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

ENRIQUECIMENTO DE PÃO DE TRIGO E DE ARROZ COM PEPTÍDEOS BIOATIVOS DA PROTEÍNA DE CHIA (*Salvia hispanica*)

KARINA MEDEIROS MADRUGA

MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS MELLADO
Orientador
MERITAINE DA ROCHA
Co-orientadora

RIO GRANDE, RS
2018

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

ENRIQUECIMENTO DE PÃO DE TRIGO E DE ARROZ COM PEPTÍDEOS BIOATIVOS DA PROTEÍNA DE CHIA (*Salvia hispanica*)

KARINA MEDEIROS MADRUGA
Bacharela em Química de Alimentos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dra. MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS MELLADO

Orientador
Dra. MERITAINE DA ROCHA
Co-orientadora

RIO GRANDE, RS
2018

Ficha catalográfica

M183e Madruga, Karina Medeiros.
Enriquecimento de pão de trigo e de arroz com peptídeos bioativos da proteína de chia (*Salvia hispanica*) / Karina Medeiros Madruga. – 2018.
108p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.
Orientadora: Dra. Myriam de las Mercedes Salas Mellado.
Coorientadora: Dra. Meritaine da Rocha.

1. Chia 2. Peptídeos Bioativos 3. Pães 4. Celíacos I. Mellado, Myriam de las Mercedes Salas II. Rocha, Meritaine da III. Título.

CDU 664.6

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Karina Medeiros Madruga e aprovada em 29 de março de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Myriam de las Mercedes Salas-Mellado - FURG

Profa. Dra. Marcia de Mello Luvielmo - FURG

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández - FURG

Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavaraze - UFPel

Dedico aos meus pais, Alfredo e Lilia Valéria
e aos meus irmãos Felipe e Júlia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, muito obrigada, por iluminar meu caminho com oportunidades e pessoas que permitiram que eu chegasse até aqui, e também pelos obstáculos, que me fizeram crescer;

À minha família, meus pais e meus irmãos, as pessoas mais importantes da minha vida, meus maiores incentivadores, com quem eu sempre posso contar, muito obrigada pelo amor, carinho e apoio.

À minha orientadora, Profª Drª Myriam Salas Mellado, incentivo, confiança e pelos conhecimentos que me transmitiu ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora, Drª Meritaine da Rocha, muito obrigada por sempre me incentivar, me apoiar, pelos momentos de descontração e por ser, acima de tudo, minha amiga.

À todos os colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pela amizade, incentivo e momentos de descontração, os levarei sempre em meu coração.

Às minhas amigas Bruna e Taiane que mesmo longe nunca deixaram de torcer por mim e me incentivar muito obrigada pelo carinho.

À todos meus amigos que conquistei durante o mestrado, em especial a Camila, Karina, Alan Gabriel e Débora. Obrigada por estar ao meu lado durante toda essa jornada, compartilhando momentos de tristeza e de alegria; muito obrigada pelo incentivo de sempre.

Ào meu namorado Leonardo, obrigada por estar sempre do meu lado, me incentivando, apoiando e pelo carinho.

Às empresas Giroil, LNF, Cerealle, Moinho Galópolis, Ajinomoto e Colorcon pelo fornecimento da farinha de chia desengordurada, enzima Alcalase, farinha de arroz, farinha de trigo, enzima Transglutaminase e Metilcelulose utilizadas neste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas pelo fornecimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e *Escherichia Coli* O157:H7 (ATCC 10832).

À todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande pela colaboração e oportunidade concedida. À Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea anual que pertence à família *Lamiaceae*, nativa do sul do México e do norte da Guatemala. A chia possui conteúdo de proteína de 19-23%, o qual pode variar devido ao local, genética, ambiente e cultivar, podendo ser fonte de peptídeos com diferentes propriedades bioativas, tais como antioxidante e antimicrobiana, as quais são influenciadas pela sua composição e sequência aminoacídica. O pão é um alimento consumido no mundo todo, sendo que no Brasil o seu consumo per capita é de 33,5 kg por habitante/ano, mais consumido na região sul e sudeste. A doença celíaca é considerada uma patologia autoimune, sendo o único tratamento eficaz a estrita adesão à dieta isenta de glúten. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo estudar a influência da adição de hidrolisado proteico de chia nas propriedades tecnológicas e bioatividade, de pães de trigo e de arroz. O concentrado proteico da chia foi obtido através do método de *pH-shifting*, utilizando como matéria-prima a fração rica em proteínas que foi obtida pelo peneiramento da farinha de chia desengordurada. Em seguida foi realizada a hidrólise enzimática do concentrado proteico, utilizando a enzima Alcalase, até obter um grau de hidrólise de 30%. O hidrolisado de chia foi avaliado quanto a atividade antimicrobiana e atividade antioxidante e posteriormente foi adicionado em pães de trigo e de arroz nas concentrações de 1, 3 e 5 mg/g de farinha, para verificar a influência da adição na firmeza do miolo, volume específico, cor, pontuação total e avaliação sensorial dos pães. A atividade antioxidante dos pães foi determinada pelos métodos de DPPH, ABTS e poder redutor. O hidrolisado de chia apresentou atividade antimicrobiana e antioxidante. A adição de hidrolisado aos pães de trigo, na maior concentração (5 mg/g de farinha), proporcionou redução no volume específico, aumento na dureza do miolo e diminuição da pontuação global. Para os pães de arroz o pão adicionado de 3 mg de hidrolisado foi o que apresentou o maior volume específico, não se diferenciou na dureza comparado com o pão padrão e a pontuação diminuiu à medida que aumentou a concentração de hidrolisado de chia na formulação. Para o pão de trigo com adição de 3 mg de hidrolisado o poder antioxidante aumentou apenas na determinação pelo método do poder redutor, sendo que para o pão de arroz a adição de hidrolisado mostrou atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e Poder Redutor. Para o pão de trigo com adição de 3 mg de hidrolisado/g de farinha o poder antioxidante aumentou apenas na determinação pelo método do poder redutor, sendo que para o pão de arroz a adição de hidrolisado na mesma concentração revelou atividade antioxidante pelos métodos DPPH e poder redutor. Foi constatado assim que, a adição de hidrolisado afetou os pães de arroz de maneira mais favorável comparado aos pães de trigo. Quanto a análise sensorial não houve diferença significativa na preferência entre os pães padrão e os pães adicionados de 3 mg de hidrolisado por g de farinha, tanto para os pães de trigo como para os de arroz.

