

## PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO EXERCEM EFEITO PROTETOR EM MASSAS DE PÃO CONGELADAS

CLAUDIA REGINA VIEIRA<sup>1</sup>  
FLÁVIA ASSUNÇÃO CAMPELO<sup>2</sup>  
ISABELA CAMPELO DE QUEIROZ<sup>3</sup>  
MICHELLE SILVA RAMOS<sup>4</sup>  
MÔNICA RIBEIRO PIROZI<sup>5</sup>

Proteína estruturadora de gelo têm grande potencial na aplicação em alimentos congelados, sendo de maior interesse a sua obtenção a partir de fontes vegetais, como os extratos de folhas de cereais. Variedades brasileiras de trigo (BRS Guabiju e CD 104) e centeio (IPR89) após 12 dias de germinação, cresceram por sete semanas sob condições ambientais e frio (0 à 3°C; UR = 80%) com regime de luz (1.400 e 2.000 LUX) e fotoperíodo de 10:14 h (dia:noite). Os extratos obtidos foram reportados como não aclimatados (NA) e aclimatados (AF) e analisados quanto à composição química. A presença de ISP nos extratos AF foi constatada pela morfologia dos cristais de gelo. Os extratos AF foram utilizados em massas congeladas e as massas foram analisadas quanto: sinerése com três ciclos de congelamento/descongelamento, identificação e quantificação de proteínas por cromatografia de exclusão molecular e microestrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A aplicação de extratos AF em massa de pão promoveu uma tendência em diminuir a sinerése durante os ciclos de congelamento/descongelamento quando comparada ao controle sem adição desses extratos. Extratos AF das variedades de trigo não exerceram influência no teor de proteínas poliméricas totais (PPT) e não extraíveis (PPNE) nas massas, mas o de centeio reduziu os valores de PPT e PPNE durante o congelamento. Pelo MEV verificou-se que o uso de extratos AF em massa de pão congelada promoveu maior preservação da matriz protéica, apresentando um grande potencial para produzir um produto com características semelhantes ao de pão fresco.

**PALAVRAS-CHAVE:** ACLIMATAÇÃO AO FRIO. CEREAIS. PROTEÍNA ANTICONGELANTE.

---

<sup>1</sup> Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Docente do Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, crvieira@ica.ufmg.br.

<sup>2</sup> Doutora em Ciência de Alimentos, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, facampelo85@gmail.com.

<sup>3</sup> Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Docente do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, icampelodequeiroz@gmail.com.

<sup>4</sup> Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, msrufv@yahoo.com.br.

<sup>5</sup> Ph.D. Grain Science and Industry, Docente do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, mpirazi@ufv.br.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada n.º 90 de 18 de outubro de 2000, o pão tipo francês é definido como “produto fermentado, preparado, obrigatoriamente, com farinha de trigo, sal (cloreto de sódio) e água, que se caracteriza por apresentar casca crocante de cor uniforme castanho-dourada e miolo de cor branco-creme de textura e granulação fina não uniforme” (BRASIL, 2000). O pão tipo francês é o mais consumido entre os diferentes produtos de panificação produzidos no Brasil (ABIP, 2021).

Desde o início do século XXI, os estabelecimentos no segmento de panificação têm optado pela comercialização de massas congeladas, pães pré-assados congelados ou pães assados congelados, devido à praticidade, diminuição de custos com mão de obra especializada e flexibilidade para a produção com a diminuição considerável do trabalho noturno nesses estabelecimentos (KECHINSKI *et al.*, 2010).

Apesar das vantagens que o congelamento oferece na conservação de massas, o processo de congelamento e o descongelamento podem alterar a atividade fermentativa e causar mudanças nas propriedades reológicas, físicas e sensoriais da massa (YI; KERR, 2009). Portanto, o armazenamento de massas congeladas por períodos prolongados sem alterar a qualidade ainda é um desafio para este segmento de mercado.

No inverno, a temperatura de algumas áreas frias pode chegar abaixo de 40 °C negativos. As plantas de inverno encontradas nas regiões de clima Ártico, Antártico e Alpino desenvolveram alta tolerância ao frio. Acredita-se que as proteínas associadas à tolerância ao congelamento são produzidas endogenamente pelas células das plantas e são secretados através da membrana plasmática para os espaços intercelulares, para efetuar e alterar a formação de cristais de gelo durante a exposição a temperaturas de congelamento (ATICI; NALBANTOĞLU, 2003).

Conhecidas anteriormente como proteínas anticongelantes, as proteínas estruturadoras de gelo (*ice structuring proteins* - ISP) pertencem, portanto, a família de proteínas com capacidade de controlar o crescimento de cristais de gelo com grande potencial de aplicação em indústrias de alimentos (BRASLAVSKY *et al.*, 2013). As ISP podem reprimir a extensão e modificar a morfologia dos cristais de gelo, reduzir ponto de congelamento sem alteração do ponto de fusão, mantendo assim o equilíbrio (histerese térmica), interagir com as nucleações do gelo, inibir a ocorrência de recristalização, aumentar a integridade celular e reduzir o dano ao tecido (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012; NIAN *et al.*, 2020).

