (R), o coeficiente de determinação (R^2), os valores de F calculado e tabelado e a relação F_{cal}/F_{tab} para a resposta a^* do miolo dos pães.

Tabela 14 - Análise de variância para a variável a^* do miolo dos pães

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | $F_{calculado}$ | $F_{tabelado}$ | F_{cal}/F_{tab} |
|-------------------|--------|----|--------|-----------------|----------------|-------------------|
| Regressão | 2,0000 | 3 | 0,6666 | 5,48 | 2,56 | 2,14 |
| Resíduo | 1,5817 | 13 | 0,1216 | | | |
| Total | 3,5765 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; $R^2=0,56$; $R=0,74$

Os valores obtidos apresentaram baixa porcentagem da variação explicada ($R^2=56\%$) e baixa relação F_{cal}/F_{tab} , portanto, o modelo não é significativo nem preditivo. Assim não foi possível estabelecer uma equação do modelo, tampouco as curvas de contorno.

Os valores apresentados na Tabela 12 para o parâmetro a^* do miolo demonstram que a cor obtida é avermelhada tendendo à neutralidade, uma vez que o C^* se aproxima do zero.

Normalmente, pães elaborados com a microalga *Spirulina* tendem a ser verdes devido à cor verde-azulada característica das cianobactérias. Esta cor característica origina-se dos pigmentos ficocianinas que possuem coloração azul, juntamente com a clorofila α , que possui coloração verde (MINKOVA et al., 2003). Figueira (2010) produziu pães com concentrações de 2 a 5 % de *Spirulina platensis* e obteve pães com croma a^* do miolo de -8,16 a -5,67 respectivamente, indicando que os pães eram esverdeados, diferente dos obtidos neste estudo .

Segundo Schoefs (2002), as clorofilas são relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e à degradação química. A perda de cor durante o armazenamento sob congelamento é atribuída ao desvanecimento da cor verde vívida da clorofila a a uma cor marrom azeitona, característica da feofitina (HEATON; MARANGONI, 1996). Assim, é provável que durante os processos de obtenção da microalga seca e moída ou da cocção dos pães tenha ocorrido uma degradação dos pigmentos responsáveis pela cor característica da microalga.

c) Cromo b* do miolo

Na Tabela 12, observa-se que os valores da resposta b* do miolo são positivos e variaram de 26,82 (ensaio 7) a 34,96 (ensaio 10), portanto, correspondem à cor amarela. A análise da regressão mostrou que os termos lineares das variáveis teor de metilcelulose e de *Spirulina* foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

A Tabela 15 apresenta os resultados da análise de variância com o coeficiente de correlação (R), o coeficiente de determinação (R^2), os valores de F (calculado e tabelado) e a relação $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ para a resposta b* do miolo dos pães.

Tabela 15 - Análise de variância para a variável b* do miolo dos pães

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F calculado | F tabelado | F _{cal} /F _{tab} |
|-------------------|--------|----|-------|-------------|------------|------------------------------------|
| Regressão | 102,02 | 2 | 51,01 | 49,04 | 2,73 | 17,96 |
| Resíduo | 14,58 | 14 | 1,04 | | | |
| Total | 116,60 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; $R^2=0,87$; $R=0,93$

Pela Tabela 15, observa-se que o valor da relação $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ foi significativo (17,96) e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 87%. Portanto as variáveis independentes apresentaram um efeito significativo sobre os valores de b* do miolo, possibilitando estabelecer um modelo matemático preditivo.

O modelo matemático com as variáveis codificadas que representam as respostas de b* do miolo dos pães em função das variáveis metilcelulose e *Spirulina* está representado na Equação 11.

$$\text{Croma b* do miolo} = 31,02 + 2,58X_1 - 0,89X_3 \quad (11)$$

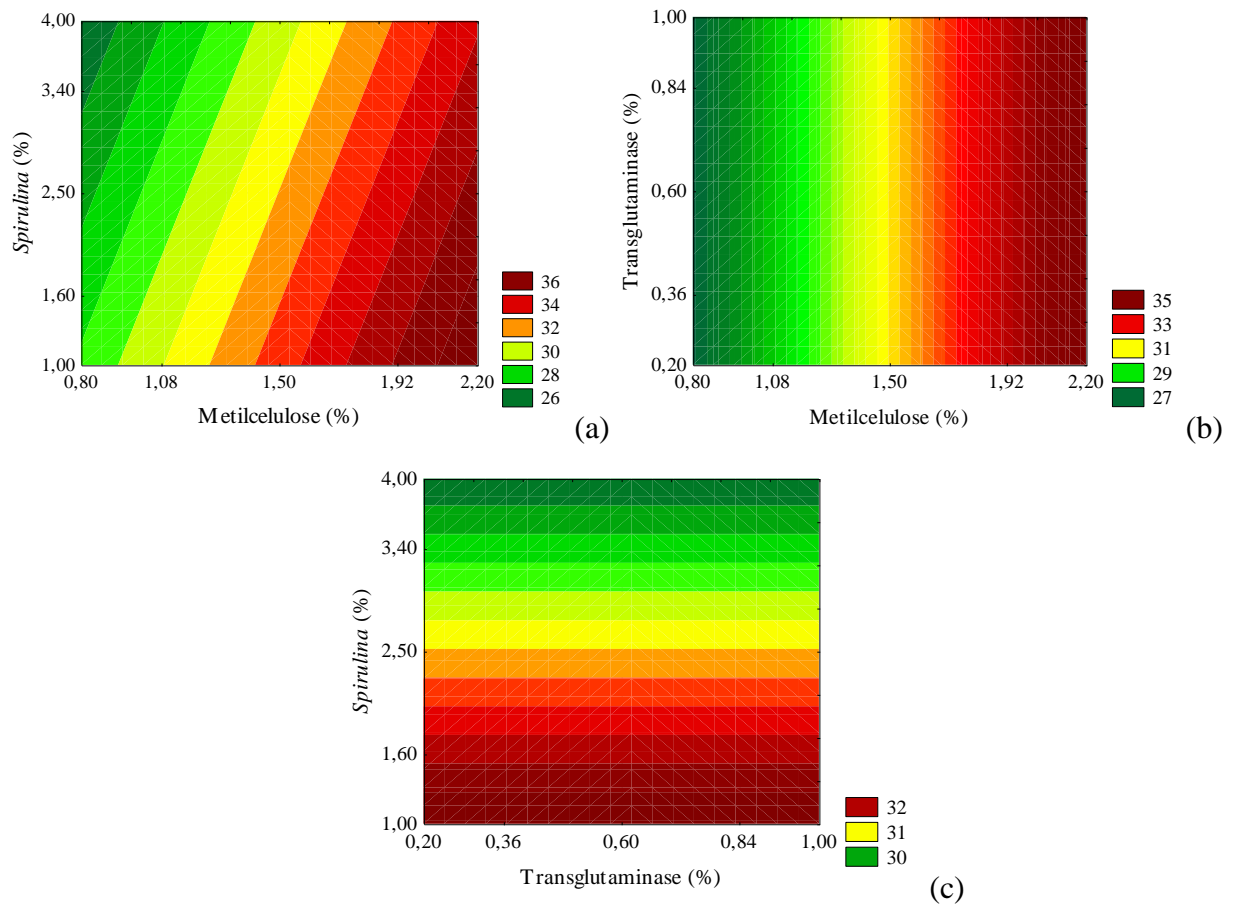
Onde:

X1: teor de metilcelulose

X3: teor de *Spirulina*

A partir do modelo matemático foi possível gerar as curvas de contorno apresentadas na Figura 8.

Figura 8 - Curvas de contorno para a coordenada b^* do miolo em função do teor de *Spirulina* e metilcelulose (a), transglutaminase e metilcelulose (b) *Spirulina* e transglutaminase (c)



Como mostram as curvas de contorno da Figura 8, quanto maior o nível de metilcelulose, mais amarelada a cor do miolo dos pães, enquanto que quanto maior o teor de *Spirulina*, menos amarelado o miolo.

Figueira (2010) obteve valores de 11,48 a 14,66 para a variável b^* do miolo de pães de farinha de arroz adicionados de *Spirulina platensis* em concentrações de 5% e 2% respectivamente. Estes valores são bem inferiores aos encontrados no presente estudo, no entanto, a adição de *Spirulina* afeta da mesma forma a intensidade do amarelo.

A ficocianina é o pigmento fotossintético de maior concentração na microalga *Spirulina platensis*, constituindo até 20% do peso seco da proteína celular (SILVEIRA et al., 2007). Segundo estudos sobre a extração da ficocianina da microalga *Spirulina platensis*, o pigmento é afetado por altas temperaturas, perdendo sua cor característica (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). Pelos valores apresentados neste estudo, o miolo dos pães tendeu mais à coloração amarela, talvez devido a algum processo de degradação da ficocianina durante os processos de obtenção da *Spirulina* seca e moída.

d) Ângulo de matiz (h°) do miolo

Pode-se observar na Tabela 12, que os valores encontrados para a resposta h° do miolo dos pães ficaram entre 72,74° (ensaio 8) e 85,66° (ensaio 13).

Foi verificado através da análise da regressão que os termos lineares das variáveis teor de transglutaminase e de *Spirulina* e o termo quadrático do teor de *Spirulina* foram estatisticamente significativos ao nível de 10% para a resposta ângulo de matiz.

A Tabela 16 mostra a análise de variância para a resposta h° do miolo dos pães com o coeficiente de correlação (R), o coeficiente de determinação (R²), os valores de F calculado e tabelado e a relação F_{cal}/F_{tab} para a resposta ângulo de matiz do miolo dos pães.

Tabela 16 - Análise de variância para a variável h° do miolo dos pães

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F calculado | F tabelado | F _{cal} /F _{tab} |
|-------------------|---------|----|--------|-------------|------------|------------------------------------|
| Regressão | 8,2674 | 3 | 2,7558 | 7,96 | 2,56 | 3,11 |
| Resíduo | 4,4970 | 13 | 0,3459 | | | |
| Total | 12,7645 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; R²=0,65; R=0,80

O valor da relação F_{cal}/F_{tab} foi significativo, no entanto, a porcentagem da variação explicada (R²=65%) foi não significativa. Assim não foi possível estabelecer uma equação do modelo nem as curvas de contorno.

Os resultados obtidos para o ângulo de matiz indicaram que a cor do miolo dos pães é amarela avermelhada, já que os valores encontrados ficam entre os ângulos 0°(vermelho) e 90° (amarelo). O ângulo de matiz, indica a dominância de alguma tonalidade na cor, sendo resultante das coordenadas a* e b*. Desse modo, o ângulo de matiz apresentou comportamento semelhante ao croma b*, devido ao seu maior valor em relação ao croma a*.

Figueira (2010) encontrou valores de 119,53° a 116,28° de ângulo de matiz do miolo de pães de farinha de arroz adicionados de *Spirulina platensis* nas concentrações de 2% a 5%. Os resultados obtidos por esse autor também correspondem à coloração amarela, pois estão mais próximos do ângulo de 90°.

e) Saturação ou Cromaticidade (C*) do miolo

Na Tabela 12, estão apresentados os valores obtidos para a resposta C* do miolo que variaram de 27,06 (ensaio 7) a 35,13 (ensaio 10). Através dos resultados da análise da regressão foi verificado que apenas os termos lineares do teor de metilcelulose e de *Spirulina* foram significativos ao nível de 10% para esta resposta.

A análise de variância apresentada na Tabela 17 mostra o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de correlação (R), os valores de F calculado e tabelado e a relação F_{cal}/F_{tab} para a variável cromaticidade do miolo dos pães.

Tabela 17 - Análise de variância para a variável C* do miolo dos pães

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F calculado | F tabelado | F _{cal} /F _{tab} |
|-------------------|--------|----|-------|-------------|------------|------------------------------------|
| Regressão | 102,01 | 2 | 51,00 | 47,66 | 2,73 | 17,46 |
| Resíduo | 15,05 | 14 | 1,07 | | | |
| Total | 117,06 | 16 | | | | |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média quadrática; $R^2=0,87$; $R=0,93$

Pelos resultados da análise de variância pode-se observar que o valor da relação F_{cal}/F_{tab} (17,46) e o coeficiente de determinação (87%) foram significativos; assim, pode-se chegar a um modelo matemático preditivo e gerar as curvas de contorno para a resposta C* do miolo. O modelo matemático com as variáveis codificadas que representa a resposta em função das variáveis metilcelulose e *Spirulina* está representado na Equação 12.

$$\text{Cromaticidade do miolo} = 31,17 + 2,59X_1 - 0,87X_3 \quad (12)$$

Onde:

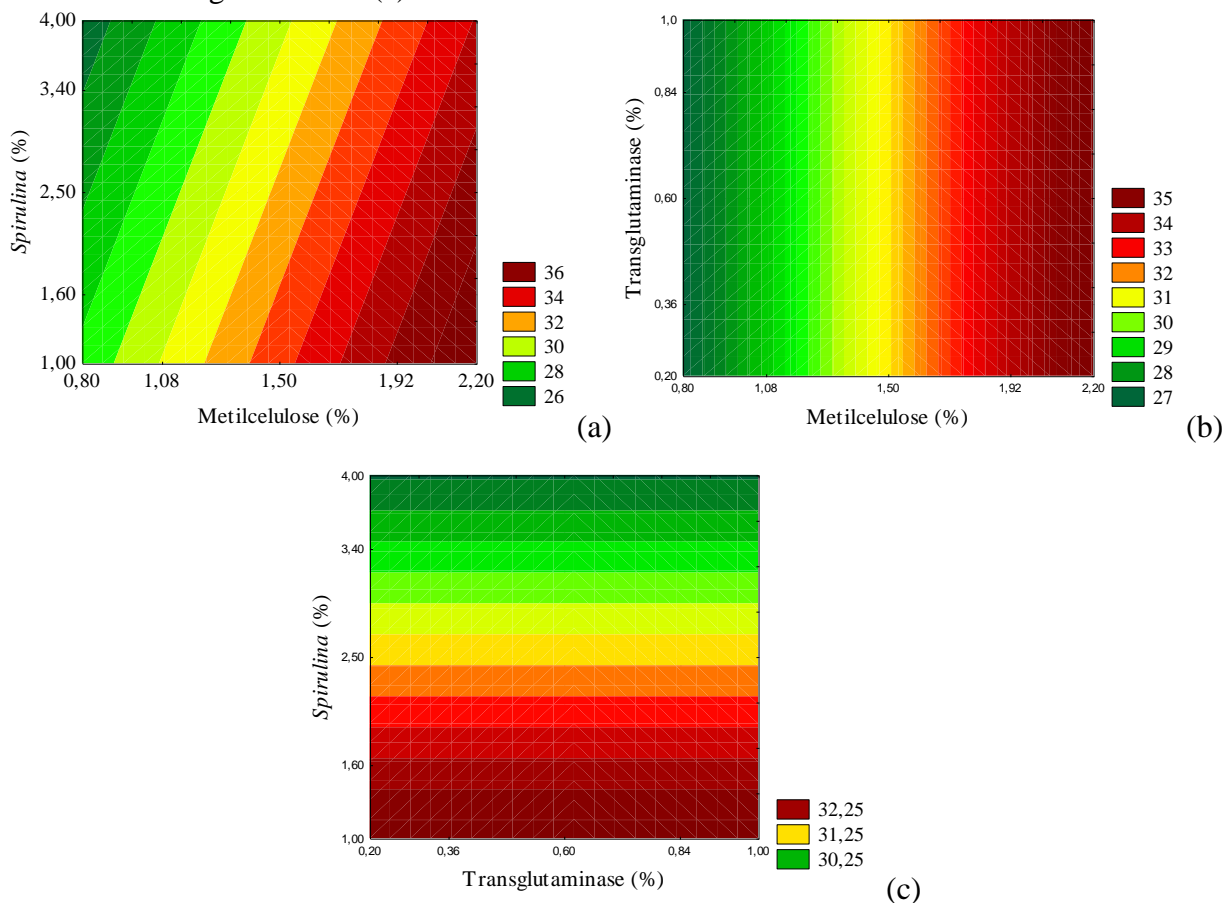
X_1 : metilcelulose

X_3 : *Spirulina* LEB 18

De acordo com as curvas de contorno para a variável C* do miolo, apresentadas na Figura 9, quanto maior o teor de metilcelulose e menor o de *Spirulina* mais a cor do miolo se distancia do cinza e se aproxima da cor pura amarela.

A saturação ou cromaticidade é o desvio a partir do ponto correspondente ao cinza no eixo L ou de luminosidade. Quanto mais distante do eixo, mais saturada será a cor.

Figura 9 - Curvas de contorno para a variável C^* do miolo em função do teor de *Spirulina* e metilcelulose (a), transglutaminase e metilcelulose (b) e *Spirulina* e transglutaminase (c)



Figueira (2010) mostrou que, com o aumento da concentração de *Spirulina* adicionada aos pães, houve redução do valor de cromaticidade do miolo. O mesmo ocorreu no presente trabalho; enquanto que o aumento da concentração de metilcelulose aumentou os valores de C^* , fazendo com que a cor amarela fique mais saturada, se aproximando da cor pura.

Estes resultados corroboram aos encontrados para o parâmetro b^* do miolo, mostrando que as variáveis metilcelulose e *Spirulina* afetam da mesma forma os dois parâmetros. E assim, como nos demais parâmetros de cor, os resultados foram influenciados pela degradação da cor verde-azulada da microalga.

5.3. Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada dos pães

A estrutura da massa dos pães A, B e C de farinha de arroz, após a 2ª fermentação, foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

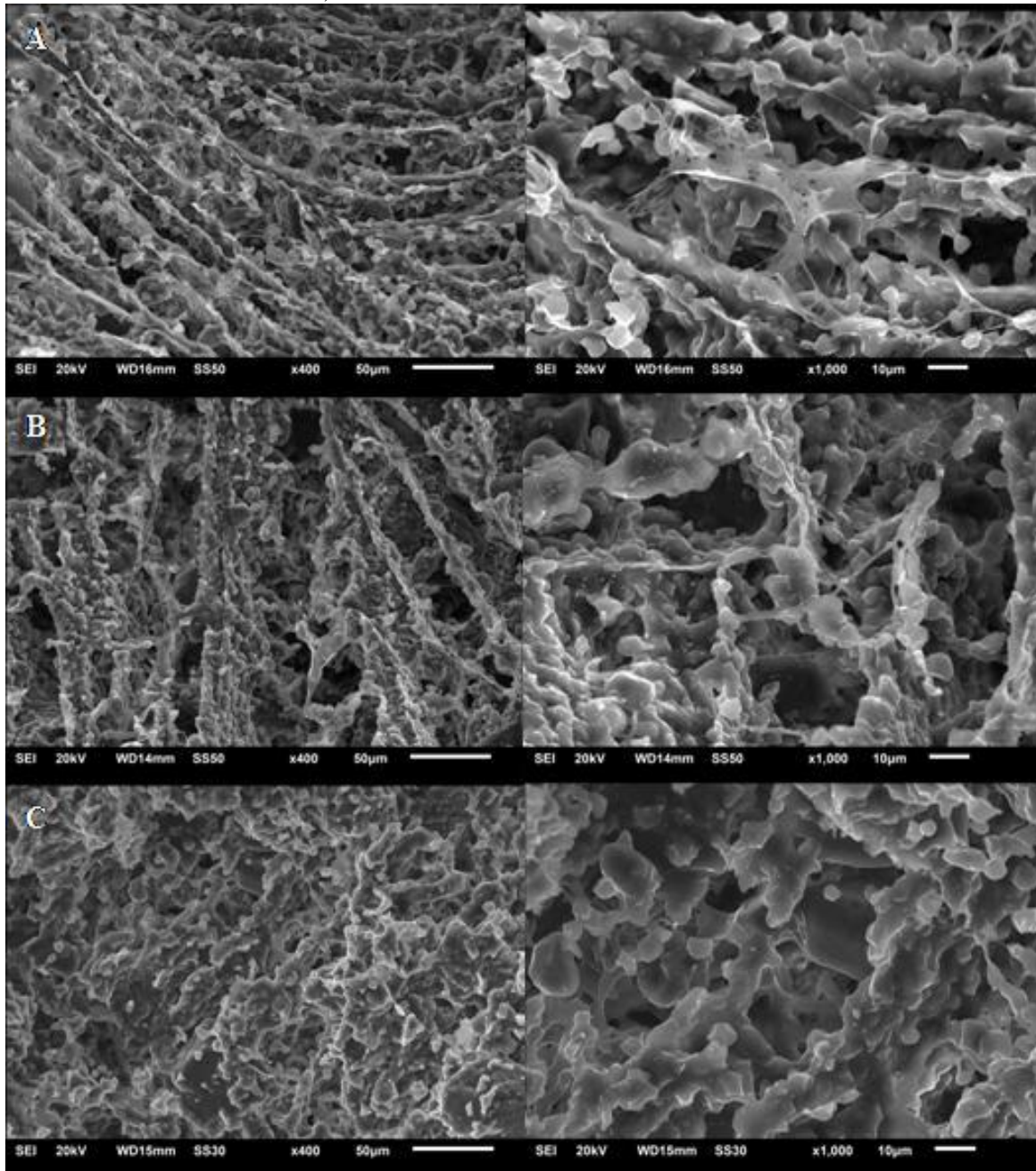
Na literatura não foram encontrados estudos sobre a estrutura de massa fermentada de pães de farinha de arroz, tampouco utilizando a adição de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina*. No entanto, alguns autores estudaram a microestrutura de farinhas de arroz e trigo.

Roman-Gutiérrez, Guilbert e Cuq (2002) estudaram as mudanças na microestrutura na farinha de trigo e de seus componentes durante a hidratação usando a microscopia eletrônica de varredura. Estes autores observaram que os grânulos de amido não parecem perder a sua estrutura granular durante a hidratação e que os outros componentes (glúten, pentosanas) parecem formar (depois de 10 a 15 minutos), uma fase homogênea, mais ou menos aquosa, com moléculas parcialmente solubilizadas. No presente estudo também foram observados grânulos de amido intactos e imersos em uma substância homogênea e densa (Figura 10).

Marco e Rosell (2008a) utilizaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o objetivo de observar o efeito da adição de proteína isolada de soja, HPMC e transglutaminase na microestrutura do miolo do pão de arroz. O miolo de pão de farinha de arroz apresentou uma matriz proteica interrompida, apresentando uma estrutura densa. Quando a transglutaminase foi adicionada, a estrutura do miolo parecia menos desagregada. O miolo do pão de farinha de arroz contendo HPMC e transglutaminase apresentou a melhor estrutura, mostrando ser mais arejada e comparando-se com a estrutura de um pão de trigo.

Como mostra a Figura 10, as estruturas da massa fermentada dos pães de farinha de arroz se assemelham a uma rede de gel, com os grânulos de amido imersos nessa estrutura. As imagens das massas dos pães A e B são muito semelhantes e mostram uma estrutura de rede mais aberta e com estruturas fibrilares, enquanto que a imagem da massa do pão C parece mais compactada, sem estruturas fibrilares, talvez pela maior quantidade de ligações cruzadas provocadas pela ação da enzima transglutaminase e menor presença de proteínas da *Spirulina*. Também é possível haver uma influência da *Spirulina*, já que as massas dos pães A e B possuem o mesmo teor da microalga (4%) e a mesma quantidade de enzima transglutaminase (0,2%).

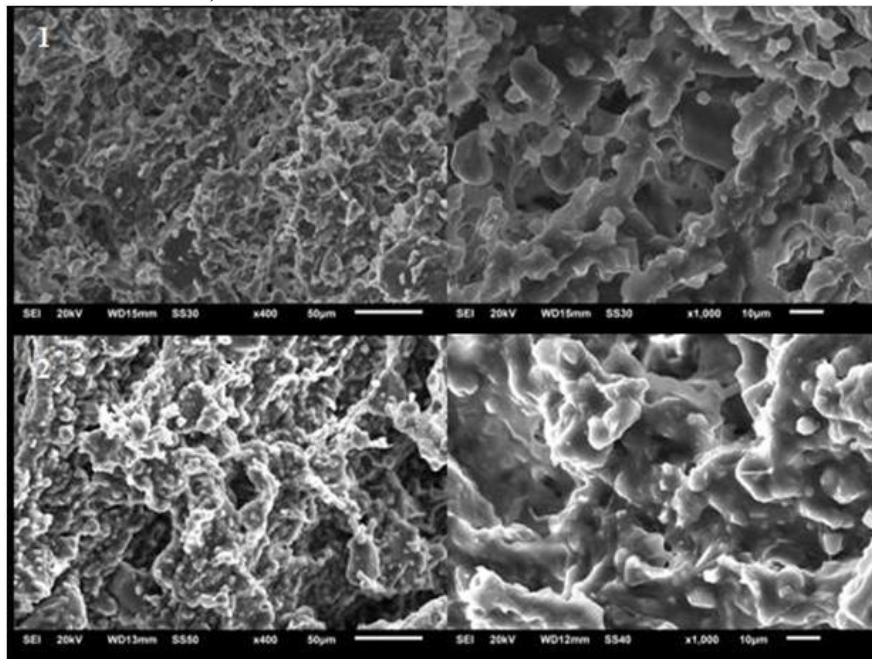
Figura 100 - Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada do pão A (2,2% metilcelulose, 0,2% transglutaminase; 4,0% *Spirulina*); pão B (1,5% metilcelulose, 0,2% transglutaminase; 4,0% *Spirulina*) e pão C (2,2% metilcelulose, 0,6% transglutaminase; 1,0% *Spirulina*) (lado esquerdo: x400; lado direito: x1000)



Marco e Rosell (2008c) também observaram uma massa mais compactada quando foi adicionada a enzima transglutaminase a 1% em uma massa de farinha de arroz. No entanto, a Figura 11 mostra pequena diferença entre as estruturas das massas fermentada do pão C com enzima transglutaminase (1) e sem a enzima transglutaminase (2).

A massa fermentada com a enzima transglutaminase (1) mostra mais ligações entre os grânulos de amido, enquanto que a massa sem a enzima (2) mostra uma estrutura mais densa.

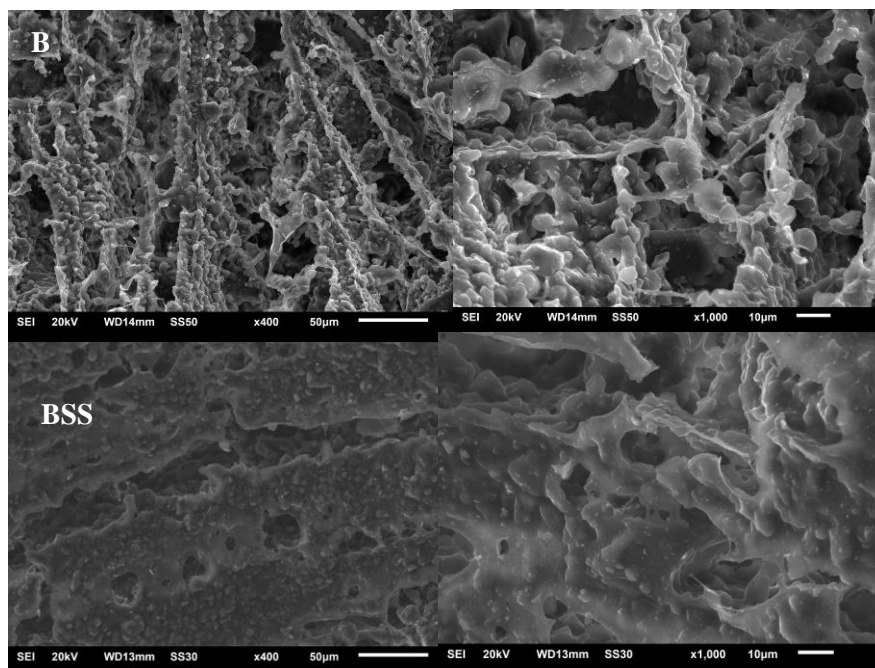
Figura 111 - Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada do pão C com transglutaminase (1) e sem transglutaminase (2) (lado esquerdo: x400; lado direito: x1000)



Possivelmente a maior diferença entre as estruturas das massas dos pães A e B comparadas com o pão C (Figura 10) se deva à quantidade de *Spirulina* adicionada, mostrando uma estrutura mais aberta das massas dos pães A e B.