Palavras-chaves: Chia. Peptídeos bioativos. Pães. Celíacos.

ABSTRACT

Enrichment of wheat bread and rice with bioactive peptides of chia protein (*Salvia hispanica* L)

Chia (Salvia hispanica L.) is an annual herbaceous plant belonging to the Lamiaceae family, native to southern Mexico and northern Guatemala. Chia has 19-23% protein content, which may vary due to local, genetic, environment and cultivar, and may be a source of peptides with different bioactive properties, such as antioxidant and antimicrobial, which are influenced by their composition and amino acid sequence. Bread is a food consumed worldwide, in Brazil its per capita consumption is 33.5 kg per inhabitant / year, being consumed more in the south and southeast. Celiac disease is considered an autoimmune pathology, the only effective treatment being strict adherence to a gluten-free diet. In this context, the present study aimed to study the influence of chia protein hydrolyzate addition on technological properties and antioxidant activity of wheat and rice breads. The protein concentrate of chia was obtained by the pH-shifting method, using as raw material the protein rich fraction that was obtained by the sifting of the defatted chia flour. Then, the enzymatic hydrolysis of the protein concentrate was performed, using the enzyme Alcalase, until a degree of hydrolysis of 30% was obtained. The chia hydrolyzate was evaluated by antimicrobial activity and antioxidant activity and was subsequently added in wheat and rice breads at concentrations of 1, 3 and 5 mg / g of flour, to verify the influence of addition on the firmness of the crumb, color, total score and sensory evaluation of wheat and rice breads. The antioxidant activity of the breads was determined by the methods of DPPH, ABTS and reducing power. Chia hydrolyzate presented antimicrobial and antioxidant activity. The addition of hydrolyzate to wheat breads, at the highest concentration (5 mg / g flour), resulted in reduction in specific volume, increase in kernel hardness and decrease in overall score. For rice breads the added bread of 3 mg of hydrolysate was the one that presented the highest specific volume, did not differentiate in the hardness compared to the standard bread and the score decreased as the concentration of chia hydrolyzate in the formulation increased. For wheat bread with addition of 3 mg of hydrolysate, the antioxidant activity increased only in the determination by the Reducing Power method, and for rice bread the addition of hydrolyzate showed antioxidant activity in the DPPH and Reducing Power methods. For wheat bread with addition of 3 mg of hydrolyzate / g of flour the antioxidant activy increased only in the determination by the Redusing Power method, and for the rice bread the addition of hydrolyzate at the same concentration revealed antioxidant activity by the DPPH and Reducing Power methods. It was found that the addition of hydrolyzate affected rice loaves more favorably than wheat loaves. As for the sensorial analysis, there was no significant difference in the preference between standard breads and the added loaves of hydrolyzate for both wheat and rice breads.

Keywords: Chia. Bioactive peptides. Breads. Celiacs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações dos pães de farinha de trigo. 52
Tabela 2. Formulações dos pães de farinha de arroz. 54
Tabela 3. Composição proximal da farinha de chia desengordurada, fração rica em proteínas e concentrado proteico. 57
Tabela 4. Atividade antimicrobiana do hidrolisado proteico de chia 60
Tabela 5. Mínima concentração inibitória do hidrolisado de chia. 61
Tabela 6. Características tecnológicas dos pães de trigo padrão e com adição de hidrolisado proteico de chia. 62
Tabela 7. Características tecnológicas dos pães de arroz padrão e com adição de hidrolisado de chia. 65
Tabela 8. Parâmetros de cor da crosta e do miolo dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado 67
Tabela 9. Parâmetros de cor da crosta e do miolo dos pães de arroz padrão e adicionados de hidrolisado proteico de chia. 69
Tabela 10. Características tecnológicas dos pães de trigo e de arroz padrão e com adição de hidrolisado proteico de chia. 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico de chia. 47
Figura 2. Elaboração do pão de trigo 53
Figura 3. Fluxograma da elaboração do pão de arroz. 54
Figura 4. Grau de hidrólise com relação ao tempo de obtenção do hidrolisado enzimático proteico de chia utilizando a enzima Alcalase..... 59
Figura 5. Fotografias de pães de trigo padrão a) adicionado de 1 mg de hidrolisado de chia g/ de farinha b)..... 68
Figura 6. Fotografias de pães de trigo adicionados de 3mg a) e 5mg de hidrolisado de chia por g/ de farinha b). 69
Figura 7. Fotografias de pães de arroz padrão a) adicionados de 1mg de hidrolisado de chia/ g de farinha b)..... 71
Figura 8. Fotografias de pães de arroz adicionados de 3 mg a) 5 mg de hidrolisado de chia/g de farinha b)..... 71
Figura 9. Atividade antioxidante apresentada pelo hidrolisado de proteína de chia analisado por diferentes métodos..... 73
Figura 10. Atividade antioxidante determinada pelos métodos de DPPH, ABTS e Poder Redutor dos pães de trigo a) e arroz b) padrão comparados com os pães adicionados de 3mg de hidrolisado de chia. 76
Figura 11. Comparação pareada de preferência entre os pães de trigo a) e arroz b) padrão e do adicionado de 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha. 78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23