Vieira, Pirozi e Campelo (2018) comprovaram a presença de ISP em variedades de trigo aclimatadas ao frio. A análise de eletroforese SDS-PAGE revelou que os extratos de folhas de trigo não aclimatados ao frio possuem bandas protéicas muito pequenas e fracas, entre 14,4 e 97,0 kDa. Em contraste, várias bandas foram observadas em todos os extratos de aclimatados ao frio. A aplicação das ISP como agente de preservação de alimentos tem demonstrado um potencial aumento na qualidade de alimentos congelados, pois uma das vantagens para a indústria de alimentos é que essas proteínas são ativas em quantidades muito pequenas (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012).

Objetivou-se com essa pesquisa obter extratos protéicos com atividade de ISP a partir de cultivares de trigo e centeio e verificar seu efeito crioprotetor em massas de pão tipo francês congeladas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

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

As sementes foram semeadas em vasos plásticos de 4 L de solo contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), superfosfato simples (1 g/L) e calcário dolomítico (15 g/L) crescendo sob condições naturais (sem controle de temperatura, umidade e iluminação) por 12 dias, em casa de vegetação do Setor de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Após esse período, parte das plantas foram transferidas para aclimatação em regime de luz de 10/14 h (dia/noite) por sete semanas em câmara fria com sistema de refrigeração (0 à 3 °C, UR = 80 %) e iluminação (2.000 LUX) adaptados para a pesquisa, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. A outra parte permaneceu sob condições naturais até completar sete semanas de cultivo.

As plantas aclimatadas ao frio (AF) e não aclimatadas ao frio (NA) foram regadas semanalmente, com solução nutritiva [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0,1 %]. Ao término de sete semanas de cultivo, foram obtidos os extratos de ISP a partir das folhas das plantas.

A obtenção dos extratos brutos de ISP foi realizada de acordo com método descrito por Zhang *et al.* (2008) modificado. As folhas das plantas, depois de colhidas, foram cortadas com tesoura em três seções no sentido transversal, lavadas com água deionizada e trituradas em liquidificador (Marca Arno®, modelo Faciliq) na velocidade 1 por 5 min, com solução tampão Tris-HCl (pH 7,4) na proporção 1:7 (amostra:tampão g/mL) para as plantas AF e na proporção 1:20 (amostra:tampão g/mL) para as NA. A mistura foi centrifugada a 3.500 x g a 4 °C por 30 min em centrífuga refrigerada (Marca Novatécnica®, modelo NT 815) e filtrada em papel de filtro Whatman nº 40. Os filtrados contendo as ISP foram definidos como extratos AF e extratos NA e acondicionados em potes plásticos identificados e mantidos sob refrigeração (6 à 10 °C) até a realização das análises.

A atividade das ISP nos extratos AF foi analisada qualitativamente pelo exame da morfologia do crescimento dos cristais de gelo de acordo com Hew *et al.* (1999) com algumas modificações. A morfologia dos cristais de gelo foi analisada por imagens capturadas com câmera digital (Sony® DSC W-150, 8.1 Mega pixels, 5x optical zoom) acoplada ao microscópio de contraste de fase (Olympus® BX 41, Ocular 10x, Objetiva 10x, Contraste PH3), no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A água destilada, a solução tampão Tris-HCl (pH 7,4) e os extratos NA foram usados na comparação.

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

Os extratos AF das folhas de trigo e centeio foram diluídos em água, de modo que três níveis diferentes de proteínas foram adicionados: 4, 8 e 12 mg de proteína/100 g de massa. Amostras sem adição dos extratos AF foram preparadas somente com água (0 mg de proteína/100 g de massa). As amostras de massa foram congeladas em freezer a 18 °C negativos pelo tempo necessário de acordo com a realização das análises.

As amostras contendo os extratos AF e a sem adição de extrato foram submetidas a três ciclos de congelamento (20 horas a 18 °C negativos) e descongelamento (4 horas a 25 °C) segundo metodologia estabelecida por Lee *et al.* (2002), com algumas modificações. A determinação da sinérese (porcentagem de água liberada) foi calculada pela diferença entre a massa inicial ( $M_i$ ) antes do congelamento e a massa final ( $M_f$ ) das amostras após a filtração. Os dados de sinérese foram avaliados com análise descritiva dos histogramas obtidos para as massas de pão preparadas com diferentes extratos AF das cultivares utilizadas no experimento.

Foi empregada metodologia descrita por Pirozi *et al.* (2008) para identificação e quantificação das gluteninas nas massas de pão com e sem adição de extrato AF após o congelamento (18 °C negativos) por 30 dias. Para comparações, foi realizada análise com a massa recém preparada (não congelada) sem adição de extrato.

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

Os cromatogramas foram divididos em picos principais denominados picos 1 e 2, segundo Santos (2008), que correspondem às frações de proteínas polimérica (gluteninas), e monoméricas (gliadinas e albuminas/globulinas), respectivamente. A porcentagem de PPT e PPNE foram calculados conforme as equações 1 e 2, respectivamente.

$$\% PPT = \frac{\text{Área do pico } 1_{PPT}}{\text{Área do pico } 1_{PPT} + \text{Área do pico } 2_{PPT}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% PPNE = \frac{\text{Área do pico } 1_{PPNE}}{\text{Área do pico } 1_{PPNE} + \text{Área do pico } 1_{PPE}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: PPT = Proteína polimérica total; PPNE = Proteína polimética não extraível; PPE = Proteína polimérica extraível.