A Figura 12 mostra a microestrutura, obtida por microscopia eletrônica de varredura, de massas fermentadas de um pão B e de um pão B sem *Spirulina*.

Figura 122 - Microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada do pão B (B) e pão B sem *Spirulina* (BSS) (lado esquerdo: x400; lado direito: x1000)



As imagens da Figura 12 mostraram diferenças entre as estruturas dos pães B com e sem *Spirulina*, confirmando que a microalga produziu mudanças significativas na estrutura da massa fermentada dos pães de arroz, tornando-a mais aberta e formando fibras, enquanto que a massa sem a *Spirulina* apresenta uma estrutura densa e compacta.

5.4. Avaliação tecnológica e composição proximal dos pães A, B e C de farinha de arroz

A seleção das concentrações de *Spirulina* e metilcelulose adicionadas nos pães A e B, foi baseada nas respostas de volume específico e firmeza do miolo dos pães, uma vez que maiores concentrações de *Spirulina* (4%) e teores de 1,5 a 2,2% de metilcelulose aumentaram o volume específico e reduziram a firmeza do miolo. A quantidade de transglutaminase foi mantida no menor nível (0,2%), sendo que a enzima afetou negativamente o volume específico dos pães. Em função do resultado de quantidade de grupos amino livres na massa fermentada, as concentrações de *Spirulina* e transglutaminase adicionadas ao pão C foram de 1% e 0,6% respectivamente.

A Tabela 18 apresenta os resultados da avaliação tecnológica e composição proximal dos pães A, B e C de farinha de arroz, que foram elaborados utilizando as melhores

combinações de metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina*, segundo as respostas do planejamento experimental.

Os valores de volume específico dos pães B e C foram maiores do que os resultados obtidos no planejamento experimental e bem superiores aqueles encontrados por outros autores para pães livres de glúten.

Tabela 18 - Características tecnológicas e composição proximal de pães A, B e C de farinha de arroz

| Características | Pão A | Pão B | Pão C |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Volume específico (mL/g) | 2,93 ^b ±0,07 | 3,10 ^a ±0,08 | 3,03 ^{ab} ±0,02 |
| Firmeza (g-força) | 436,39 ^a ±31,83 | 326,55 ^b ±39,80 | 316,25 ^b ±42,05 |
| L* miolo | 34,59 ^b ±2,53 | 33,89 ^b ±1,03 | 53,21 ^a ±0,83 |
| a* miolo | 2,14 ^a ±0,80 | 2,53 ^a ±0,06 | 1,72 ^a ±0,22 |
| b* miolo | 28,11 ^b ±0,80 | 27,72 ^b ±0,61 | 32,27 ^a ±0,49 |
| Umidade (%) | 45,7 ^a ±0,59 | 45,0 ^a ±0,36 | 45,4 ^a ±0,53 |
| Cinzas* (%) | 2,6 ^a ±0,05 | 2,5 ^a ±0,02 | 2,3 ^b ±0,07 |
| Proteína* (%) | 8,6 ^a ±0,35 | 8,7 ^a ±0,29 | 7,2 ^b ±0,11 |
| Lipídios* (%) | 4,7 ^a ±0,50 | 4,2 ^a ±0,13 | 4,4 ^a ±0,23 |
| Carboidratos* (%) | 84,1 ^a ±0,89 | 84,6 ^a ±0,43 | 86,0 ^a ±0,36 |

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre nas características dos pães pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); *Base seca; Pão A: 2,2% metilcelulose, 0,2% transglutaminase, 4,0% *Spirulina*; Pão B: 1,5% metilcelulose, 0,2% transglutaminase, 4,0% *Spirulina*; Pão C: 2,2% metilcelulose, 0,6% transglutaminase, 1,0% *Spirulina*

Storck et al. (2009) obtiveram valores de 1,64 a 1,74 mL/g de volume específico de pães de farinha de arroz usando de 0 a 1,5% de transglutaminase e 1% de goma xantana, enquanto que Pereira et al. (2009) encontraram valores bem inferiores quando testaram níveis de substituição da farinha de trigo por farinha de arroz; pães de farinha de arroz com 1% de goma xantana e 1% de transglutaminase alcançaram valores de 1,25 mL/g de volume específico. Estudando os efeitos de isolados proteicos e transglutaminase na preparação de pão de arroz livre de glúten, Shin, Gang e Song (2010) encontraram volume específico de 1,76 mL/g para pães de farinha de arroz com transglutaminase e quando foi adicionado um isolado proteico de soja, o volume aumentou para 1,93 mL/g.

Figueira (2010) em estudo sobre a elaboração de pães de farinha de arroz usou teores fixos de 2% de HPMC e 0,5% da enzima transglutaminase e quando foi adicionada 2 e 4 % de *Spirulina platensis*, o volume específico foi de 3,03 mL/g e 3,10 mL/g, respectivamente. Estes valores foram os mesmos obtidos para os pães C e B respectivamente, confirmando os resultados de Figueira (2010) para o volume específico dos pães. O uso de metilcelulose,

transglutaminase e *Spirulina* nas concentrações usadas para os pães A, B e C é eficaz para produzir pães de farinha de arroz de bom volume específico.

O pão C foi o que apresentou a menor firmeza do miolo (316,25 g-força); isso se deve ao fato de que os teores de transglutaminase (0,6%) e *Spirulina* (1%) foram adequados para promover maior quantidade de ligações cruzadas como já havia sido confirmado pela resposta quantidade de grupos amino livres no planejamento experimental.

Em seu estudo sobre pães de farinha de arroz, Figueira (2010) obteve resultado semelhante para a firmeza do miolo de pães com 2% de HPMC e 0,5% de transglutaminase e 2% de *Spirulina platensis*, 308,48 g-força, enquanto que o pão com 4% de *Spirulina platensis* apresentou o valor de 277,39 g-força, resultado este, bem inferior ao encontrado para os pães A e B. O pão A e o pão B tiveram valores de firmeza do miolo significativamente diferentes entre si, sendo o teor de metilcelulose a diferença entre eles, pode-se dizer que o aumento da quantidade do hidrocolóide aumentou a firmeza do miolo do pão A.

Nas Figuras 13 e 14, são apresentadas fotografias dos pães A, B e C de farinha de arroz.

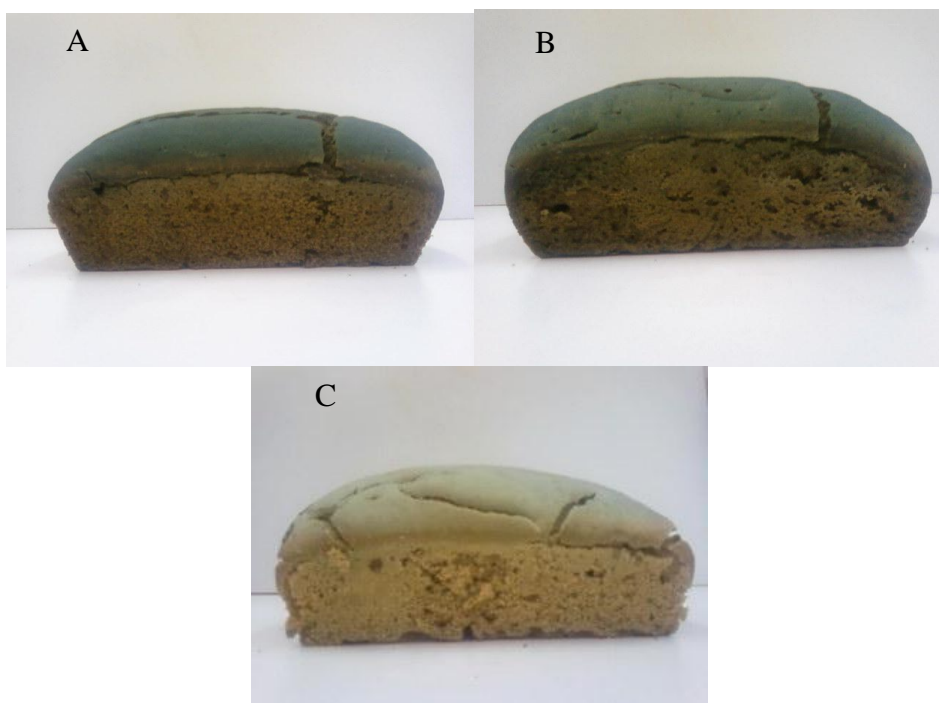
Figura 133 - Fotografias das fatias dos pães A, B e C de farinha de arroz



Os valores de luminosidade (L^*) do miolo dos pães A e B se assemelham ao valor de 33,57 que foi encontrado por Figueira (2010) para os pães com 4% de *Spirulina*, enquanto que o pão C apresentou valor mais alto indicando que a redução da concentração de *Spirulina* torna o pão mais claro. Os valores dos cromas a^* e b^* encontrados, indicam cor no intervalo do vermelho e amarelo, respectivamente, portanto os pães não apresentaram cor verde-azulada característica da microalga *Spirulina*. Quando a concentração de *Spirulina* é reduzida, como ocorreu no pão C, ocorre um aumento do amarelo e redução do vermelho. Como já foi mencionado na discussão dos resultados do planejamento, a alteração de cor ocorreu possivelmente por uma degradação dos pigmentos verde azulados da *Spirulina* durante o processamento dos pães.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos teores de umidade dos pães, estando dentro da normalidade para pães de farinha de arroz. Segundo El-Dash, Cabral e Germani (1994), os valores de umidade são maiores nos pães sem glúten do que no pão de trigo tradicional porque a quantidade de água necessária para dar a consistência ideal à massa é maior que no pão de trigo, onde normalmente adiciona-se de 55 a 65% de água. Vallejos (2013) obteve valores de umidade do miolo dos pães de farinha de arroz de 52,3 a 54,6%, enquanto que, Figueira (2010) encontrou valores de 49,1 a 51,6% de umidade do miolo dos pães de farinha de arroz com *Spirulina platensis*.

Figura 144 - Fotografias dos pães A, B e C de farinha de arroz



Os teores de cinzas e proteínas do Pão C foram significativamente menores do que os dos Pães A e B, pois estes apresentam maior teor de *Spirulina* adicionada.

Figueira (2010) obteve 9,2% de proteína no pão com 4% de *Spirulina platensis* e 7,8% no pão com 2% de *Spirulina platensis*. Em seu trabalho sobre desenvolvimento de “sonho” de mandioca enriquecido com *Spirulina platensis*, Rabelo et al. (2013), encontraram valores proteicos de 7,2 a 12,1% para “sonhos” enriquecidos com 2,5 a 5,5% da microalga, respectivamente.

Vários estudos têm demonstrado que a microalga *Spirulina platensis* possui elevado teor proteico e de minerais (AMBROSI et al., 2008; HABIB et al., 2008; MIŠURCOVÁ et

al., 2010), podendo ocorrer uma variação dos percentuais de proteínas dependendo das condições de cultivo da microalga e composição do meio (OLIVEIRA et al., 1999; SANTOS et al., 2003). Portanto, os teores de cinzas e proteína nos produtos elaborados com *Spirulina* dependerão não somente da quantidade de microalga adicionada, mas também dos teores de minerais e proteína presente na microalga. No presente estudo, houve um aumento aproximado de 20% no teor proteico dos pães A e B, com 4% de *Spirulina*, quando comparado com o pão C.

5.5. Avaliação sensorial dos pães A, B e C de farinha de arroz

Os resultados do teste de preferência dos julgadores pelos pães de farinha de arroz estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultado do teste de ordenação-preferência dos pães de farinha de arroz

| Pães | Pontuação* |
|------|------------------|
| A | 94 ^{ab} |
| B | 115 ^a |
| C | 91 ^b |

* Menores valores de pontuação indicam maior preferência aos pães; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Friedman

Os resultados do teste de ordenação-preferência dos pães de farinha de arroz mostram que a preferência dos julgadores foi pelo pão C, com o menor teor de *Spirulina*. Esta resposta pode indicar uma maior preferência do pão C devido à cor mais clara e à maior maciez do miolo, no entanto, não houve diferença significativa comparada ao pão A, que além de possuir cor mais escura também obteve o maior valor de firmeza do miolo.

Apenas entre o pão B e C houve diferença estatisticamente significativa. Alguns julgadores, em suas observações, fizeram referência ao sabor semelhante entre os pães, à textura diferenciada do pão B e à cor diferente do pão C comparado com os demais.

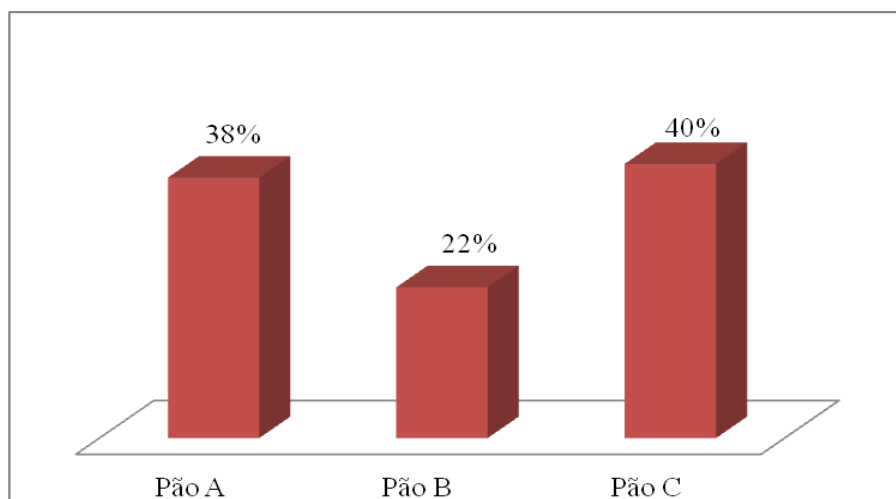
Figueira (2010), em seu trabalho sobre produção do pão sem glúten enriquecido com *Spirulina platensis*, avaliou a preferência entre pães de farinha de arroz com 3% e 5% de *Spirulina* através de um teste de comparação pareada e não encontrou diferenças significativas entre os pães.