2. OBJETIVOS 27
2.1. GERAL 27
2.2. ESPECÍFICOS 27

3. REVISÃO DA LITERATURA 29
3.1. CHIA (*SALVIA HISPANICA* L.) 29
3.2. CONCENTRADO PROTEICO 30
3.3. HIDROLISADO PROTEICO 31
3.4. PEPTÍDEOS BIOATIVOS 33
3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 34
3.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 35
3.7. PÃO 36
3.8. INGREDIENTES UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DO PÃO DE TRIGO 36
3.8.1. Farinha de trigo 36
3.8.2. Água 37
3.8.3. Fermento biológico 38
3.7.4. Cloreto de sódio 38
3.8.5. Sacarose 38
3.8.6. Gordura 39
3.9. INGREDIENTES UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DO PÃO DE ARROZ 39
3.9.1. Farinha de arroz 39
3.9.2. Enzima transglutaminase 40
3.9.3. Metilcelulose 40
3.10. APLICAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS EM PÃES 40
3.11. AVALIAÇÃO SENSORIAL 42

4. MATERIAL E MÉTODOS 45
4.1. MATERIAL 45
4.2. MÉTODOS 45
4.2.1. Caracterização da matéria-prima e dos produtos 45
4.2.2. Obtenção da fração rica em proteína 46
4.2.3. Obtenção do concentrado proteico 46
4.2.4. Atividade enzimática da enzima Alcalase 47
4.2.5. Hidrólise do concentrado proteico 48
4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HIDROLISADO DE CHIA 49
4.3.1. Teste de disco difusão 49
4.3.2. Porcentual de inibição 49
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO E DOS PÃES DE TRIGO E ARROZ ENRIQUECIDOS COM HIDROLISADOS DE CHIA 50
4.4.1. Preparo da amostra de hidrolisado 50
4.4.2. Preparo das amostras de pães 50
4.4.3. Capacidade do sequestro do radical $DPPH^{\cdot}$ 50
4.4.4. Poder redutor 51
4.4.5. Captura do radical $ABTS^{\cdot+}$ [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico] 51
4.5. ELABORAÇÃO DOS PÃES 52

4.6. AVALIAÇÃO TECNOLOGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS PÃES 55
4.6.1. Volume específico 55
4.6.2. Pontuação total 55
4.6.3. Firmeza do miolo do pão 55
4.6.4. Cor do miolo e da crosta dos pães 55
4.7. AVALIAÇÃO SENSORIAL 56
4.8. TRATAMENTO DE DADOS 56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA FARINHA DE CHIA DESENGORDURADA, DA FRAÇÃO RICA EM PROTEÍNAS E DO CONCENTRADO PROTEICO. 57
5.2. HIDRÓLISE DO CONCENTRADO PROTEICO 58
5.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HIDROLISADO DE CHIA 60
5.4. CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DOS PÃES DE TRIGO E DE ARROZ ADICIONADOS DE HIDROLISADO PROTEICO DE CHIA. 62
5.4.1. Volume específico, dureza e pontuação total dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado de chia 62
5.4.2. Volume específico, dureza e pontuação total dos pães de arroz padrão e adicionados de hidrolisado de chia. 65
5.4.3. Cor da crosta e do miolo dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado de chia 67
5.4.4. Cor da crosta e do miolo dos pães de arroz padrão e adicionados de hidrolisado de chia 69
5.4.5. Comparação das características tecnológicas dos pães de trigo e arroz padrão e adicionados de hidrolisado de chia 72
5.5. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO E DOS PÃES DE TRIGO E DE ARROZ COM ADIÇÃO DE HIDROLISADO DE CHIA 73
5.6. ANALISE SENSORIAL DOS PÃES DE TRIGO E DE ARROZ ADICIONADOS DE HIDROLISADO PROTEICO DE CHIA 78

6. CONCLUSÕES 81
6.1. CONCLUSÕES PARCIAS 81
6.2. CONCLUSÃO GERAL 81

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

APÊNDICES 99

ANEXOS 101

1. INTRODUÇÃO

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea anual que pertence à família Lamiaceae, que é nativa do sul do México e do norte da Guatemala (CAPITANI et al., 2012; GOH et al., 2016; ORONA-TAMAYO et al., 2015). A concentração proteínas da chia vária de 19-23%, sendo esse conteúdo é superior ao de outros grãos tais como trigo (14%), aveia (15,3%), milho (14%) e arroz (8,5%) (KAČMÁROVÁ et al., 2016), dependendo da geográfica, da cultivar, e da genética da chia (COELHO; SALAS-MELLADO, 2014).

As proteínas da chia contêm quatro frações diferentes entre as quais as globulinas são os componentes principais (52% da proteína total) e as albuminas (17,3%), glutelinas (14,5%) e prolaminas (12,7%) estão presentes em quantidade semelhante. Estas proteínas são facilmente digeríveis, e contêm todos os aminoácidos essenciais (TIMILSENA et al., 2016). O consumo da chia fornece inúmeros benefícios à saúde e as suas proteínas podem ser disponibilizadas como peptídeos biologicamente ativos. Estes peptídeos podem ser obtidos através dos processos de hidrólise química, hidrólise enzimática entre outros (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

O processo de hidrólise química envolve ácidos ou bases fortes apresentam várias desvantagens como alterações na composição proximal do produto final, condições operacionais rigorosas que causam a desnaturação proteica. Além disso, pode ocorrer o aparecimento de uma cor castanha devido à reação de Maillard e a formação de produtos indesejáveis (DE ALMEIDA et al., 2015). Por esta razão, a hidrólise enzimática, é preferida na indústria de alimentos, pois não deixa resíduos orgânicos ou componentes químicos tóxicos nos produtos. Além disso, apresenta um potencial benéfico para a saúde, desempenhando diferentes atividades biológicas que são em grande parte devido aos peptídeos constituintes (NAJAFIAN; BABJI, 2012; UGOLINI et al., 2015; ZHANG; MU 2017).