Na identificação e quantificação de subunidades de gluteninas foi utilizada análise de regressão, com ajustes de modelo para as amostras congeladas. A comparação de médias entre as amostras congeladas e a fresca (controle) foi realizada usando o teste de Dunnett a 5 % de probabilidade.

Foi verificada a aparência da microestrutura da massa de pão tipo francês nas amostras contendo ISP e sem adição de ISP após o congelamento por 90 dias e na massa controle sem adição de ISP recém-preparada (sem congelamento) de acordo com a metodologia descrita por Ribotta *et al.* (2004), utilizando metalizador (Marca Sputtering-Balzers®, modelo FDU-010), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. A análise da morfologia das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Marca Zeiss®, modelo DSM 950) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, utilizando um potencial de aceleração de 15 kV. A micrografia foi realizada com 500x e 5.000x de ampliação da escala de medida da fotografia eletrônica obtida com o software Ditwin 1.0.

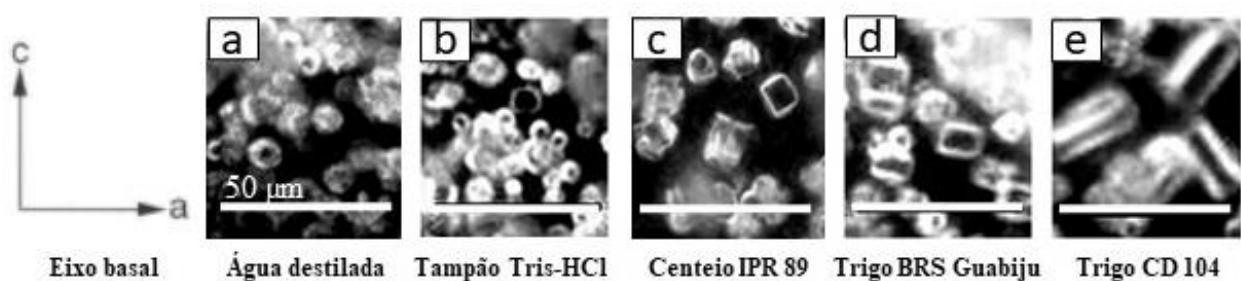
Todas as análises foram realizadas em triplicata e analisadas estatisticamente pelo programa SAS System v. 9.1.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de sólidos totais nos extratos AF das cultivares estudadas foram diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre si. A cultivar de trigo BRS Guabiju apresentou o maior teor (1,92 g/100 g de extrato) quando comparada as cultivares de trigo CD 104 (1,74 g/100 g de extrato) e centeio IPR 89 (1,09 g/100 g de extrato). No entanto, o conteúdo de proteína dos extratos AF obtidos das cultivares BRS Guabiju (60,43 g/100g de matéria seca) e CD 104 (60,14 g/100 g de matéria seca) não diferiram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) e foram maiores que o da IPR 89 (55,78 g/100 g de matéria seca).

Nota-se na Figura 1 (a) e (b), que a água e a solução tampão Tris-HCl formaram cristais redondos e planos, ou seja, o crescimento dos cristais ocorreu no sentido do eixo basal *a*. Segundo dados da literatura, a presença de ISP modifica a forma dos cristais de gelo, que tendem a crescer no sentido do eixo *c* originando formatos menos arredondados, tendendo a conformações prismáticas (BRASLAVSKY *et al.*, 2013, HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012; NIAN *et al.*, 2020). Comparadas aos cristais formados em água pura (Figura 1a) e em tampão (Figura 1b), os extratos AF de todas as cultivares estudadas apresentaram atividade para modificar a forma dos cristais de gelo (Figuras 1c, 1d e 1e). Os extratos das cultivares IPR 89 (centeio) e BRS Guabiju (trigo) apresentaram morfologia semelhante, formando cristais tetraédricos planos, enquanto que a cultivar CD 104 tendeu a formação de colunas hexagonais, o que aparentemente ocorreu devido à maior crescimento ao longo do eixo *c*.

FIGURA 1 – MORFOLOGIA DOS CRISTAIS DE GELO.



Fonte: Dos autores, 2021.