Segundo Bobbio e Bobbio (1992), o consumo de um alimento depende, em primeira instância, da sua cor e do seu aspecto, pois quando um consumidor entra em contato com o alimento, a cor e a aparência são as primeiras sensações que o atingem. A textura também é

uma propriedade importante dos produtos de panificação, pois está relacionada com o frescor do pão.

A Figura 15 mostra um gráfico de colunas representando os percentuais de preferência entre os julgadores.

Figura 155 – Percentual* de preferência dos pães A, B e C



* Total de 50 julgadores

Os resultados mostraram que dos 50 julgadores participantes, 40% preferiram o pão C, 38% o pão A e apenas 22% preferiram o pão B.

5.6. Avaliação nutricional dos pães de farinha de arroz adicionados de *Spirulina*

5.6.1. Composição proximal das dietas

Conforme mostra a Tabela 20, as dietas apresentaram diferenças significativas em sua composição. As diferenças de umidade encontradas entre as dietas provavelmente ocorreram devido à secagem ter sido feita em diferentes lotes. O teor proteico das dietas ficou acima daquele definido devido à utilização do farelo de trigo como fibra para a dieta. O farelo utilizado possuía um teor maior que 1% de proteína, o que pode ser confirmado pelo teor proteico de 1,5% encontrado na dieta aprotéica.

Tabela 20 - Composição proximal das dietas Controle, Aproteica, PA (pão de arroz) PAS (pão de arroz com *Spirulina*)

| Características (%) | Dietas* | | | |
|---------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Controle | Aproteica | PA | PAS |
| Umidade | 10,9 ±0,15 ^a | 9,2 ±0,14 ^c | 9,6 ±0,25 ^{bc} | 10,1 ±0,46 ^b |
| Proteína | 11,7 ±0,15 ^c | 1,5 ±0,04 ^d | 12,3 ±0,01 ^b | 12,7 ±0,01 ^a |
| Extrato Etéreo | 6,4 ±0,10 ^d | 7,0 ±0,02 ^c | 7,7 ±0,07 ^b | 8,5 ±0,19 ^a |
| Cinzas | 2,6 ±0,05 ^c | 2,4 ±0,04 ^d | 3,2 ±0,03 ^a | 3,1 ±0,01 ^b |

*Média de 3 repetições ± desvio padrão; Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

As dietas controle e de pão de arroz com *Spirulina* (PAS) apresentaram valores de lipídios fora do esperado, já que o teor de óleo adicionado nas dietas foi calculado para 7%. As dietas apresentaram teor de cinzas inferior ao esperado segundo a formulação, pois a elas foi adicionado 3,5% de mistura de minerais.

5.6.2. Indicadores biológicos

Os pesos iniciais dos ratos (Tabela 21) dentro de todos os grupos alimentados com as dietas não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), mostrando uniformidade entre os grupos.

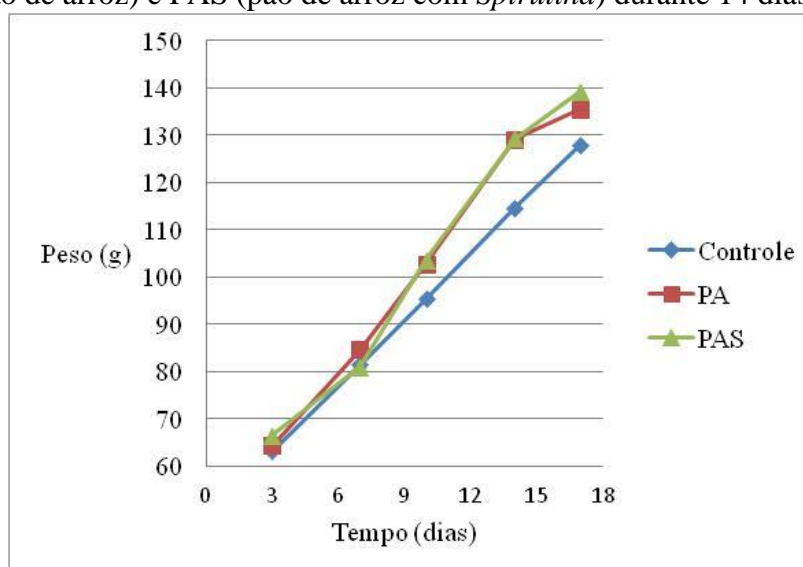
Tabela 21 - Respostas ponderais e nutricionais de ratos *Wistar* alimentados com dieta C (controle), A (aproteica), PA (pão de arroz) e PAS (pão B de arroz com *Spirulina*), durante 14 dias de experimento

| Parâmetros | Dietas | | | |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | C | A | PA | PAS |
| Peso inicial (g)* | 63,18 ±10,77 ^a | 65,08±13,16 ^a | 64,30 ±3,60 ^a | 66,44 ±8,11 ^a |
| Peso final (g) | 128,00 ±19,64 ^a | 56,53±10,18 ^b | 135,54 ±6,37 ^a | 139,22 ±14,99 ^a |
| Ganho de peso (g) | 64,82 ±14,65 ^a | - | 71,24 ±4,08 ^a | 72,78 ±9,14 ^a |
| Consumo de dieta (g) | 172,19 ±26,69 ^a | 83,25±16,05 ^b | 167,33 ±13,01 ^a | 173,30 ±24,20 ^a |
| Consumo de proteína (g) | 20,23 ±3,14 ^a | 1,30±0,25 ^b | 20,55 ±1,60 ^a | 22,01 ±3,07 ^a |
| CEA | 0,37 ±0,04 ^a | - | 0,43 ±0,03 ^a | 0,42 ±0,02 ^a |
| NPR | 3,62 ±0,31 ^a | - | 3,90 ±0,24 ^a | 3,71 ±0,17 ^a |
| DA(%) | 93,6±1,44 ^a | - | 84,4 ±4,19 ^b | 83,8 ±1,24 ^b |
| DV(%) | 96,1±1,55 ^a | - | 86,5 ±4,10 ^b | 85,7±1,21 ^b |

CEA: coeficiente de eficiência alimentar; NPR: razão proteica líquida, DA:digestibilidade aparente, DV: digestibilidade verdadeira; Médias dos grupos de 6 ratos ±desvio padrão; Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); *Após 3 dias de adaptação

Os resultados de ganho de peso dos grupos experimentais (Figura 16) mostram que as dietas pão de arroz (PA) e pão de arroz com *Spirulina* (PAS) foram eficientes para o desenvolvimento dos ratos, uma vez que não diferiram ($p>0,05$) dos resultados da dieta controle. Moreira et al. (2013) em estudo sobre o uso de diferentes concentrações de *Spirulina* em dietas para recuperação nutricional de ratos, também não observaram diferença no ganho de peso entre as dietas experimentais e controle.

Figura 16 - Ganho de peso dos ratos (média do grupo de 6 animais) dos grupos Controle, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com *Spirulina*) durante 14 dias de experimento

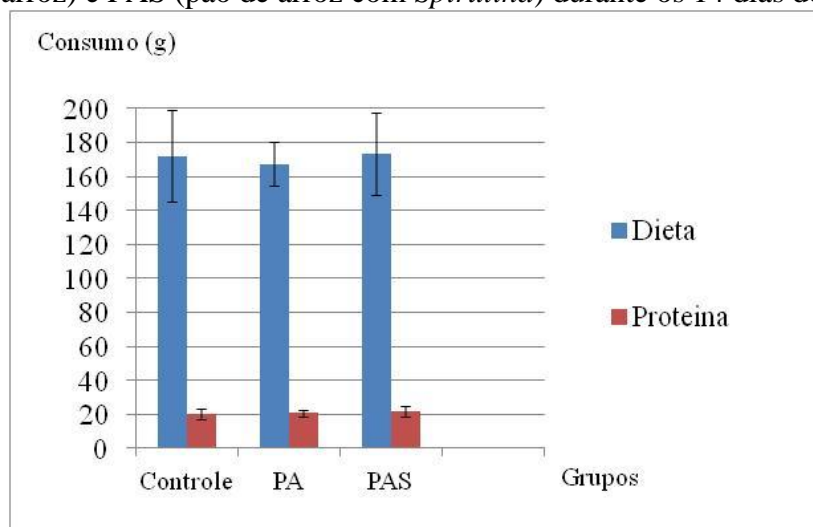


O consumo de dieta e de proteína pelos grupos alimentados com as dietas controle e experimentais (PA e PAS), também não diferiram entre si ($p>0,05$), mostrando que as dietas experimentais PA e PAS foram bem aceitas pelos animais. (Figura 17). Embora tenha havido diferenças significativas nos teores proteicos das dietas, o consumo de proteína entre os grupos não diferiu.

Os resultados do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) (Tabela 21) mostram que as dietas experimentais foram tão eficientes no ganho de peso corporal quanto à dieta controle.

Araújo, Fachinetti e Santos (2003), em sua pesquisa comparando biomassas de *Spirulina* originadas do México, China e Cuba, em diferentes concentrações na dieta, também constataram que não houve diferença significativa no CEA entre os grupos que consumiram as rações de diferentes biomassas e o controle.

Figura 17 - Consumo de dieta e de proteína pelos ratos *Wistar* dos grupos Controle, PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com *Spirulina*) durante os 14 dias do experimento



Em um estudo sobre a influência de dietas de *Spirulina* no desenvolvimento corporal de ratos *Wistar*, Moreira et al. (2011) obtiveram para o CEA valores de 0,28 e 0,32 para as dietas controle e dieta com 8,8% de *Spirulina* (complementada com caseína), respectivamente.

Borges et al. (2010), estudando a qualidade proteica do pão de trigo contendo diferentes concentrações de linhaça, observaram diferenças significativas entre as dietas de pão de trigo com 15% de linhaça (0,14) e a controle (0,33).

Os animais alimentados com as dietas controle, PA e PAS, aumentaram em média 4,63, 5,09 e 5,20 g no seu peso por dia, respectivamente, mostrando que a quantidade de dieta consumida pelos ratos foi efetiva para o ganho de peso corporal não provocando redução metabólica do organismo e conseqüente alterações no crescimento dos ratos. O ganho de peso e o consumo alimentar estão relacionados à qualidade da proteína presente nas dietas, influenciando diretamente no CEA. Os valores de CEA foram superiores aos relatados nos demais trabalhos com *Spirulina* (Moreira et al., 2011; Machado et al., 2014). Deve-se considerar, contudo, que estes estudos foram realizados num período maior de tempo.

O NPR avalia a capacidade da proteína de manter o metabolismo dos animais além de dar respostas mais confiáveis do que o PER, por ser menos sensível às variações nas concentrações de proteína das dietas experimentais (SGARBIERI, 1996).

As dietas PA e PAS sofreram complementação de caseína na sua elaboração em 48% e 42%, respectivamente, aumentando a qualidade proteica. Isto foi eficiente para manter o NPR a níveis ideais para o crescimento e manutenção do desenvolvimento dos ratos recém-desmamados, sem diferir da dieta controle. Estas dietas apresentaram melhores respostas quando comparadas ao estudo de Borges et al. (2010), que obtiveram um NPR de 2,74 para a

dieta de pão de trigo com 15% linhaça. O valor proteico de produtos de arroz também foi estudado por Asemi et al. (2012) onde o NPR de duas marcas de alimentos para bebês feitos à base de arroz e leite foram comparadas a uma dieta controle. O NPR obtido para os produtos comerciais foi de 2,93 e 3,45, enquanto que para a dieta controle foi de 4,38.

A digestibilidade é a medida da porcentagem de proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado. As dietas PA e PAS apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) quanto à digestibilidade proteica, tanto aparente quanto verdadeira, quando comparadas ao grupo controle. A menor digestibilidade das dietas PA e PAS, comparadas à controle, se dá devido à proteína da farinha de arroz, que por ser uma proteína de origem vegetal, possui menor digestibilidade, comparada com a proteína de origem animal como a caseína.

Denardin et al. (2009) trabalhando com ratos obtiveram 87% de digestibilidade aparente para a dieta de arroz complementada com caseína.

5.6.3. Composição de aminoácidos das dietas comparadas ao padrão FAO/WHO e PDCAAS

A composição de aminoácidos essenciais das proteínas das dietas (Tabela 22) foi comparada com o padrão FAO/WHO (1991) obtendo-se o escore químico de aminoácidos (EQ). O primeiro aminoácido limitante encontrado para as dietas foi a treonina. O EQ foi corrigido pela digestibilidade verdadeira obtendo-se então o PDCAAS (Tabela 23).

Tabela 22 - Composição de aminoácidos essenciais das dietas C (controle), PA (pão de arroz), PAS (pão de arroz com *Spirulina*), Padrão FAO/WHO para crianças de 2 a 5 anos

| Aminoácidos essenciais | mg aminoácido/g de proteína | | | Padrão FAO/WHO |
|------------------------|-----------------------------|-------|-------|----------------|
| | Dietas | | | |
| | C | PA | PAS | |
| Fenilalanina+Tirosina | 92,24 | 94,05 | 93,80 | 63 |
| Histidina | 20,09 | 20,10 | 19,08 | 19 |
| Isoleucina | 50,23 | 46,62 | 43,72 | 28 |
| Leucina | 86,76 | 83,60 | 82,67 | 66 |
| Lisina | 73,06 | 62,70 | 59,62 | 58 |
| Metionina+ Cistina | 42,01 | 41,80 | 34,98 | 25 |
| Treonina | 32,88 | 29,74 | 31,00 | 34 |
| Valina | 56,62 | 55,47 | 54,85 | 35 |

O PDCAAS reflete a eficiência da proteína na disponibilidade metabólica de aminoácidos ao organismo humano. A qualidade da proteína baseada no aminoácido essencial limitante preconiza que valores iguais a 1,0 para o EQ e 100 para o PCDAAS indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades nutricionais de humanos (PIRES et al., 2006).