Os peptídeos, em geral, podem desempenhar diversas bioatividades, com base na sua massa molecular, composição e sequência aminoacídica tais como: imunomodulatória (MORONTA et al., 2016), antimicrobiana (TANIGUCHI et al., 2017), hipocolesterolêmica (WERGEDAHL et al., 2004), anti-hipertensiva (FRANCO-MIRANDA et al., 2017; SEGURA-CAMPOS et al., 2013; RYAN et al., 2011) e antioxidante (SABENNA FARVIN et al., 2016; FRANCO-MIRANDA et al., 2017; KIMATU et al., 2017; ORONA-TAMOYO et al., 2015).

Os peptídeos antioxidantes são importantes, pois podem atuar na prevenção de doenças, como aditivos alimentares, nos quais contribuem para a inibição da oxidação dos mesmos (DI BERNARDINI et al., 2011). Atualmente, os hidrolisados proteicos com potencial antioxidante têm despertado o interesse, devido aos efeitos benéficos à saúde. Gómez-Guillén, et al (2011) relataram que as propriedades antioxidantes dos peptídeos estão relacionadas à sua composição, estrutura e hidrofobicidade de aminoácidos. Os aminoácidos hidrofóbicos foram observados em várias sequências de peptídeos antioxidantes (ALEMÁN et al., 2011). Um estudo anterior, também indicou que os aminoácidos ácidos, como glutâmico e (Glu) aspártico (Asp), têm fortes efeitos antioxidantes devido à presença de excesso de elétrons, que podem ser doados durante as interações com os radicais livres; também demonstrou que a presença de metionina (Met), histidina (His), lisina (Lys) e tirosina (Tyr) contribuem para a atividade antioxidante dos peptídos (HE et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos possuem certas características comuns, tais como a massa molecular inferior de 10 kDa e a presença de aminoácidos hidrofóbicos. O principal mecanismo de inibição das bactérias é a lesão na membrana celular microbiana, onde os peptídeos antimicrobianos carregados positivamente se ligam a membrana carregada negativamente, resultando em lesões que causam a perda da viabilidade celular (NAJAFIAN; BABJI, 2012; SEGURA-CAMPOS et al., 2013). Isso os torna uma fonte alternativa visando superar o desafio da resistência bacteriana (LAKSHMAIAH NARAYANA; CHEN, 2015).

Os peptídeos bioativos da proteína de chia oferecem potencial para o desenvolvimento de alimentos saudáveis e que apresentam características desejáveis para os produtos de panificação, como volume específico, cor e textura do miolo. O pão é um alimento consumido no mundo todo; no Brasil segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias, Pães e Bolos Industrializados (ABIMAPI, 2016), seu consumo per capita é de 33,5 kg por habitante/ano, o equivalente a 3 pães por dia, sendo mais consumido na região sul e sudeste, como pão francês ou pão de forma. Nas últimas décadas, pesquisadores têm trabalhado para fortificar pão de trigo com compostos naturais e também produzir pães com farinha de arroz (COELHO; SALAS-MELLADO, 2015; STORCK et al., 2009). O pão de arroz não apresenta glúten sendo uma alternativa para os celíacos, e a adição de hidrolisado de chia poderá agregar valor ao produto, tornando este alimento mais nutritivo e com propriedades bioativas.

A Doença Celíaca (DC) é considerada uma patologia autoimune, produto de interação entre fatores ambientais, genéticos e imunológicos. O autoantígeno causa sensibilidade permanente ao glúten, causando lesão inflamatória em indivíduos geneticamente suscetíveis.

O único tratamento eficaz para a doença celíaca é a estrita adesão à dieta isenta de glúten durante toda a vida (FIGUEIRA et al., 2011; SEGURA-CAMPOS et al., 2013; STORCK et al., 2009). Em vista disso, nos últimos anos, os produtos sem glúten tornaram-se populares, alimentando um mercado crescente, pois não só atendem a indivíduos com necessidades médicas, mas também a milhões de consumidores que acreditam que são produtos saudáveis (MENGA et al., 2017; PELLEGRINI; AGOSTONI, 2015). Os peptídeos biologicamente ativos da proteína de chia são uma alternativa para agregar valor aos pães de trigo e de arroz devido à demanda por alimentos saudáveis. Entretanto, não há estudos da aplicação de hidrolisado de chia em pães de arroz, sendo assim este estudo irá propiciar um conhecimento maior do efeito dos hidrolisado de chia em pães de arroz.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o efeito da adição de hidrolisado proteico de chia nas características tecnológicas e na bioatividade de pães de trigo e de arroz.

2.2. ESPECÍFICOS

- Obter o concentrado proteico de chia pelo método de variação de pH .
- Obter o hidrolisado a partir do concentrado proteico de chia utilizando a enzima Alcalase;
- Determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana do hidrolisado proteico de chia;
- Elaborar pães de trigo e de arroz adicionados de hidrolisado proteico de chia;
- Avaliar o efeito da adição do hidrolisado proteico de chia sobre as características tecnológicas e atividade antioxidante dos pães;
- Avaliar a preferência dos pães de trigo e arroz com relação ao pão padrão mediante análise sensorial.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CHIA (*SALVIA HISPANICA* L.)

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea anual pertencente a família Lamiaceae, que cresce em áreas que se estendem do sul do México até o norte da Guatemala (MUÑOZ et al., 2012). Os registros históricos sugerem que as sementes de chia foram um dos alimentos básicos para a civilizações Maia e Asteca. Elas eram torradas e/ou misturadas com água como uma papa ou moídas e utilizadas como farinha para cozimento (GOH et al., 2016). Juntamente com o milho, feijão e o amaranto foi um dos alimentos mais importantes para mais de 11 milhões de pessoas, quando Cristóvão Colombo chegou à América. Após a conquista espanhola, a chia essencialmente desapareceu durante 500 anos, mas a partir da última década do século XX, os estudos com chia foram retomados por cientistas e agricultores, em razão de suas características nutricionais e funcionais (LUNA PIZARRO et al., 2013).