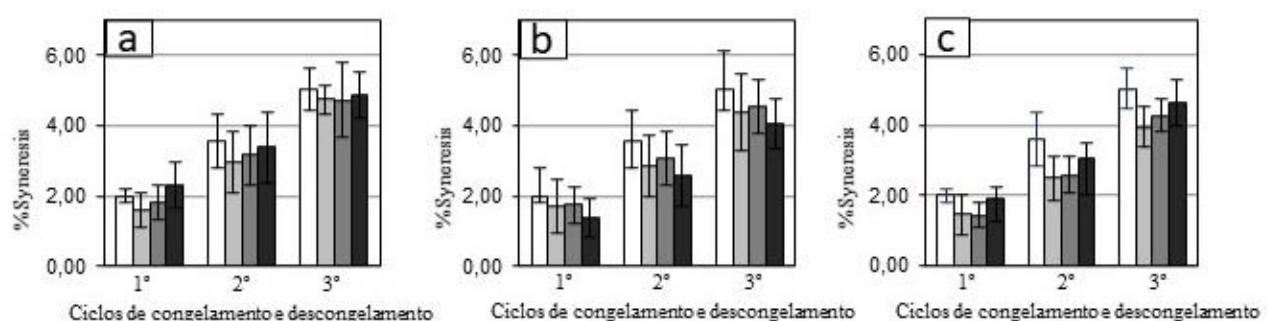
Segundo Hon *et al.* (1994), a atividade anticongelante depende do tipo e concentração de ISP presentes no extrato. As ISP apresentam baixa atividade quando os cristais de gelo possuem formato hexagonal plano com faces pequenas e bem definidas com crescimento ao longo do eixo *c*, enquanto que em altas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

Na Figura 2 estão apresentados os resultados, frente aos ciclos de congelamento e descongelamento, das massas congeladas com adição de diferentes concentrações de ISP dos extratos AF das cultivares IPR 89, BRS Guabiju e CD 104, respectivamente. Nota-se a tendência de aumento na sinérese durante os ciclos de congelamento/descongelamento da massa, podendo estar relacionada à recristalização do gelo na massa congelada. Cristais de gelo maiores crescem às custas de menores e, em seguida, provocam a ruptura da rede de glúten. Quanto maior o tamanho dos cristais de gelo, mais fraca a rede de glúten devido às rupturas causadas no mesmo e assim mais água que estava presa na massa será lançada para fora após o descongelamento, aumentando assim a sinérese na massa congelada.

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

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

FIGURA 2 – PERCENTUAL DE SINÉRESE NAS MASSAS DE PÃO TIPO FRANCÊS UTILIZANDO EXTRATOS AF (A) IPR 89 (CENTEIO), (B) BRS GUABIJU (TRIGO) E (C) CD 104 (TRIGO) DURANTE TRÊS CICLOS DE CONGELAMENTO (20 H/–18°C) E DESCONGELAMENTO (4 H/20°C).



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: Teor de proteína (mg proteína/100 g massa): □ 0 mg □ 4 mg □ 8 mg □ 12 mg

Nota: As barras representam o desvio padrão da média.

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

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

Na Figura 3 estão apresentados os cromatogramas relativos à proteína total (a), extraível (b) e não extraível (c) da massa fresca de pão tipo francês sem adição de extrato AF. O perfil cromatográfico foi semelhante ao da amostra de farinha de trigo. Uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura com a identificação e quantificação de proteínas do glúten em massas de pão, no presente estudo os mesmos indicadores de avaliação da farinha de trigo foram adotados. De modo geral, os cromatogramas para as massas fresca e congelada, com e sem adição de extrato proteico, apresentaram poucas diferenças entre si.

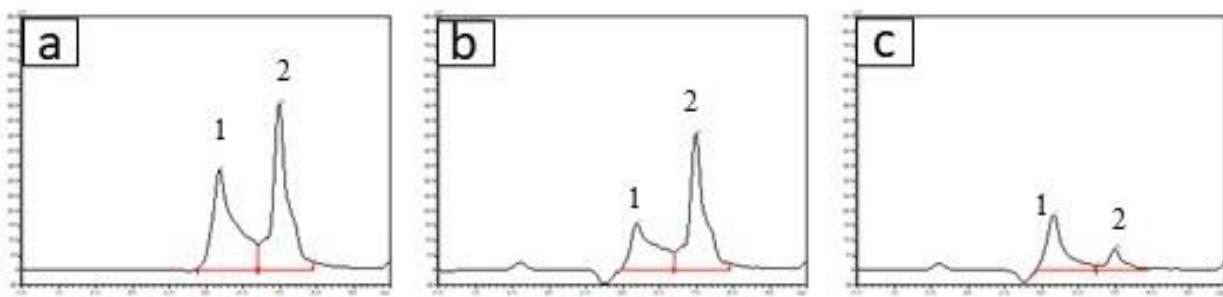
A Figura 4 representa os efeitos da concentração dos extratos AF obtidos da cultivar IPR 89 (centeio) nos teores de PPT e PPNE, respectivamente. O modelo de 1º grau ajustado para essas massas congeladas quanto ao teor de PPT, que explica pelo menos 90,74 % da variação dos dados, está apresentado na Equação 3. Para o teor de PPNE, o modelo de 1º grau, que explica 93,78 % dos dados, encontra-se na Equação 4. Os modelos indicaram que o aumento na concentração de proteína, ou seja, o aumento de extrato AF adicionado nas massas diminui os valores de PPT e PPNE.