Tabela 23 - Escore químico, Digestibilidade proteica verdadeira e Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS) das dietas C (controle), PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com *Spirulina*)

| Determinações | Dietas | | |
|-----------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | C | PA | PAS |
| Escore Químico* | 0,97 | 0,87 | 0,91 |
| DV(%)** | 96,1±1,55 ^a | 86,5 ±4,10 ^b | 85,7±1,21 ^b |
| PDCAAS(%)*** | 92,9±1,49 ^a | 75,6 ±3,59 ^b | 78,1 ±1,10 ^b |

*Escore químico do 1º aminoácido limitante (Treonina); **Digestibilidade verdadeira; ***Escore químico do 1º aminoácido limitante (treonina) x Digestibilidade Verdadeira da proteína; Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

O PDCAAS das dietas PA e PAS diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) da dieta controle. A dieta PAS apresentou maior escore químico e PDCAAS, comparada à dieta PA, mesmo não mostrando diferença significativa indicando que a proteína da microalga *Spirulina* pode ter atuado positivamente nestes parâmetros. A quantidade de *Spirulina* utilizada no pão ou o tempo de ensaio podem ter influenciado para não se atingir o resultado esperado com a dieta PAS, pois as proteínas da *Spirulina* são consideradas completas, superiores às proteínas de origem vegetal e de fácil digestão.

Kannan, Nielsen e Mason (2001), estudando o PDCAAS em alimentos infantis feitos à base de feijão e feijão com arroz, verificaram que quando combinado com o arroz, todos os produtos de feijão melhoraram significativamente os valores de PDCAAS.

5.6.4. Testes bioquímicos de glicemia e colesterol total

Os resultados de glicemia (Tabela 24) encontrados para os animais alimentados com as dietas controle, PA e PAS não diferiram significativamente entre si e estão dentro dos valores normais para a espécie, que varia de 50 mg.dL⁻¹ a 135 mg.dL⁻¹ (Harkness; Vagner, 1993).

Tabela 24 - Testes bioquímicos de glicemia e colesterol total no plasma do sangue de ratos alimentados com dieta C (controle), PA (pão de arroz) e PAS (pão de arroz com *Spirulina*)

| Testes bioquímicos | Dietas | | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | C | PA | PAS |
| Glicemia (mg.dL ⁻¹) | 70,33±27,0 ^a | 56,47±20,67 ^a | 52,68±17,17 ^a |
| Colesterol Total (mg.dL ⁻¹) | 81,04±13,42 ^a | 57,16±21,46 ^b | 61,46±4,84 ^{ab} |

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey (p≤0,05)

Alimentos ricos em amido que possuem alto conteúdo de amilose como o arroz, estão associados a níveis mais baixos de glicose no sangue e esvaziamento mais rápido do trato gastrointestinal humano em comparação com aqueles com baixos níveis de amilose (FREI; SIDDHURAJ; BECKER, 2003).

O resultado de colesterol total para os ratos alimentados com a dieta PA foi significativamente menor ao da dieta controle, enquanto que a resposta obtida para a dieta PAS não diferiu da dieta PA nem da dieta controle. Os valores de colesterol total são considerados normais para a espécie, uma vez que na literatura são encontrados resultados variando de 20 a 120 mg.dL⁻¹. (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1993; HARKNESS; WAGNER, 1993; DANTAS et al., 2006; CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP, 2008; SOUZA-SOARES et al., 2009).

Denardin et al. (2007) estudando dietas com substituição total do amido de milho por arroz cozido de diferentes cultivares obtiveram valores de colesterol total de 87,5 mg.dL⁻¹ a 112 mg.dL⁻¹. Em outro estudo Denardin et al. (2009) encontraram 62,67 mg.dL⁻¹ e 72,93 mg.dL⁻¹ de colesterol total em ratos *Wistar* alimentados com dieta com arroz e macarrão em substituição à caseína, respectivamente.

Machado et al. (2014), estudando o efeito de dietas com *Spirulina* nos tamanhos micrométrico e nanométrico no metabolismo de ratas, obtiveram valores de colesterol total de 77 e 93 mg.dL⁻¹ para as dietas controle e *Spirulina* micrométrica respectivamente. Em estudo com animais que consumiram uma multimistura com adição de farelo de arroz e *Spirulina*, Marco (2008) encontrou um valor de 64,5 mg dL⁻¹ de colesterol total.

As dietas PA e PAS mostraram-se nutricionalmente semelhantes à dieta controle e não apresentaram diferenças significativas entre si quanto aos índices de ganho de peso corporal, CEA e NPR. No entanto, os resultados de digestibilidade proteica e PDCAAS encontrados para as dietas PA e PAS foram inferiores aos obtidos para a dieta controle, mostrando que a quantidade de *Spirulina* utilizada nos pães, não foi suficiente para aumentar a quantidade de

aminoácidos essenciais limitantes do arroz. Além disso, os reduzidos valores de digestibilidade proteica encontrados para as dietas PA e PAS foram decorrentes da baixa digestibilidade da proteína do arroz, que conseqüentemente levou à redução dos valores de PDCAAS obtidos para estas dietas.

6. CONCLUSÕES

- Verificou-se que a maior efeito da enzima transglutaminase na formação de “rede” proteica ocorreu quando foi utilizada a concentração de 0,6% (em base de farinha de arroz), mas a proteína da *Spirulina* não aumentou a formação de ligações cruzadas na massa fermentada dos pães de farinha de arroz.
- Constatou-se que o uso combinado do hidrocolóide metilcelulose e da microalga *Spirulina* nos níveis mais altos estudados afetou positivamente a qualidade tecnológica de volume específico e firmeza do miolo dos pães de farinha de arroz.
- Verificou-se alteração da cor verde característica dos pães de farinha de arroz adicionados de *Spirulina* devido à degradação de seus pigmentos pelos processos de obtenção da microalga seca e moída.
- Com base nas respostas quantidade de grupos amino livre, volume específico e firmeza do miolo do pão, foi possível selecionar as concentrações das variáveis metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina* para definir formulações e elaborar pães de características tecnológicas adequadas.
- Pelo teste de ordenação-preferência foi constatado que a quantidade de *Spirulina* usada na formulação dos pães, não interferiu na preferência do consumidor, uma vez que o pão com 4% de *Spirulina* e o pão com 1% de *Spirulina* foram igualmente preferidos, sugerindo que parâmetros tecnológicos como maciez do miolo pode ter influenciado na escolha do pão.
- Através da microscopia eletrônica de varredura da massa fermentada dos pães observou-se que a enzima transglutaminase provocou uma maior compactação das microestruturas. A adição de *Spirulina* na massa provocou a formação de estruturas fibrosas semelhantes a uma rede proteica.
- As dietas elaboradas com pão de arroz e pão de arroz acrescido de *Spirulina* foram igualmente eficientes para o ganho e manutenção de peso de ratos *Wistar*. A qualidade proteica destas dietas baseada no NPR, digestibilidade e PDCAAS foi o esperado para dieta

com fontes proteicas variadas, não havendo influência da adição da microalga *Spirulina* no valor nutricional, possivelmente devido ao baixo teor adicionado na formulação do pão.

- As dietas PA e PAS mantiveram níveis de glicemia e colesterol total normais para a espécie em estudo, mostrando redução nos níveis de colesterol total comparados com a dieta controle.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a adição de um extrato proteico de *Spirulina* nos pães de farinha de arroz, visando aumentar seu teor proteico.
- Estudar as características reológicas da massa de pães de farinha de arroz com extrato proteico de *Spirulina*.
- Estudar a adição de novas farinhas isentas de glúten com alto teor de fibras e proteínas no processamento de pães.
- Estudar a adição de farinhas produzidas a partir de resíduos, como cascas e sementes, oriundos da indústria de frutas no processamento de pães.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Especial panificação**. São Paulo: Editora Insumos, 2008. Disponível em http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/195.pdf. Acesso em 3 de fevereiro de 2014.

AJINOMOTO Benefícios da enzima transglutaminase em alimentos. **Revista Food Ingredients** Brasil. n.24, 2013. Disponível em <http://ajinomotofi.com.br/docs/BENEF%C3%8DCIOS%20DA%20ENZIMA%20TRANSGLUTAMINASE%20NOS%20ALIMENTOS%20%E2%80%93%20Revista%20Food%20Ingredients%20Brasil%20%E2%80%93%202013.pdf>. Acesso em abril de 2013.

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

ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; LE-BAIL, A.; CHEVALLIER, S.; ROSELL, C.M. Effect of the amount of steam during baking on bread crust features and water diffusion. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 128-134, 2012.

ALVARENGA, N. B.; LIDON, F. C.; BELGA, E.; MOTRENA, P.; GUERREIRO, S.; CARVALHO, M. J.; CANADA, J. Characterization of Gluten-free Bread Prepared From Maize, Rice and Tapioca Flours using the Hydrocolloid Seaweed Agar-Agar. **Recent Research in Science and Technology**, v.3, n.8, p. 64-68, 2011.

AMBROSI, M.A.; REINEHR, C.O.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V; COLLA, L.M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciência e Farmácia Básica Aplicada**, v. 29, n.2, p. 109-117, 2008.

AMEND, T.; BELITZ, H. The formation of dough and gluten – a study of scanning electron microscopy. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 190, n.5, p. 401-409, 1990.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC) Approved Methods of the AACC. 10th edition. **American Association of Cereal Chemists**, St. Paul, MN, 2000.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia na produção de alimentos**, v. 4, São Paulo: Editora Blücher, 523 p., 2001.

ARAÚJO, K. G. L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, C. P. Influência da ingestão de biomassas de *Spiulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 6-9, 2003.

ARAÚJO, W. M. C.; MONTEBELLO, N. D. P.; BOTELHO, R. B. A.; BORGIO, L. A. **Alquimia dos Alimentos**, Brasília: Editora Senac, DF, 2009, 560p.

ARPITA MONDAL, A.K. D. Bread Baking – A Review. **Journal of Food Engineering**. India, v.86, n.4, p.465-474, jun/2008.

ASEMI, Z.; KHORRAMI, A.; TAGHIZADE, M.; ABEDINI, Z.; AZARBAD, Z.; RASHIDI, A.A. Protein quality evaluation of two rice- and milk-based weaning foods. **Electronic physician**, v.4, n.1, 2012.

ASSOCIAÇÃO DOS CELÍACOS DO BRASIL – ACELBRA. Dados estatísticos. **Quais produtos sem glúten você gostaria de encontrar com facilidade?** Disponível em <https://www.acebra.org.br>. Acesso em 05 de outubro de 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS -AOAC - **Official Methods of Analysis**, 17th ed., Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

AURICCHIO S.; TRONCONE R. History of coeliac disease. **European Journal Pediatrics**, v.155, 427p., 1996.

AUTIO, K.; KRUS, K.; KINNAPILA, A.; GERBER, N.; FLANDER, L.; BUCHERT, J. *Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1.039-1.045, 2005.

AUTIO, K.; LAURIKAINEN, T. Relationships between flour/ dough microstructure and dough handling and baking properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 181-185, 1997.

AVILA-LEON, I. A. **Estudo do cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BABADZHANOV, A. S.; ABDUSAMATOVA, N.; YUSUPOVA, F. M.; FAIZULLAEVA, N.; MEZHLYMYAN, L. G.; MALIKOVA, M. K. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 3, 2004.

BAPTISTA M. L. Doença celíaca: uma visão contemporânea. **Pediatria**, 28, p.262-271, 2006.

BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para a alimentação humana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, 2010.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

BEMILLER, J. N. Hydrocolloids. In: Arendt E. K., Dal Bello, F. Eds., **Gluten-Free Cereal Products and Beverages**, p. 203-215, 2008.

BENDER A. E.; DOELL B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis, **British Journal Nutrition**, v. 11, p. 138-143, 1957.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E. E; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.26, p.9-20, 2008.

BIONDI, S. H. S. **Qualidade da Farinha de Trigo: Conceito, Fatores Determinantes e Parâmetros de Avaliação de Controle.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 41-62, 2003.

BLANCO, C. A.; RONDA, F.; PÉREZ, B.; PANDO, V. Improving gluten-free bread quality by enrichment with acidic food additives. **Food Chemistry**, v.127, p. 1204–1209, 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos.** 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.

BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects**, B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany. 2003.

BORGES, J.T.S.; PIROZI, M.R.; COSTA, N.M.B.; VIDIGAL, J.G. Qualidade protéica de pão de sal contendo farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.). **Alimentos e Nutrição** v.21, n.1, p.109-117, 2010.

BORGES, J. A.; ROSA, G. M.; MEZA, L. H. R.; HENRARD, A. A.; SOUZA, M. R. A. Z. COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion, Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 30, n.2, p. 277 - 287, April - June, 2013.

BOURNE, M.C. **Food texture and viscosity: concept and measurement**, San Diego, Academic Press, 400 p., 2002.

BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum condition. **Journal of Royal Statistical Society**, Series B 13, p 1-9, 1951.

BOYE, J.; WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. **British Journal of Nutrition**, v.108, p. 183-211, 2012.

BRAND-MILLER, J.; PANG, E.; BRAMALL, I. Rice: a high or low glycemic index food. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.1034-1036, 1992.

BRASIL, Casa Civil, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Estabelece procedimentos para o uso científico de animais.** Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/111794.htm. Acesso em 20 de fevereiro de 2013.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - **Assessoria de Gestão Estratégica. Projeções do Agronegócio Brasil 2010/11 a 2020/2021.** Brasília, junho de 2011. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20D0%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202020_0.pdf. Acesso em dezembro de 2012.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos,**

décimo segundo levantamento, setembro 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2012. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_09_18_33_boletim_graos_-_setembro_2012.pdf. Acesso em junho de 2013.