No ano de 2012, a área estimada de cultivo no mundo era de 10.000 hectares. A produção mundial da semente é estimada de 5.000 toneladas/ano, isto representa uma produtividade média de 500 kg/ha. O maior produtor de chia em 2012 foi à Austrália, mas o cultivo também é difundido em países como México, Guatemala, Argentina, Bolívia, Equador e recentemente Paraguai, Brasil, Chile e Peru. No Brasil, as regiões do oeste do Paraná e noroeste do Rio Grande do Sul começaram a investir neste cultivo nos últimos anos (MIGLIAVACCA et al., 2014).

A chia tem 25-38 % de lipídeos, que tem elevado conteúdo de ácido α-linolênico, 50-67% (ômega-3) e ácido linoleico, 17-27% (ômega-6) em equilíbrio, tornando a semente fonte de ácidos graxos. A chia também é rica em vitaminas, como riboflavina, niacina, tiamina e macro e micronutrientes tais como cálcio, fósforo, potássio, zinco, magnésio e cobre. Além disso, contém alta proporção de compostos antioxidantes naturais tais como tocoferol, beta-caroteno, ácido clorogênico, ácido cafeico e flavonóides como quercetina, miristicina e campferol, impedindo assim a oxidação dos ácidos graxos insaturados em alimentos. Também podem proteger os consumidores contra algumas condições adversas de saúde, tais como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (COELHO; SALAS-MELLADO, 2014; IGLESIAS-PUIG; HAROS, 2013).

Segundo o estudo realizado por Olivos-Lugo, Valdivia-López e Tecante (2010), o perfil de aminoácidos na chia permite que ela seja uma considerável opção como fonte

proteica, sendo composta por teores elevados, principalmente, de arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Cresce o interesse por proteínas isoladas e concentrados proteicos, com base em fontes vegetais, em virtude de seu uso como ingredientes com propriedades funcionais que, também, podem melhorar a qualidade nutritiva de alimentos (SANDOVAL OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013).

Outras culturas tradicionais como milho, trigo, arroz, aveia, cevada e amaranto, possuem uma qualidade proteica inferior quando comparados com a chia; além disso, ela contém todos os aminoácidos essenciais (CARUSO et al., 2018). Por outro lado, a proteína isolada a partir de fontes vegetais é de interesse devido à sua crescente utilização como ingrediente com propriedades funcionais, que também pode melhorar a qualidade nutritiva de alimentos (CARUSO et al., 2018; COELHO; SALAS-MELLADO 2014; TIMELSENA et al, 2016).

3.2. CONCENTRADO PROTEICO

As pesquisas têm sido voltadas para a produção de isolados e concentrados proteicos obtidos de vegetais, especialmente devido a crescente aplicação de proteínas vegetais como ingredientes em alimentos funcionais na indústria alimentar. Tal uso industrial requer grandes quantidades de concentrados e isolados de proteínas, os quais devem ser obtidos através de métodos simples e rápidos, além de apresentarem propriedades funcionais que tornem seu uso tecnologicamente apropriado. Assim, tais produtos podem ser usados como ingredientes com propriedades funcionais desejáveis, como capacidade de emulsificação, capacidade de formação de espuma, solubilidade, entre outras e das quais depende o sucesso de sua incorporação em alimentos na suplementação ou substituição de proteínas tradicionais (AJIBOLA et al., 2016; CARVALHO et al., 2009).

O concentrado proteico pode ser obtido por processo de precipitação com solução alcoólica de etanol (60-80%), precipitação com solução ácida (pH 4,5), ou por desnaturação por vapor e lavagem com água quente (FIGUEIREDO, 2015). Entretanto, a aplicação do processo por mudança de pH (pH-*shifting process*) para obtenção do concentrado proteico tem recebido mais atenção nestes últimos anos. Este método consiste primeiramente em solubilizar as proteínas em pH ácido ou alcalino e, na segunda etapa do processo, a precipitação da proteína no ponto isoelétrico (JIANG; XIONG; CHEN, 2010).

Este método tem proporcionado a obtenção de concentrados proteicos com boas propriedades nutricionais e funcionais, que podem ser utilizados para a formulação de produtos alimentícios. Suas principais aplicações são na formulação de produtos de panificação e confeitaria, produtos lácteos como iogurtes e substitutos lácteos, farinhas, produtos cárneos emulsionados e embutidos (FIGUEIREDO, 2015).

3.3. HIDROLISADO PROTEICO

Os hidrolisados proteicos são produtos que podem ser utilizados em vários alimentos, devendo ser entendidos como proteínas que são clivados em peptídeos de vários tamanhos (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNANDEZ, 2009). A hidrólise de proteínas tem como principais objetivos: alterar as propriedades funcionais e produzir aminoácidos e pequenos peptídeos. Além disso, a alimentação com hidrolisado proteico pode proporcionar melhor utilização das proteínas, disponibilizando aminoácidos diferentes (ROMAN; SGARBIERI, 2005).

Pode-se dizer que a hidrólise de uma proteína ocorre do seguinte modo: proteína, polipeptídios, peptídeos, aminoácidos. A clivagem pode ocorrer tanto quimicamente, por ácido ou base, quanto enzimaticamente, pela atuação de enzimas. Ao contrário da hidrólise ácida e alcalina, o processo enzimático ocorre sob condições brandas, sem produzir produtos de degradação, apresentando assim bom controle do processo e das propriedades dos produtos resultantes (FIGUEIREDO, 2015).