$$PT = -0,12[PT] + 48,59 \quad (3)$$

$$PPNE = -0,25[PT] + 45,48 \quad (4)$$

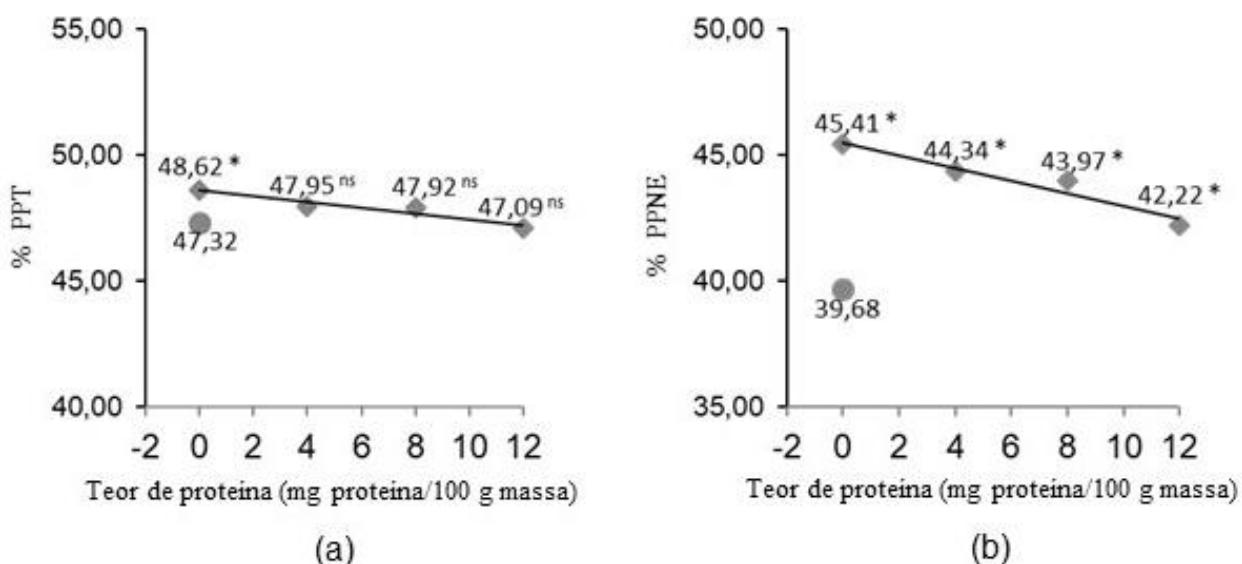
onde, PPT: Proteína polimérica total; PPNE: Proteína polimérica não extraível; PT: Teor de proteína total (mg proteína/100 g massa).

FIGURA 3 – CROMATOGRAMAS DE PROTEÍNA TOTAL (a), EXTRAÍVEL (b) E NÃO EXTRAÍVEL (c) DA MASSA FRESCA DE PÃO TIPO FRANCÊS SEM ADIÇÃO DE EXTRATO AF.



Fonte: Dos autores, 2021

FIGURA 4 – PROTEÍNA POLIMÉRICA TOTAL (a) E NÃO EXTRAÍVEL (b) DAS MASSAS DE PÃO TIPO FRANCÊS CONGELADAS UTILIZANDO EXTRATO AF DA CULTIVAR IPR 89 (CENTEIO).



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: ● Valores para massa fresca (controle). \* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Dunnett. PPT = Proteína polimérica total. PPNE = Proteína polimérica não extraível.

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

Os valores de PPT das massas com adição de extratos AF foram iguais ao da massa fresca (Figura 4 a), o que pode ser indicativo que a presença de ISP nessas massas promoveu comportamento semelhante ao de massa fresca, embora os teores de PPNE tenham sido diferentes. Desta forma, utilizando o modelo de regressão linear para PPT (Equação 1) pode-se dizer que o teor de proteína a ser adicionado na massa para que esta apresente comportamento de massa fresca após o congelamento é de 10,58 mg proteína/100 g massa.

Não foram encontrados modelos que se ajustassem aos valores de PPT e PPNE das massas obtidas com adição dos extratos AF das cultivares BRS Guabiju e CD 104,

indicando que a concentração de proteína (quantidade de extratos AF) presente nas massas não interferiu nos teores de PPT e PPNE. Dessa forma, sugerem-se estudos futuros utilizando outras concentrações de proteínas na elaboração de massas de pão. Foi observada, por microscopia eletrônica de varredura – MEV (500x e 5 000 x de ampliação), que a massa fresca (Figura 5a) apresentou estrutura característica, ou seja, a massa é formada por matriz contínua (rede de glúten) onde os grânulos de amido parecem estar dispersos (ROJAS *et al.*, 2000). A desuniformidade na rede de glúten na massa congelada, com os grânulos de amido aparentemente menos “ligados” a matriz protéica (Figura 5b) sugere que a cristalização do gelo provocou a ruptura da estrutura do glúten.