BRASIL, MINISTERIO DA SAUDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RDC nº 348, de 02 de dezembro de 2003. **Aprova o uso de enzimas na indústria de alimentos.** Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssesp/bibliote/informe_eletronico/2003/IELS.dez.03/Iels233/U_R_S-ANVS-RDC-348_031203.pdf. Acesso em julho de 2013.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Lei nº 344 de 13 de dezembro de 2002b. **Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em julho de 2013.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Lei nº 8.543, de 23 de dezembro de 1992. **Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em julho de 2013.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 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.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e62b4c804745968e9e65de3fbc4c6735/lei_10674.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em novembro de 2013.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RDC nº40 de 8 de fevereiro de 2002a. **Regulamento técnico para rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6d1e01804ac01f8195e0bfa337abae9d/Resolucao_RDC_n_40_de_08_fevereiro_de_2002.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em novembro de 2013.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1ae52c0047457a718702d73fbc4c6735/RDC_263_2005.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em setembro de 2013.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RDC nº 26, de 26 de maio de 2009. **Aprova a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/517752004222b5508405ad6d490f120b/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA26+de+27+de+maio+de+2009.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em setembro de 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos**, 20 de julho de 2004.

Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_bk.htm#1. Acesso em novembro de 2012.

BUHLER SA **Tecnologias de Processos: Farinha de arroz**. Disponível em: <http://www.buhlergroup.com/southamerica/pt/solues-industriais/produtos-agrcolas/arroz/farinha-de-arroz.htm#.Ut1qidJTvMz> . Acesso em 20 de janeiro de 2013.

BURDOCK, G. A. Safety assessment of hidroxypropyl methylcellulose as a food ingredients. **Food and Chemical Toxicology**. v.45, p.2341-2351, 2007.

CABALLERO, P.A.; BONET, A.; ROSELL, C.M.; GÓMEZ, M. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and thermal properties of insect damaged wheat flour. **Journal of Cereal Science**. v.42, p.93-100, 2005.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. v. 1, 2ed, 298p, 1993.

CAPRILES, V. D.; ARÊAS, J. A. G. Avanços na produção de pães sem glúten: Aspectos tecnológicos e nutricionais. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 129-136, jan./jun. 2011.

CARDOSO, M. B. **Características tecnológicas e funcionais de farinhas mistas de arroz e trigo para elaboração de sopas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

CARIAS, D.; CIOCCIA, A. M.; HEVIA, P. Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas *in vivo* e *in vitro* y su efecto sobre el cómputo químico. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 45, n. 2, p. 111-116, 1995.

CARVALHO, C.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; REETZ, E. R.; DRUM, M. Anuário brasileiro do arroz, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2014. 136 p.

CATALDO, F.; PITARRESI, N.; ACCOMANDO, S.; GRECCO, L.. Epidemiological and clinical features in immigrant children with coeliac disease: na Italian multicentre study. **Digestive and Liver Disease**. v. 36, p. 722-729, 2004.

CAUVAIN, S. P. Outros cereais na panificação In: CAUVAIN, S. P. e YOUNG, L. S. **Tecnologia da panificação**, 2. ed., Barueri, São Paulo:Manole, 2009.

CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. **Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de bioterismo da FMUSP**, 2008. [Em linha]: citado em 11/07/2013, Disponível em http://www.biot.fm.usp.br/index.phpmpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17¶metros=sim

CÉSAR, A. S.; GOMES, J. C.; STALIANO, C. D.; FANNI, M. L.; BORGES, M. C. Elaboração de pão sem glúten. **Revista Ceres**, v.53, n. 306, p.150-155, 2006.

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária, **Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012**. Disponível em <http://portal.cfmv.gov.br/>. Acesso em outubro de 2012.

CLERICI, M. T. P. S. ; EL-DASH, A. A. Farinha extrusada de arroz como substituto de glúten na produção de pão de arroz, **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. 3, p.288-298, 2006.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2255-2258, 1987.

COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. M.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.51 n.2 Curitiba, 2008.

COLLAR, C.; ANDREU, P.; MARTINEZ, J. C.; ARMERO, E. Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat Bread dough functionality: a response surface methodology study. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, p. 467-475, 1999.

COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C.C. E DURANTE, A.J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.61c, p. 105-110, 2006.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Revista Acta Sci Health Science**, v. 28, n.2, p. 165-170, 2006.

DEMIRALP, H.; CELIK, S.; KÖKSEL, H. Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing, **European Food Research and Technology**, v.211, p. 322–325, 2000.

DENARDIN, C. C.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; SILVA, L. P. Influência do consumo de arroz ou de macarrão no desempenho e resposta metabólica em ratos, **Alimentação e Nutrição**, v.20, n.3, p. 441-449, 2009

DENARDIN, C. C.; WALTER, M.; SILVA, L. P.; SOUTO, G. D.; FAGUNDES, C. A. A. Effect of amylose content of rice varieties on glycemic metabolism and biological responses in rats. **Food Chemistry**., v. 105, p. 1474-1479, 2007.

DESHNIUM, P.; PAITHOONRANGSARID, K.; SUPHATRAKUL, A.; MEESAPYODSUK, D.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S. Temperature-independent and-dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). **FEMS microbiology letters**, v. 184, n. 2, p. 207-213, 2000.

DONATO, N. R.; SILVA, J. A.; COSTA, M. J. C.; BARBOSA, M. Q.; BION, F.; CARVALHO FILHO, E. V.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A. Uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à dieta de restrição proteica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 69-77, 2010.

EL DASH, A.A; CABRAL, L.C.; GERMANI, R. **Tecnologia de farinhas mistas – uso de farinha mista de trigo e soja na produção de pães**. v. 3, 89p. Brasília: EMBRAPA, 1994.

EL DASH, A.A; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N. **Fundamentos da Tecnologia de Panificação**. São Paulo. Secretaria da Indústria, Comércio e Tecnologia do Estado de São Paulo, p. 1 - 243, 1982.

ELIAS, M. C.; FRANCO, D. F. Pós-Colheita e Industrialização de Arroz. In: Ariano Martins de Magalhaes Junior; Algenor da Silva Gomes; Alberto Baeta dos Santos. (Org.). **Sistemas de Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil**. 1ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, v. 1, p. 229-240, 2006.

ENDRES, J.G. **Soy Protein Products: Characteristics, Nutritional Aspects, and Utilization**, AOAC Press, Champaign, chap. 5, 6. p. 10-14. 2001.

ESTELLER, M.S.; AMARAL, R.L.; LANNES, S.C.S. Effect of sugar and fat replacers on the texture of baked goods. **Journal of Texture Studies**, v.35, p. 383-393, 2004.

ESTELLER, M. S. **Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ESTELLER, M.S.; LANNES, S.C.S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, Campinas Oct./Dec, 2005.

ESTELLER, M.S.; YOSHIMOTO, R.M.O.; AMARAL, R.L.; LANNES, S.C.S. uso de açúcares em produtos panificados, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 602-607, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION - FAO/WHO. **Evaluation of protein quality**. (Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation), Rome, p. 66, 1991.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA (2003) Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso em outubro de 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA (2013) Disponível em <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm363474.htm>. Acesso em novembro de 2013.

FENNEMA, O.R. **Química de alimentos**. 4ªed. – Editora Artmed, 2010.

FIGUEIRA, F.S.; CRIZEL, T. M.; SILVA, C. R.; SALAS-MELLADO, M. M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*, **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 308-316, out./dez. 2011.

FIGUEIRA, F. S. **Produção do pão sem glúten enriquecido com *Spirulina platensis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Rio Grande, Escola de Química e Alimentos: Rio Grande, 2010.

FREI, M.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry** v.83, p. 395–402, 2003.

FUNGUETTO, C. I.; PINTO, J. F.; BAUDET, L.; PESKE, S. T. Desempenho de sementes de arroz irrigado recobertas com zinco. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 32, n.2, p. 117-123, 2010.

GALLAGHER, E.; GORMLEY, T. R.; ARENDT, E. K. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. **Food Science and Technology**, v.15, p. 143-152, 2004.

GERRARD, J.A.; FAYLE, S.E.; BROWN, P.A.; SUTTON, K.H.; SIMMONS, L.; RASIAH, I. Effects of microbial transglutaminase on the wheat protein of bread and croissant dough. **Journal of Food Science**. v.66, n.6, p.782-786, 2001.

GIANNOU, V.; KESSOGLOU, V.; TZIA, C., Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. **Trends in Food Science and Technology**, v.14, n.3, p. 99–108, 2003.

GOESAERT, H; BRIJS, K; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.;GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality , and how to impact their functionality. **Trends in Food Science e Technology**. v.16, n. 1, p.12-30, 2005.

GONÇALVES, C. B. C. D.; SILVA, I. N.; TANURE, M. G.; BAHIA, M. Estudo da prevalência da doença celíaca em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1: resultado de 10 anos de acompanhamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica**, v.57 n.5 São Paulo, 2013.

GOULD, J. T. Panificação ao redor do mundo. In: CAUVAIN, S. P. e YOUNG, L. S. **Tecnologia da panificação**, 2.ed., Barueri, São Paulo: Manole, 2009. 418p.

GUJRAL, H. S.; ROSELL, C. M. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 225-230, 2004.

HABIB, M. A.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, **FAO - Fisheries and Aquaculture Circular n. 1034**, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 33p., 2008.

HARKNESS, J; WAGNER, J.E. **Biologia e clinica de coelhos e roedores**. 3.ed., São Paulo: ROCCA, 1993.

HEATON, J.W.; MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Foods Science & Technology**, v.7, p.8-15, 1996.

HILL, I. D.; DIRKS, M. H.; LIPTAK, G. S.; COLLETTI, R. B.; FASANO, A. Guidelines for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, **Hepatology and Nutrition**. v.40, p.1-19, 2005.

HOSENEY, R. C. Bread baking. **Cereal Foods World**, v.39, p.180-183, 1994.

HUANG, W.N.; LI, L.L.; WANG, F.; WAN, J.J. ; TILLEY, M. ; REN, C.Z. ; WU, S. Effects of transglutaminase on the rheological and Mixolab thermomechanical characteristics of oat dough. **Food Chemistry**, v. 121, p. 934-939, 2010.

HUNTERLAB User's manual with universal software versions 3.5. Reston: Hunterlab, 1998. Paginação irregular

INDRANI, D.; PRABHASANKAR, P.; RAJIV, J.; RAO, G. V. Scanning electron microscopy, rheological characteristics, and breadbaking performance of wheat-flour dough as affected by enzymes. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2804-2809, 2003.

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

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F. M. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece Microscópica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.482-488, 2006.

JOOD, S.; KAPOOR, A. C.; SINGH, R. Biological evaluation of protein quality of maize as affected by insect infestation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.2439-2442, 1992.

KANNAN, S; NIELSEN, S S; MASON, A C; Protein digestibility-corrected amino acid scores for bean and bean-rice infant weaning food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.49, n. 10, 2001.

KARAM L. M.; SOCCOL, C. R. Efeito da temperatura e pH no cultivo de *Spirulina* major. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** Unipar, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 5-7, 2007.

KIM, H. J.; MORITA, N.; LEE, S. H.; MOON, K. D. Scanning electron microscopic observations of dough and bread supplemented with *Gastrodia elata* Blume powder. **Food Research International**, v. 36, p. 387-397, 2003.

KOIDE, T.; KAMEI, H.; HASHIMOTO, Y.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M.. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. **Cancer Biotherapy and Radiopharmacology**, v.11, n.4, p.273-277, 1996.

KOTZE, L. M. S. Doença Celíaca. **Journal Brazilian Gastroenterology**, Rio de Janeiro, v.6, n.1, p.23-34, jan./mar. 2006.

LARRÉ, C.; DENERY-PAPINI, Y.; POPINEAU, G.; DESHAYES, C.; DESSERME, C.; LEFEBVRE, J. Biochemical Analysis and Rheological properties of Gluten Modified by Transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 121-127, 2000.

LATORRES, J. M.; SALAS-MELLADO, M. M. Caracterização físico-química e propriedades funcionais da farinha de arroz. In: XX Congresso de Iniciação Científica, III Mostra Científica. **Anais...** UFPel, 2011.

LAZARIDOU, A.; DUTA, D.; PAPAGEORGIOU, M.; BELC, N.; BILIADERIS, C.G. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten free formulations. **Journal of Food Engineering**, 79, 1033–1047, 2007.

LU, J.; REN, D.; WANG, J.; SANADA, H.; EGASHIRA, Y. Protection by dietary *Spirulina platensis* against D-galactosamine and acetaminophen-induced liver injuries, Short Communication, **British Journal of Nutrition**, v.103, p.1573–1576, 2010.

MACEDO, J. A. ; SATO, H H . Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, p. 413-419, 2006.

MACHADO, A. R.; RODRIGUES, R. S.; MACHADO, M. R. G.; SOUZA–SOARES, L. A. Influência da *Spirulina* LEB-18 em tamanho nanométrico no metabolismo de ratos fêmeas Wistar. **Revista de Ciências Agrárias**, v.37, n.4, p. 29-36, 2014.

MARCO, C.; ROSELL, C. M. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads, **European Food Research & Technology**, v.227, n. 4, p.1205, 2008a.

MARCO, C.; ROSELL, C. M. Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 132-139, 2008b.

MARCO, C.; ROSELL, C. M. Functional and rheological properties of protein enriched gluten free composite flours. **Journal of Food Engineering** 88, p. 94–103, 2008c.

MARCO, P.L. **Avaliação da Biodisponibilidade de Nutrientes em Multimisturas acrescidas de *Spirulina platensis***. Rio Grande, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Furg, 84p, 2008.

MARSH, D.; CAUVAIN, S. P. Mistura e processamento da massa. In: CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Tecnologia da panificação**, 2.ed., Barueri, SP: Manole, 2009.

MATSUMURA, Y.; CHANYONGVORAKUL, Y.; KUMAZAWA, Y.; OHTSUKA, T.; MORI, T. Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of α -lactalbumin in the molten globule state. **Biochimica et Biophysica Acta e Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1292, 69-76, 1996.