A modificação enzimática das proteínas utilizando enzimas proteolíticas selecionadas para cindir ligações peptídicas específicas é amplamente utilizada na indústria de alimentos (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009). A adição de enzimas para hidrolisar as proteínas dos alimentos é um método reconhecido por melhorar ou modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas iniciais, sem prejudicar o seu valor nutritivo (DE OLIVEIRA et al., 2015). Estudos comprovaram que as proteases produzem melhores resultados mantendo o valor nutricional dos alimentos, porém a qualidade do produto varia com a natureza da enzima e as condições de processamento (SARMANDI; ISMAIL, 2010; SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

As enzimas proteolíticas atuam na quebra de ligações peptídicas presentes nas proteínas e, dependendo da sua especificidade, podem afetar o tamanho, a quantidade, a composição de aminoácidos livres, peptídeos e a sequência de aminoácidos que as compõem

(WU; CHEN; SHIAU, 2003). A Alcalase é uma enzima microbiana produzida por fermentação submersa do *Bacillus licheniformis* e foi desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes (KRISTINSSON; RASCO, 2000). O principal componente enzimático, a subtilisina, é considerada uma endoprotease do tipo serina e tem uma ampla especificidade de substrato, podendo hidrolisar a maioria das ligações peptídicas dentro de uma molécula de proteína (IUBMB, 2016). Tem-se provado repetidamente, por muitos pesquisadores, que é a melhor enzima usada na preparação de diversos hidrolisados proteicos. Evangelho et. al (2015) em estudo realizado sobre a atividade antioxidante de hidrolisado de feijão preto utilizando as enzimas Alcalase e Pepsina, verificou que o hidrolisado obtido pela enzima Alcalase apresentou maior atividade antioxidante que o obtido pela enzima Pepsina. Herpandi et al. (2012) utilizaram diferentes enzimas proteolíticas (Alcalase® 2.4L FG, Protamex®, Neutrase® 1,5 mg e Flavourzyme® 500 mg) para hidrolisar as proteínas de atum (*Katsuwonus pelamis*) e constataram que a Alcalase® 2.4L FG apresentou o maior grau de hidrólise entre todas as proteases, seguido da Protamex®, Flavourzyme® 500MG e Neutrase® 1,5 mg.

A Alcalase foi utilizada por Fonseca (2014), que também utilizou as enzimas Flavourzyme e Protamex para obter hidrolisado proteico de bijupirá (*Rachycentron canadum*). Segura-Campos et. al (2013) realizaram hidrólise enzimática em sistema sequencial utilizando as enzimas Alcalase e Flavourzyme, e adicionaram hidrolisado de chia em creme de cenoura e pão de trigo. Eitel (2015) avaliou a obtenção de hidrolisados proteicos de farelo de soja desengordurado utilizando a enzima Alcalase e avaliando a capacidade antioxidante e a atividade anti-hipertensiva.

Conforme citado por Hedstrom (2002), o sítio ativo da enzima Alcalase apresenta uma tríade composta pelos aminoácidos: serina, histidina e ácido aspártico e cada um desses aminoácidos executa uma tarefa específica no processo de hidrólise: a serina possui o grupamento OH-, que atua como nucleófilo atacando o carbono do grupamento carboxílico que participa de ligação peptídica; Um par de elétrons do nitrogênio da histidina é capaz de aceitar o hidrogênio do grupo OH- da serina, iniciando a formação de um intermediário tetraédrico, seguida da quebra da ligação peptídica; O grupo carboxílico do ácido aspártico, no entanto, interage com a histidina através de ligações de hidrogênio, fazendo com que o átomo de nitrogênio mencionado acima se torne mais eletronegativo.

Segundo Nascimento (2015), a hidrólise enzimática utilizada para liberação de peptídeos bioativos a partir da proteína intacta, permite a otimização do rendimento destas biomoléculas, pois possibilita a escolha do substrato, das enzimas específicas e das condições

de reação. O hidrolisado de proteína de chia com atividade biológica melhorada pode revelar-se um ingrediente funcional eficaz numa vasta gama de alimentos (SEGURA-CAMPOS et al., 2013).

3.4. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Os peptídeos são moléculas produzidas por todos os seres vivos, são derivados a partir de proteínas, de origem bacteriana, vegetal e animal. São compostas por sequência de aminoácidos que apresentam grande variedade estrutural e funcional apresentando atividades opióides, antitrombótica, anti-hipertensiva, imunomoduladora, antimicrobiana, antioxidante, carreadora de minerais e de diminuição do colesterol (SILVA; MALCATA, 2005).

Os peptídeos bioativos são definidos como fragmentos de proteína específicos, que têm um impacto positivo nas funções ou condições do corpo e podem, em última instância, influenciar a saúde. Seu tamanho pode variar de 2 a 20 aminoácidos, estão inativos na sequência primária da proteína original e tornam-se ativos quando liberados durante o processamento de alimentos por hidrólise enzimática, fermentação ou durante o trânsito gastrointestinal (HARNEDY; O'KEEFFE; FITZGERALD, 2017; KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Os peptídeos antioxidantes são estruturas simples que em pequenas quantidades são capazes de retardar a decomposição de outras substâncias pelo oxigênio que deriva na oxidação e produção de espécies reativas de oxigênio envolvidas no dano de estruturas biológicas (ORONA-TAMAYO et al., 2015; ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008). O uso de antioxidantes sintéticos deve ser rigorosamente controlado devido a possíveis problemas de saúde. Por isso, é necessário identificar fontes alternativas naturais e seguras de antioxidantes alimentares. A busca de antioxidantes naturais, especialmente de origem vegetal, aumentou notavelmente nos últimos anos. Existe um interesse crescente na substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais de fontes alimentares por seus potenciais benefícios para a saúde com pouco ou nenhum efeito colateral (NAJAFIAN; BABJI, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos receberam considerável atenção como potencial terapêutico, devido ao aumento da resistência contra os antibióticos convencionais. Seu principal modo de ação é através da ruptura da membrana da parede celular dos micro-organismos (NORDSTRÖM et al., 2018). Além disso, possuem carga líquida positiva e

molécula anfipática, ou seja, que possui regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Duas características são comuns para os peptídeos antimicrobianos: uma carga catiônica e uma proporção significativa de resíduos hidrofóbicos. O primeiro promove seletividade para interações eletrostáticas com as membranas citoplasmáticas e membranas de mamíferos zwitteriônicas, enquanto que o segundo facilita a interação com as cadeias de ácidos graxos (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). Os peptídeos antimicrobianos exibem um amplo espectro de ação antibacteriano, antifúngico, antiviral, anticancerígeno, antiparasitário, antioxidante, o que os torna uma ferramenta importante e promissora para aplicação em vários campos. (JEŻOWSKA-BOJCZUK; STOKOWA-SOŁTYS, 2018; NARAYANA; CHEN, 2015; SEGURA-CAMPOS et al 2013; RYDLO; MILTZ; MOR, 2006).