**TABELA 1 – PROTEÍNA POLIMÉRICA TOTAL E NÃO EXTRAÍVEL DAS MASSAS DE PÃO TIPO FRANCÊS CONGELADAS UTILIZANDO EXTRATOS AF DA CULTIVAR DE TRIGO BRS GUABIJU E DA CULTIVAR CD 104 E DA MASSA FRESCA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO (CONTROLE).**

Amostras	PPT <sup>1</sup>	PPNE <sup>2</sup>
Controle: Massa fresca sem adição de extrato	47,32 $\pm$ 0,41	39,68 $\pm$ 0,42
Massa congelada com adição do extrato AF da cultivar BRS Guabiju:		
0 mg proteína/100 g massa	48,62* $\pm$ 0,68	45,41* $\pm$ 0,85
4 mg proteína/100 g massa	48,46* $\pm$ 0,51	41,50* $\pm$ 0,58
8 mg proteína/100 g massa	48,28 <sup>ns</sup> $\pm$ 0,68	42,75* $\pm$ 0,78
12 mg proteína/100 g massa	48,12 <sup>ns</sup> $\pm$ 0,19	41,75* $\pm$ 0,67
Valor de p	0,0283	< 0,001
DMS <sup>3</sup>	1,0145	1,3072
Massa congelada com adição do extrato AF da cultivar CD 104:		
0 mg proteína/100 g massa	48,62* $\pm$ 0,68	45,41* $\pm$ 0,85
4 mg proteína/100 g massa	48,46* $\pm$ 0,29	41,50* $\pm$ 0,26
8 mg proteína/100 g massa	48,28 <sup>ns</sup> $\pm$ 0,54	42,75* $\pm$ 0,91
12 mg proteína/100 g massa	48,12 <sup>ns</sup> $\pm$ 0,16	41,75* $\pm$ 0,66
Valor de p	0,0064	< 0,001
DMS <sup>3</sup>	0,8726	1,2885

<sup>1</sup> PPT: Proteína polimérica total; <sup>2</sup> PPNE: Proteína polimérica não extraível;

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

Segundo Kontogiorgos; Goff e Kasapis (2008), a natureza da estrutura do glúten e massa tem sido extensivamente investigada usando microscopia. A utilização da MEV em glúten e massa indicou que as proteínas formaram estruturas tridimensionais entrelaçadas de características fibrilar em uma microescala. Esses apontamentos corroboram as observações feitas na massa fresca sem adição de ISP.

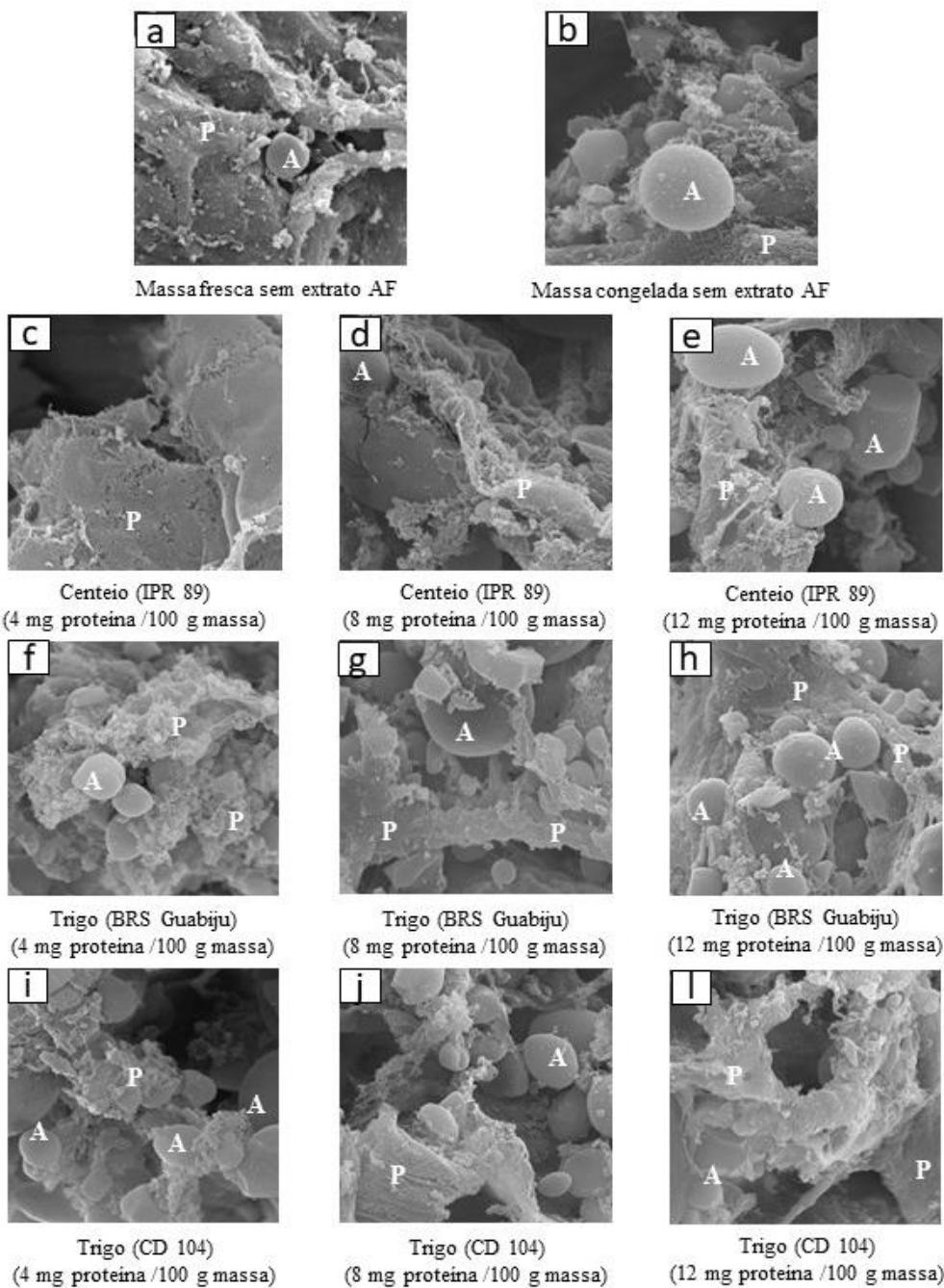
Em um estudo desenvolvido por Ribotta *et al.* (2004) sobre o efeito de emulsificantes e goma guar na micro estrutura de massa de pão congelada, os autores constataram que após 60 dias de estocagem a 18 °C negativos, a matriz de glúten ficou bastante danificada na massa (com e sem aditivos). Os fios de glúten apareceram mais porosos, menos uniformes e mais finos. Além disso, a massa congelada apresentou