MATUDA, T. G. **Análise térmica da massa de pão francês durante os processos de congelamento e descongelamento: otimização do uso de aditivos**. São Paulo, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2004.

MEZAIZE, S.; CHEVALLIER, S.; LE BAIL, A.; DE LAMBALLERIE, M. Optimization of Gluten-Free Formulations for French- Style Breads. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 3, p. 140-146, 2009.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p. 85-93, 2004.

MILLER, D.S.; BENDER, A.E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **British Journal of Nutrition**. v.9, n.4, p.382–388, 1955.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycoocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 55-59, 2003.

MINOLTA. **Precise color communication**. Ramsey: Minolta, Minolta Camera Co, Osaka, Japan, 13p, 1993.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; FILHO, J. M. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1075-1079, 1998.

MOLINA GRIMA, E.; ACIÉ FERNÁNDEZ, F.G.; ROBLES MEDINA, A. Downstream processing of cell-mass and products. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.215, 2004.

MOORE, M.M.; HEINBOCKEL, M.; ULMER, H.M.; ARENT, E.K. Network formation in glutenfree bread with application of transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 83, n.1, p. 28-36, 2006.

MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; MARESCA, N. R.; ANTUNES, A. O.; MORAES, R. O. *Spirulina platensis*: process optimization to obtain biomass. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 33, supl. 1, p. 179-183, 2013.

MOREIRA, L. M. **Efeito de diferentes concentrações de *Spirulina* nos perfis bioquímico, hematológico e nutricional de ratos *Wistar* nutridos e desnutridos**, Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

MOREIRA L. M., BEHLING, B. S., RODRIGUES, R. S., COSTA, J. A. V.; SOARES, L. A. S. *Spirulina* as a Protein Source in the Nutritional Recovery of *Wistar* Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, n.3, p. 447-456, 2013.

MOREIRA, L. M.; ROCHA, A. S. R.; RIBEIRO, C. L. G.; RODRIGUES, R. S.; SOARES, L. A. S. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*, **African Journal of Food Science**, v.5, n.15, p. 799-805, 2011.

MORITA, N.; MAEDA, T.; MIYAZAKI, M.; YAMAMORI, M.; MJURA, H.; OHTSUKA, I.; Dough and baking properties of highamylose and waxy wheat flours. **Cereal Chemistry**. v. 79, p. 491-495, 2002.

MUNHOZ, M. P. **Influência dos hidrocolóides na qualidade tecnológica de pães.** Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

MIŠURCOVÁ, L.; KRÁČMAR, S.; KLEJDUS, B.; VACEK, J. Nitrogen Content, Dietary Fiber, and Digestibility in Algal Food Products. **Czech Journal Food Science**, v. 28, n. 1, p.27–35, 2010.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, p.901-909, 1987.

NAKAMURA M.; KURATA, T. Effects of L-ascorbic acid on the rheological properties of wheat flour dough. **Cereal Chemistry**, v.74, n. 5, p. 647-650, 1997.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA K.; MATSUURA, A.; Polymerization of several proteins by Ca²⁺ independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, p.2619-2623, 1989.

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais.** São Paulo: Sarvier, 60p, 1998.

OLIVEIRA, L. R. **Doença celíaca nas doenças neurológicas da criança e do adolescente.** Belo Horizonte, 2007. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Faculdade de Medicina da UFMG, 2007.

OLIVEIRA, M.A.C.L.; MONTEIRO, M.P.C.; ROBBS, P.G.; LEITE, S.G.F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures **Aquaculture International** v.7, p.261–275, 1999.

ONYANGO, C.; UNBEHEND, G.; LINDHAUER, M.G. Effect of cellulose-derivatives and emulsifiers on creep-recovery and crumb properties of gluten-free bread prepared from sorghum and gelatinised cassava starch. **Food Research International**, v.42, p.949–955, 2009.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity, **Journal of Biotechnology**, v.102, p.143-152, 2003.

OWENS, G. **Cereal processing technology.** Cambridge: Woodhead Publishing, 2001.

PANDA, H. **The complete book on gums and stabilizers for food industry,** Delhi: Asia Pacific Business Press Inc., 2010. 480p.

PARADES-LOPEZ, O.; BUSHUK, W. Development and “undevelopment” of wheat dough by mixing: Microscopic structure and its relations to breadmaking quality. **Cereal Chemistry**, v. 60, n. 1, p.24-27, 1982.

PAVANELLI, A.P. **Aditivos para panificação: Conceitos e Funcionalidade**, Artigo Técnico, Oxiteno S/A Indústria e Comércio, ABIAM - Associação Brasileira da Indústria de Aditivos e Melhoradores para Alimentos e Bebidas, 2000.

PAVELEY W. F. From Arateus to Crosby: a history of coeliac disease. **British Medical Journal**, v.297, p.1646-1649, 1988.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E .N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.

PEREIRA, B. S.; PEREIRA, B. S.; CARDOSO, E. S.; MENDONÇA, J. O. B.; SOUZA, L. B.; SANTOS, M. P.; ZAGO, L.; FREITAS, S. M. L. Análise físico-química e sensorial do pão de batata isento de glúten enriquecido com farinha de chia **Demetra: Alimentação, Nutrição e Saúde** v. 8, n. 2, p.125-136, 2013.

PEREIRA, G.W.; STORK, C.R.; RODRIGUES, A.O.; HALAL, S.L.M.; DIAS, A.R.G. Efeito da enzima transglutaminase no volume específico de pães elaborados com diferentes proporções de farinha de trigo e arroz. In: XVIII CIC, XI ENPOS, I Mostra Científica, **Anais...Pelotas: UFPel**, 20 a 23 de outubro de 2009.

PHILIPPI, S. T. **Nutrição e técnica dietética**. Barueri: Manole, p. 27 – 35, 2003.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p.179-187, jan.-mar. 2006.

PREICHARDT L. D. **Aplicação de xantana comercial e xantana sintetizada por xanthomonas arboricola pv pruni em bolos sem glúten**. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

QUAGLIA, G. **Ciencia y Tecnología de la Panificación**. Editora Acribia, S. A. Zaragoza, Espanha. 485p., 1991.

QURESHI, A. A.; PETERSON, D. M.; HASLER-RAPACZ, J. O.; RAPACZ, J. Novel tocotrienols of rice bran suppress cholesterogenesis in hereditary hypercholesterolemic swine. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p.223-230, 2001.

RABELO, S. F.; LEMES, A. C.; TAKEUCHI, K. P.; FRATA, M. T.; CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Development of cassava doughnuts enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 16, n.1, p. 42-51, 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **Rodent Diet**, v. 123, n. 6, p.1939-1951, 1993.

ROMAN-GUTIERREZ, A. D.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Description of Microstructural Changes in Wheat Flour and Flour Components during Hydration by using Environmental Scanning Electron Microscopy. **Food Science and Technology** v.1, 35(8):730-740, 2002.

ROJAS, J. A.; ROSELL, C. M.; DE BARBER, C. B. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 13, p. 27-33, 1998.

RONG, N.; AUSMAN, L.M.; NICOLOSI, R.J. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. **Lipids**, v.32, n.3, p.303-309, 1997.

ROSS-MURPHY, S. B. Globular protein gelatin - theory and experiment. **Food Hydrocolloids**, Flórida: CRC Press INC, 2001.

SABLANI, S. S.; BAIK, O.; MARCOTTE, M. Neural networks for predicting thermal conductivity of bakery products. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.299-304, 2002.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; MONTE ALEGRE, R. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, Campinas, 2003.

SANTOS, K. R. S. **Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales)** Tese (Doutorado em Biodiversidade vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 795 - 801, 1999.

SASSANO, C. E. N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo γ -linolênico da biomassa de *Spirulina platensis*.** São Paulo, 1999. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.

SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS): A concept for describing protein quality in foods and food ingredients: A critical review. **Journal of AOAC International**, v.88, n.3, p.988-94, 2005.

SCHAMNE, C. **Obtenção e caracterização de produtos panificados livres de glúten.** Ponta Grossa, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta grossa, 2007.

SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.3, p.361-371, 2002.

SDEPANIAN, V.L.; SCALETSKY, I.C.A.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS M.B. Assessment of Gliadin in Supposedly Gluten-Free Foods Prepared and Purchased by Celiac Patients, **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** 32, p. 65-70, 2001.

SDEPANIAN, V. L.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Doença Celiaca: a evolução dos conhecimentos desde sua centenária descrição original até os dias atuais. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, n. 4, p. 244-257, 1999.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: UNICAMP, 1987, 19p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradação, modificação**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SHIH, F.F. Rice proteins. In: Champagne, E.T. **Rice Chemistry and Technology**, ed. 3, AACC, USA, p. 143-162, 2004.

SHIH, F.F.; CHAMPAGNE, E.T.; DAIGLE, K. ZARINS, Z. Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. **Nahrung**, v. 43, n. 1, p. 14-18, 1999.

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

SILVA P. C., ALMEIDA P. D. V., AZEVEDO L. R., GRÉGIO A. M. T., MACHADO M. A. N., LIMA A. A. S. Doença Celíaca: Revisão **Clinica e Pesquisa em Odontologia**, Curitiba, v.2, n.5/6, p. 401-406, 2006.

SILVA, T. S. G.; FURLANETTO, T. W. Diagnóstico de Doença Celíaca em adultos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 122-126, 2010.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1629-1634, 2007.

SIVARAMAKRISHNAN, H. P.; SENGE, B.; CHATTOPADHYAY, P. K. Rheological properties of rice dough for making rice bread. **Journal of Food Engineering**. v. 62. p. 37-45, 2004.

SLUIMER, P. **Principles of Breadmaking – functionality of raw materials and process steps**. AACC, St. Paul, Minnessota, p.28-63. 2005.

SOUZA-SOARES, L. A.; MACHADO M.R.G.; RODRIGUES R.S. **Experimentação com Animais de laboratório, Manual básico**. Pelotas: Editora Universitária/UFPEL, 468p., 2009.

STAUFFER, C. E. Principios de formação da massa. In: CAUVAIN, S. P. e YOUNG, L. S. **Tecnologia da panificação**, 2.ed., Barueri, SP : Manole, 2009. 418p.

STEFANO, R.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K., Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. **Journal of cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 33-45, 2008.

STORCK, C. R.; PEREIRA, J. M.; PEREIRA, G. W.; RODRIGUES, A. O.; GULARTE, M. A.; DIAS, A. R. G. Características tecnológicas de pães elaborados com farinha de arroz e transglutaminase. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, p. 71-77, Janeiro 2009.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. Starch-Galactomannan interactions: functionality and rheological aspects. **Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 259-264, 1996.

VALLEJOS, V. B. **Estudo da vida útil de pães de farinha de arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rio Grande, 2013. Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, 2013.

VOLKMANN H.; IMIANOVSKY U.; OLIVEIRA J.L.B.; ERNANI S. SANT'ANNA Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) Platensis* in: Desalinator Wastewater and Salinated Synthetic Medium: Protein Content and Amino-Acid Profile, **Brazilian Journal of Microbiology** 39:98-101, 2008.

VOLTARELLI F. A., **Spirulina e exercício na recuperação de ratos submetidos à desnutrição proteica**. Rio Claro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2008.

WAYNE, G. **Professional baking**, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, 2009. 701p.

WILLIAMS, T.; PULLEN, G. Ingredientes funcionais. In: CAUVAIN, S. P. e YOUNG, L. S. **Tecnologia da panificação**, 2.ed., Barueri, São Paulo:Manole, 2009.

XIA, M.; LING, W.H.; MA, J.; KITTS, D.D.; ZAWISTOWSKI, J. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. **Journal of Nutrition**, v.133, n.3, p.744-751, 2003.

YLIMAKI G.; HAWARYSH Z.J.; HARDIN R.J.; THOMSON A.B.R. Application of response surface methodology to the development of rice flour yeast breads: objective measurements. **Journal of Food Science**, v. 53, n.6, p.1800-5, 1988.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 849-868, 2002.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa na Área da Saúde - CEPAS



CEPAS/FURG
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NA ÁREA DA SAÚDE
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
www.cepas.furg.br

PARECER Nº 130/ 2012

CEPAS 64/2012

Proc.: 23116.006482/2012-51

Título do Projeto: **Estudo da qualidade tecnológica, sensorial e nutricional de pães de farinha de arroz com Spirulina.**

Pesq. Resp.: Marcia Spadari Selmo

PARECER DO CEPAS:

O Comitê, considerando tratar-se de um trabalho relevante, o que justifica seu desenvolvimento, bem como o atendimento as pendências informadas no parecer 119/2012, emitiu o parecer de **APROVADO** para o projeto "**Estudo da qualidade tecnológica, sensorial e nutricional de pães de farinha de arroz com Spirulina**".

Está em vigor, desde 15 de novembro de 2010, a Deliberação da CONEP que compromete o pesquisador responsável, após a aprovação do projeto, a obter a autorização da instituição co-participante e anexá-la ao protocolo do projeto no CEPAS. Pelo exposto, o pesquisador responsável deverá verificar se seu projeto esta obedecendo a referida deliberação da CONEP.

Segundo normas da CONEP, deve ser enviado relatório de acompanhamento ao Comitê de Ética em Pesquisa, conforme modelo disponível na página <http://www.cepas.furg.br>.

Data de envio do relatório: 01/06/2013.

Rio Grande, RS, 27 de dezembro de 2012.