Dentre os estudos de peptídeos obtidos a partir de hidrolisado, que demonstram benefícios a saúde, encontram-se as pesquisas com proteínas de sementes oleaginosas (NASCIMENTO, 2015). Peptídeos com atividades biológicas, tais como antimicrobiana e antioxidante foram estudados em chia (ORONA-TAMAYO et al., 2015; SEGURA-CAMPOS et al., 2013), linhaça (UDENIGWE et al., 2009), soja e de colza (HE et al., 2012), amendoim (JI et al., 2014), quinoa (NONGONIERMA et al., 2015) e amaranto (MORONTA et al., 2016).

3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes podem ser definidos como um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas que retardam o aparecimento de alterações oxidativas em alimentos. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, em fármacos ou como suplementos nutricionais devem ser seguros para a saúde (JE et al., 2007; SILVA, 2014).

Para prevenir, retardar ou inibir a oxidação lipídica em indústrias de alimentos e farmacêuticas, muitos antioxidantes sintéticos estão sendo utilizados. Os antioxidantes sintéticos, tais como o hidroxitolueno de butila (BHT), hidroxianisol de butila (BHA), *terc*-butilhidroquinona (TBHQ), galato de propilo, ácido ascórbico e tocoferol, são comumente usados para prevenir a oxidação lipídica e a formação de radicais livres em alimentos aquecidos e armazenados por muito tempo. Contudo, o seu uso é restrito em alguns países devido a riscos potencias para a saúde, em vista disso tem sido dada muita atenção aos

hidrolisados como antioxidantes naturais devido aos efeitos benéficos à saúde (DI BERNARDINI et al., 2011; GRAMZA-MICHAŁOWSKA; KMIECIK, 2016).

Os mecanismos antioxidantes dos peptídeos dependem das suas propriedades físico-químicas, as quais são determinadas por sua massa molecular, sequência, estrutura, carga e da composição de aminoácidos. Os hidrolisados com o maior grau de hidrólise são preferidos a fim de assegurar a presença de peptídeos pequenos os quais tem sido relatado como potentes antioxidantes (DI BERNARDINI et al., 2011; FRANCO-MIRANDA et al., 2017; NAJAFIAN; BABJI, 2012).

Assim, os antioxidantes naturais provenientes de peptídeos bioativos tem sido um foco de atenção de numerosos estudos, onde relatam as propriedades antioxidantes de hidrolisado enzimáticos de diversas fontes de proteína (KIMATU et al., 2017); feijão preto (EVANGELHO et al., 2017); feijão lima e feijão caupi (FRANCO-MIRANDA et al., 2017) chia (SEGURA-CAMPOS et al., 2013); farelo de arroz (THAMNARATHIP et al., 2016) e milho (JIN et al., 2016).

3.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos são compostos essenciais para prevenir infecções bacterianas. A este respeito, eles são amplamente utilizados na medicina, mas também em outros campos, como cosméticos, alimentos, têxteis e embalagens (BELMESSIERI et al., 2017). Durante as últimas décadas, a disponibilidade de uma grande variedade de antibióticos e seu amplo uso no combate a infecções resultou em um aumento progressivo da resistência de linhagens de micro-organismos patogênicos a estes compostos, limitando progressivamente seu uso no combate a infecções. Sendo assim nos últimos anos, novas classes de antibióticos, incluindo peptídeos ou proteínas antimicrobianas (PAM) de origem vegetal, têm sido investigados como alternativas a esse problema emergente (JIANG et al., 2014; PENNA et al., 2001). Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos contra micro-organismos e como cada método é baseado em princípios diferentes, os resultados obtidos podem ser influenciados, não somente pelo método escolhido, mas também pelos micro-organismos utilizados para realizar o teste, e pelo grau de solubilidade de cada composto. Os mais conhecidos incluem método de disco difusão, método de macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY et al., 2008).

O teste de difusão em disco é aceito pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e estabelecido como padrão pelo *National Committe for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS, 2005) o qual é baseado na presença ou ausência de um halo de inibição.

3.7. PÃO

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define pão como todo produto obtido pela cocção, em condições técnicas adequadas, de massa preparada com farinha de trigo, fermento biológico, água e sal, podendo conter outras substâncias alimentícias aprovadas (BRASIL, 2000). O pão é considerado um dos alimentos mais antigos e mais consumidos pela humanidade (CAUVAIN; YOUNG, 2009). No Brasil, segundo Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães e Bolos Industrializados (ABIMAPI, 2016), seu consumo per capita é de 33,5 kg por habitante/ano, o equivalente a 3 pães por dia, sendo mais consumido na região sul e sudeste, como pão francês ou pão de forma. A farinha de trigo é o principal ingrediente na formulação do pão de trigo, responsável pelo fornecimento de proteínas que atuam na formação da rede de glúten que, juntamente com a água, conferem uma estrutura viscoelástica característica deste produto (FERREIRA, 2013).

A farinha de arroz é uma opção para a produção de produtos sem glúten, por ser um alimento proteico livre de inibidores enzimáticos que prejudicam a absorção de nutrientes, possui um sabor suave, cor branca, propriedades hipoalergênicas e uma alta proporção de carboidratos facilmente digeríveis. No entanto, quando a farinha de arroz é amassada com água, não ocorre à formação de uma massa viscoelástica que retém o CO_2, formado durante a fermentação e, consequentemente, o produto resultante tem baixo volume específico e apresenta características muito distintas do pão de trigo. (STORCK et a 2009; SELMO; SALAS-MELLADO, 2014).