tendência a quebrar em pedaços pequenos, talvez, devido ao rompimento do cordão de glúten.

Nas Figuras 5c, 5d e 5e estão apresentadas as imagens obtidas no MEV para as massas congeladas com adição do extrato AF da cultivar IPR 89 em três níveis de concentração de proteína. Pode-se notar que o congelamento provocou danos físicos a matriz protéica quando comparada a massa fresca (Figura 5a). No entanto, a matriz protéica se apresentou mais íntegra nas massas congeladas com adição de extrato AF, principalmente com 4 mg proteína/100 g massa, do que sem adição (Figura 5c).

As imagens obtidas para as massas preparadas com o extrato AF da cultivar BRS Guabiju encontram-se nas Figuras 5f, 5g e 5h. As três concentrações de proteína estudadas proporcionaram maior preservação da rede de glúten após o congelamento em relação à massa congelada sem adição do extrato AF (Figura 5b). Diferente do observado para o centeio, no entanto, o aumento da concentração de proteína do extrato de trigo aclimatado ao frio desta cultivar parece melhorar a estrutura do glúten.

FIGURA 5 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA MASSA DE PÃO TIPO FRANCÊS (a) FRESCA E (b) CONGELADA, AMBAS SEM ADIÇÃO DE EXTRATO AF. DA MASSA DE PÃO TIPO FRANCÊS CONGELADA UTILIZANDO EXTRATOS AF DAS CULTIVARES: IPR 89 (CENTEIO) COM (c) 4 mg PROTEÍNA/100 g MASSA, (d) 8 mg PROTEÍNA/100 g MASSA E (e) 12 mg PROTEÍNA/100 g MASSA; BRS GUABIJU (TRIGO) COM (f) 4 mg PROTEÍNA/100 g MASSA, (g) 8 mg PROTEÍNA/100 g MASSA E (h) 12 mg PROTEÍNA/100 g MASSA; CD 104 (TRIGO) COM (i) 4 mg PROTEÍNA/100 g MASSA, (j) 8 mg PROTEÍNA/100 g MASSA E (l) 12 mg PROTEÍNA/100 g MASSA.



Fonte: Dos autores, 2021.

Legenda: P: Matriz protéica; A: Grânulo de amido.

Nota-se que a massa com 4 mg proteína/100 g massa apresentou rede de glúten mais fina e menos lisa e que a medida que se aumentou a concentração de proteína do extrato AF, esta ficou mais uniforme, com uma matriz protéica mais lisa e contínua, envolvendo mais firmemente os grânulos de amido. Comportamento semelhante foi obtido

para as massas elaboradas com o extrato AF da cultivar CD 104 (Figuras 5i, 5j e 5l). A adição de mais extrato à massa promoveu maior proteção na rede de glúten.

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

Berglund, Shelton e Freeman (1991) estudaram o efeito do tempo de congelamento na estrutura da massa de pão e suas consequências nas propriedades reológicas no pão depois de assado. Os autores verificaram por MEV que a matriz de glúten estava mais rompida e os grânulos de amido e as fibras do glúten ficaram mais finas após 24 semanas de estocagem da massa sob congelamento. Os autores sugerem que por este motivo, os pães apresentaram uma pequena retenção de gás, ou seja, depois de assado resultaram em baixo volume quando comparados a pão não congelado.

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

Kontogiorgos, Goff e Kasapis (2008) investigaram o efeito do envelhecimento e de ISP, concentradas a partir do extrato de folhas de trigo de inverno aclimatadas, sobre as propriedades físicas da mistura de farinha e água submetidas ao congelamento com uma temperatura constante e com flutuações de temperatura. A análise das microestruturas das massas em MEV mostraram que após o congelamento houve formação de duas fases distintas com a matriz glúten-amido homogênea e contínua cercada por áreas irregulares (“vazios”) que supostamente se devem à presença de cristais de gelo ou ar incorporados durante a preparação da massa. Após 30 dias de congelamento, essas áreas se tornaram mais intensas nas amostras sem adição de ISP. A adição de 0,1 % de ISP proporcionou rendimentos ligeiramente distintos nos padrões de formação e cristalização do gelo com o envelhecimento da massa, embora tenha havido uma descontinuidade da matriz proteína.