Profª. Eli Sinnott Silva

Coordenadora do CEPAS/FURG

Anexo 2 – Parecer do Comete de Ética em Experimentação Animal - CEEA



Pelotas, 18 de dezembro de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professora Rosane da Silva Rodrigues

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Avaliação de pães de farinha de arroz com *Spirulina* na resposta biológica em ratos Wistar**”, processo nº23110.009867/2012-21, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9867).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 25 / 01 / 2013

Assinatura da Professora Responsável:

10. APÊNDICES

Apêndice 1 – Análise de quantificação de grupos amino livres na massa fermentada de pães de farinha de arroz

Reagentes

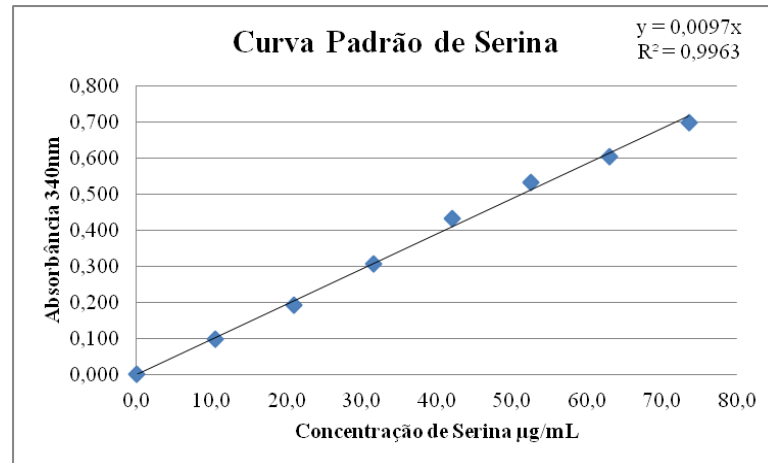
Reagente OPA da marca Sigma

Solução de KCl 0,1M (pH 1,0)

Aminoácido Serina da marca Vetec

Método

O método é baseado na reação entre os grupos amino primários e o o-ftaldialdeído (OPA) (Gujral e Rosell, 2004). Uma amostra de 0,2 g de massa é suspensa em 2,0 ml de KCl (0,1 M; pH 1,0), agitada em vortex por 10 minutos e centrifugada por 15 minutos a 9000 rpm. Para 100 µL do sobrenadante límpido é adicionado 500 µL de reagente OPA. É deixado reagir por 2 minutos e a absorbância determinada a 340 nm em espectrofotômetro. Os resultados são calculados mediante uma curva padrão de serina.

Apêndice 2 - Curva padrão de serina

Apêndice 3 - Ficha do teste de Ordenação-preferência

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Avaliação sensorial de pães de farinha de arroz com *Spirulina*

Nome: _____ data: _____

TESTE DE ORDENAÇÃO - PREFERÊNCIA

Instruções: Você está recebendo 3 amostras codificadas de pães de farinha de arroz com *Spirulina*. Prove-as da esquerda para a direita e indique o grau de preferência quanto às características gerais dos pães, colocando em primeiro lugar a mais preferida e em último a menos preferida. Enxágue a boca com água entre a degustação de cada amostra.

Código

1. _____

2. _____

3. _____

Observações: _____

Apêndice 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título da Pesquisa: “Estudo da qualidade tecnológica, sensorial e nutricional de pães de farinha de arroz com *Spirulina*”

Nome do (a) Pesquisador (a): Márcia Spadari Selmo

Nome do (a) Orientador (a): Myriam de Las Mercedes Salas-Mellado

1. **Natureza da pesquisa:** o sra (sr.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade eleger o melhor pão de farinha de arroz com *Spirulina* .
2. **Participantes da pesquisa:** 50 julgadores não celíacos, consumidores de pão.
3. **Envolvimento na pesquisa:** Ao participar deste estudo a sra (sr) permitirá que o (a) pesquisador utilize suas respostas em sua tese de doutorado. A sra (sr.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para a sra (sr.). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.
4. **Sobre as entrevistas:** Através de uma ficha de avaliação, será solicitado a Sra. (Sr.) que prove as amostras de pão e as coloque em ordem decrescente de preferência. Entre uma amostra e outra a Sra. (Sr.) deverá tomar alguns goles de água para retirar o residual da amostra anterior. Se a Sra. (Sr.) não apreciar o sabor das amostras poderá cuspir em recipiente próprio.
5. **Riscos e desconforto:** A participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas. Os riscos serão mínimos, já que o consumo de pães de farinha de arroz é comum e a microalga *Spirulina*, acrescida ao pão, foi aprovada como novo alimento pela ANVISA. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.
6. **Confidencialidade:** Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) e seu (sua) orientador (a) (e/ou equipe de pesquisa) terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

7. **Benefícios:** Ao participar desta pesquisa a sra (sr.) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a qualidade geral e preferência dos consumidores por pães de farinha de arroz com *Spirulina*, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir a melhoria da qualidade dos pães de farinha de arroz e para a obtenção da tese de doutorado e de artigos científicos, onde o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.
8. **Pagamento:** a sra (sr.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Orientador

Pesquisador: Marcia Spadari Selmo - (53) 81184745

Orientador: Myriam Salas-Mellado - (53) 32338621

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa: Profa. Dra. Edna Maria do Carmo

Vice-Coodenadora: Profa. Dra. Renata Maria Coimbra Libório

Telefone do Comitê: 3229-5315 ou 3229-5526

E-mail cep@fct.unesp.br

Apêndice 5 – Tabelas da análise de regressão

Tabela 25 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta grupos amino livres da massa fermentada - DCCR

| Efeitos | CR | EP | t (7) | p |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|
| Média | 0,35 | 0,05 | 6,81 | 0,00 |
| X ₁ (L) | -0,01 | 0,02 | -0,79 | 0,45 |
| X ₁ (Q) | 0,03 | 0,02 | 1,36 | 0,21 |
| X ₂ (L) | 0,02 | 0,02 | 0,82 | 0,43 |
| X ₂ (Q) | 0,07 | 0,02 | 2,60 | 0,03 |
| X ₃ (L) | 0,12 | 0,02 | 5,01 | 0,00 |
| X ₃ (Q) | -0,01 | 0,02 | -0,49 | 0,63 |
| X ₁ .X ₂ | -0,04 | 0,03 | -1,30 | 0,23 |
| X ₁ .X ₃ | -0,00 | 0,03 | -0,00 | 0,99 |
| X ₂ .X ₃ | -0,02 | 0,03 | -0,62 | 0,55 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²=71%; R=84%

Tabela 26 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta volume específico dos pães - DCCR

| Efeitos | CR | EP | t (7) | p |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|
| Média | 2,63 | 0,04 | 64,59 | 0,00 |
| X ₁ (L) | 0,14 | 0,01 | 7,68 | 0,00 |
| X ₁ (Q) | -0,06 | 0,02 | -3,23 | 0,01 |
| X ₂ (L) | -0,05 | 0,01 | -2,65 | 0,03 |
| X ₂ (Q) | 0,03 | 0,02 | 1,79 | 0,11 |
| X ₃ (L) | 0,04 | 0,01 | 2,35 | 0,05 |
| X ₃ (Q) | -0,00 | 0,02 | -0,47 | 0,65 |
| X ₁ .X ₂ | 0,02 | 0,02 | 0,89 | 0,39 |
| X ₁ .X ₃ | -0,02 | 0,02 | -0,79 | 0,45 |
| X ₂ .X ₃ | -0,04 | 0,02 | -1,59 | 0,15 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²=85%; R=92%

Tabela 27- Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta firmeza do miolo dos pães - DCCR

| Efeitos | CR | EP | t (7) | p |
|--------------------------------|--------|-------|-------|------|
| Média | 418,66 | 46,23 | 9,05 | 0,00 |
| X ₁ (L) | -54,81 | 21,72 | -2,52 | 0,03 |
| X ₁ (Q) | 95,16 | 23,93 | 3,97 | 0,00 |
| X ₂ (L) | 36,84 | 21,72 | 1,69 | 0,13 |
| X ₂ (Q) | -14,33 | 23,93 | -0,59 | 0,56 |
| X ₃ (L) | -2,38 | 21,72 | -0,10 | 0,91 |
| X ₃ (Q) | 11,31 | 23,93 | 0,47 | 0,65 |
| X ₁ .X ₂ | -17,81 | 28,37 | -0,62 | 0,54 |
| X ₁ .X ₃ | 41,42 | 28,37 | 1,45 | 0,18 |
| X ₂ .X ₃ | 11,27 | 28,37 | 0,39 | 0,70 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²=65%; R=80%

Tabela 28 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta Luminosidade do miolo – DCCR

| Efeitos | CR | EP | t (7) | p |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|
| Média | 38,77 | 1,07 | 36,12 | 0,00 |
| X ₁ (L) | 3,57 | 0,50 | 7,09 | 0,00 |
| X ₁ (Q) | 0,69 | 0,55 | 1,25 | 0,24 |
| X ₂ (L) | 0,29 | 0,50 | 0,58 | 0,57 |
| X ₂ (Q) | 0,48 | 0,55 | 0,86 | 0,41 |
| X ₃ (L) | -3,90 | 0,50 | -7,74 | 0,00 |
| X ₃ (Q) | 1,26 | 0,55 | 2,28 | 0,05 |
| X ₁ .X ₂ | 0,31 | 0,65 | 0,47 | 0,65 |
| X ₁ .X ₃ | -0,24 | 0,65 | -0,37 | 0,71 |
| X ₂ .X ₃ | -0,34 | 0,65 | -0,51 | 0,62 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²= 92%; R=96%

Tabela 29- Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta cora a* - DCCR

| Efeitos | CR | EP | t (7) | p |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|
| Média | 3,22 | 0,18 | 17,14 | 0,00 |
| X ₁ (L) | 0,14 | 0,08 | 1,67 | 0,13 |
| X ₁ (Q) | 0,10 | 0,09 | 1,08 | 0,31 |
| X ₂ (L) | 0,21 | 0,08 | 2,40 | 0,04 |
| X ₂ (Q) | -0,00 | 0,09 | -0,04 | 0,96 |
| X ₃ (L) | 0,22 | 0,08 | 2,57 | 0,03 |
| X ₃ (Q) | -0,20 | 0,09 | -2,09 | 0,07 |
| X ₁ .X ₂ | -0,08 | 0,11 | -0,76 | 0,47 |
| X ₁ .X ₃ | 0,17 | 0,11 | 1,48 | 0,18 |
| X ₂ .X ₃ | 0,10 | 0,11 | 0,94 | 0,37 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²=56%; R=74%

Tabela 30 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta cora b* - DCCR

| Efeitos | CR | EP | t (7) | p |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|
| Média | 30,82 | 0,71 | 42,96 | 0,00 |
| X ₁ (L) | 2,58 | 0,67 | 7,66 | 0,00 |
| X ₁ (Q) | 0,19 | 0,74 | 0,53 | 0,61 |
| X ₂ (L) | 0,13 | 0,67 | 0,39 | 0,70 |
| X ₂ (Q) | 0,19 | 0,74 | 0,51 | 0,61 |
| X ₃ (L) | -0,89 | 0,67 | -2,65 | 0,03 |
| X ₃ (Q) | -0,14 | 0,74 | -0,39 | 0,70 |
| X ₁ .X ₂ | 0,09 | 0,88 | 0,21 | 0,83 |
| X ₁ .X ₃ | 0,49 | 0,88 | 1,13 | 0,29 |
| X ₂ .X ₃ | -0,07 | 0,88 | -0,17 | 0,86 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²=87%; R=93%

Tabela 31- Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta Ângulo h° do miolo - DCCR

| Efeitos | CR | EP | T () | p |
|---------------------------------|-------|------|--------|------|
| Média | 84,01 | 0,33 | 250,20 | 0,00 |
| X ₁ (L) | 0,24 | 0,15 | 1,55 | 0,16 |
| X ₁ (Q) | -0,18 | 0,17 | -1,06 | 0,32 |
| X ₂ (L) | -0,36 | 0,15 | -2,33 | 0,05 |
| X ₂ (Q) | 0,04 | 0,17 | 0,24 | 0,81 |
| X ₃ (L) | -0,57 | 0,15 | -3,64 | 0,00 |
| X ₃ (Q) | 0,34 | 0,17 | 2,01 | 0,08 |
| X ₁ . X ₂ | 0,20 | 0,20 | 0,97 | 0,36 |
| X ₁ .X ₃ | -0,12 | 0,20 | -0,61 | 0,55 |
| X ₂ .X ₃ | -0,20 | 0,20 | -1,01 | 0,34 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²=65%; R=80%

Tabela 32- Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta cromaticidade do miolo - DCCR

| Efeitos | CR | EP | t (7) | p |
|---------------------------------|-------|------|---------|------|
| Média | 30,99 | 0,71 | 43,04 | 0,00 |
| X ₁ (L) | 2,59 | 0,33 | 7,65 | 0,00 |
| X ₁ (Q) | 0,20 | 0,37 | 0,55 | 0,59 |
| X ₂ (L) | 0,15 | 0,33 | 0,47 | 0,65 |
| X ₂ (Q) | 0,19 | 0,37 | 0,51 | 0,62 |
| X ₃ (L) | -0,87 | 0,33 | -2,58 | 0,03 |
| X ₃ (Q) | -0,16 | 0,37 | -0,44 | 0,67 |
| X ₁ . X ₂ | 0,07 | 0,44 | 0,17 | 0,86 |
| X ₁ .X ₃ | 0,52 | 0,44 | 1,18 | 0,27 |
| X ₂ .X ₃ | -0,05 | 0,44 | -0,12 | 0,90 |

X₁= metilcelulose; X₂= transglutaminase; X₃= *Spirulina*; R²=87%; R=93%

Apêndice 6 – Fotografias dos pães dos ensaios do planejamento DCCR

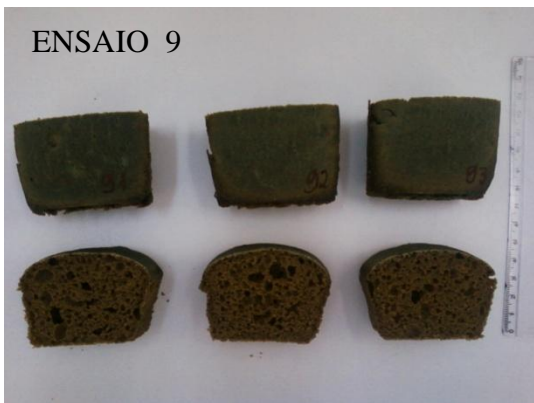




ENSAIO 8



ENSAIO 9



ENSAIO 10



ENSAIO 11





ENSAIO 16



ENSAIO 17