#### 4. Conclusão

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

### PROTECTIVE EFFECT OF ICE STRUXTURING PROTEÍNA IN FROZEN BREAD DOUGH

## ABSTRACT

Ice structuring proteins have great potential for application in frozen foods, and their obtainment from natural sources has been considered important. Wheat varieties (BRS Guabiju and CD 104) and rye (IPR89) after 12 days of germination, grew for seven weeks under ambient and cold conditions (0 to 3°C; RH = 80%) with light regime (1,400 and 2,000 LUX) and photoperiod of 10:14 h (day:night). The extracts obtained were reported as unacclimated (UA) and cold acclimated (CA) and analyzed for chemical composition. The presence of ISP in the CA extracts was verified by the morphology of the ice crystals. The CA extracts were used in frozen doughs and the doughs were analyzed for: syneresis with three freeze/thaw cycles, identification and quantification of proteins by molecular exclusion chromatography and microstructure by scanning electron microscopy (SEM). The application of CA extracts in bread dough promoted a tendency to decrease syneresis during the freeze/thaw cycles when compared to the control without addition of these extracts. CA extracts from wheat varieties had no influence on total polymeric proteins (PPT) and non-extractable (PPNE) content in the doughs, but rye extracts reduced the values of PPT and PPNE during freezing. By SEM it was found that the use of CA extracts in frozen bread dough promoted greater preservation of the protein matrix, presenting a great potential to produce a product with characteristics similar to those of fresh bread.

**KEYWORDS:** COLD ACLIMATION. CEREALS. ICE STRUCTURING PROTEINS. ANTIFREEZE PROTEIN.

## 5. REFERÊNCIAS

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

ABIP. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE PANIFICAÇÃO. **Perfil do Setor de Panificação no Brasil**, fevereiro de 2009. Disponível em: <<http://www.abip.org.br/>>. Acesso em: 01/11/2021.

ATICI, O.; NALBANTOĞLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. **Phytochemistry**, v.64, n.7, p. 1187-1196, dez. 2003.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pão** – RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 01/11/2021.

BRASLAVSKY, I.; DRORI, R.; CELIK, Y.; DOLEV, M.B.; DAVIES, P.L. The dynamic nature of antifreeze protein activity. **Abstracts/Cryobiology**, v.67, n.3, p. 415-416, dez. 2013.

HASSAS-ROUDSARI, M.; GOFF, H.D. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. **Food Research International**, v.46, n.1, p. 425-436, abr. 2012.

HEW, C.; XIONG, F.; MOFFATT, B.A.; GRIFFITH, M. **Antifreeze proteins, DNA and expression systems**. US Patent WO 99/06565, 1999.

HON, W.C.; GRIFFITH, M.; MLYNARZ, A., KWOK, Y.C. YANG, D.S.C. Extraction and Isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. **Plant Physiology**, v.104, n.3, p. 971-980, mar. 1994.

KECHINSKI, C.P.; CASTRO, M.G.; FLECK, R.J.; NOREÑA, C.Z. Viabilidade de células de levedura em massas congeladas de pão francês. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p. 1193-1198, maio 2010.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice structuring proteins on the morphology of frozen hydrated gluten networks. **Biomacromolecules**, v.8, n.4, p. 1293-1299, maio 2007.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical properties of frozen flour-water mixtures. **Food Hydrocolloids**, v.22, n.6, p. 1135-1147, ago. 2008.

KONTOGIORGOS, V.; REGAND, A.; YADA, R.Y.; GOFF, H.D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. **Journal of food Biochemistry**, v.31, n.2, p. 139-160, abr. 2007.

LEE, M.H.; BACK, M.H.; CHA, D.S.; PARK, H.I.; LIM, S.T. Freeze-thaw stabilization of sweet potato starch gel by polysaccharide gums. **Food Hydrocolloids**, v.16, n.4, p. 345-352, jul. 2002.

NIAN, L.; CAO, A.; CAI, L. Investigation of the antifreeze mechanism and effect on quality characteristics of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) during F-T cycles by hAFP. **Food Chemistry**, v.325, n.30, p. 1-10, set. 2020.

PAYNE, S.R.; YOUNG, O.A. Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality. **Meat Science**, v.41, n.2, p. 147-155, 1995.

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

RIBOTTA, P.D.; PÉREZ, G.T.; LEÓN, A.E.; AÑÓN, M.C. Effect of emulsifier and guar gum on micro-structural, rheological and baking performance of frozen bread dough. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.2, p. 305-313, mar. 2004.

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

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

VIEIRA, C. R.; PIROZI, M. R.; CAMPELO, F. A. Physicochemical characterization of ice structuring proteins in Brazilian wheat and rye varieties. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.10, n.1, p. 18-23, 2018.

XU, H.; HUANG, W.; JIA, C.; KIM, Y.; LIU, H. Evaluation of water holding capacity an breandmaking properties for frozen dough containing ice structuring proteins from winter wheat. **Journal of Cereal Science**, v.49, n.2, p. 250-253, mar. 2009.

YI, J.; KERR, W.L. Combined effects of dough freezing and storage conditions on bread quality factors. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n.4, p. 495-501, ago. 2009.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, n.6, p. 1029-1036, jul. 2008.