3.8. INGREDIENTES UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DO PÃO DE TRIGO

3.8.1. Farinha de trigo

A farinha de trigo é o produto obtido a partir da espécie *Triticum aestivum*, ou outras espécies do gênero *Triticum*, reconhecidas através do processo de moagem do grão de trigo beneficiado (OWENS, 2001). É o ingrediente mais importante em panificação, devido à

presença de glúten, que forma e mantém a estrutura celular da massa até a gelatinização do amido no cozimento, quando será formada a estrutura final do pão. É recomendado o uso de farinhas de trigo com conteúdo proteico entre 10,5 e 12,0% para a produção do pão (GUTKOSKI; NODARI; NETO, 2003).

A farinha de trigo indicada para o uso em panificação é do tipo forte ou especial, por ser rica em proteínas de ótima qualidade, o teor e a qualidade das proteínas formadoras do glúten da farinha de trigo são os principais fatores pelo seu potencial de panificação, não obstante o amido, lipídeos e componentes aquossolúveis da farinha serem também necessários para produção de pão com volume, textura e frescor adequados. Durante o processo de mistura, as proteínas insolúveis (gliadinas e gluteninas) da farinha de trigo hidratam-se, formando o glúten, que após o tempo ótimo de mistura é capaz de reter os gases produzidos pelas leveduras durante a fermentação da massa. As gliadinas são as principais responsáveis pelo controle do volume do pão, enquanto que as gluteninas respondem pelos tempos de mistura e de desenvolvimento da massa, sendo essa fração a mais elástica e coesa das duas (AQUARONE et al., 2008). Quando é misturada farinha de trigo e água pode-se observar a formação de uma massa constituída de rede proteica do glúten ligada a grânulos de amido que retém o gás carbônico e faz com que o pão aumente de volume (GUARIENTI, 1993).

3.8.2. Água

A água tem importância primordial na formação da massa, que quando adicionada a farinha, assegura a união das proteínas que dão origem ao glúten. Além disso fornece meio propicio ao desenvolvimento da atividade enzimática e, consequentemente, à fermentação do pão, contribuindo para a elasticidade, consistência da massa, textura e maciez do pão, bem como para a hidratação do amido e conferir sabor ao produto (AQUARONE et al., 2008).

A quantidade de água utilizada nas formulações é determinante na consistência final da massa, contribuindo para a maciez e textura do pão. A falta de água na quantidade adequada provoca baixa hidratação do glúten, que não desenvolve adequadamente sua elasticidade, enquanto quantidade excessiva de água resulta em massa grudenta com baixa resistência à extensão. A temperatura da água adicionada deve ser ajustada a fim de se obter uma massa com temperatura adequada no final do batimento, controlando assim a atividade da levedura. A determinação da temperatura da água a ser adicionada leva em consideração

fatores como a temperatura do ambiente, temperatura da farinha, coeficiente de atrito e temperatura final desejada da massa (AQUINO, 2012).

3.8.3. Fermento biológico

O fermento usado normalmente pela maioria das padarias é do tipo fresco, e é oriundo da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O fermento biológico pode se apresentar de três formas: fresco, seco ativo e instantâneo. No processo de panificação, sua função principal é a de provocar a fermentação dos açúcares, produzindo o gás carbônico, que ao mesmo tempo é responsável pela formação de alvéolos internos e pelo crescimento da massa. O fermento também exerce influencia sobre as propriedades reológicas da massa, tornando-a mais elástica e porosa, que após o cozimento produz pão digestível e nutritivo (AQUARONE et al., 2008).

3.7.4. Cloreto de sódio

O cloreto de sódio, sal, é um ingrediente indispensável na panificação. Conforme Gewehr (2010) o sal atua principalmente sobre as características da massa, uma vez que as gliadinas têm menor solubilidade em água salina, resultando na formação de maior quantidade de glúten. Além disso, o uso do sal na panificação resulta em uma estrutura de glúten mais rígida devido à formação de fibras curtas, fazendo com que retenha o gás produzido pelo fermento, tornando a massa mais compacta e mais fácil de trabalhar do que aquela obtida sem sal, também possui função de branqueador do miolo dos pães, higroscópico e controlador da fermentação (AQUINO, 2012).

3.8.5. Sacarose

O açúcar comum, a sacarose quando utilizado na panificação, além de dar sabor e auxiliar na coloração da casca, melhora também a textura do miolo, ao atuar como retentor de umidade da massa. Contudo, o seu uso em excesso retarda a ação do fermento, devendo, portanto, ser balanceado com os demais ingredientes (PHILIPPI, 2003).

3.8.6. Gordura

As gorduras podem ser descritas como “agentes de enriquecimento” dos produtos fermentados, onde alteram as cadeias de glúten, dando maciez e umidade a massa. Elas influenciam as características sensoriais do pão e dos produtos fermentados, proporcionando uma mordida mais curta, mais suave, e simultaneamente um modesto aumento da vida de útil do pão. Contribuem no sabor, na cor e na textura, além de auxiliar como aeradores de produtos cremosos, permitindo à incorporação do ar na massa, auxiliando no manuseio da massa, deixando-a menos pegajosa. Envolve o glúten e outros ingredientes e os lubrifica para que não fiquem pesadamente coesos e sem espaço, proporcionando maciez (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

A gordura é um aditivo extremamente importante na elaboração de pão. Além de seu efeito melhorador da massa e na qualidade do pão, também atua no valor nutricional pelo fornecimento de mais energia. Pode ser utilizada em concentrações altas de 6 a 7%, mas normalmente é de 3%. Quando utilizada em excesso, forma uma massa bastante extensível, que se torna incapaz de resistir a pressão do gás produzido durante a fermentação (GUERREIRO, 2006).

3.9. INGREDIENTES UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DO PÃO DE ARROZ

3.9.1. Farinha de arroz

O Brasil destaca-se como o maior produtor de arroz da América Latina e o décimo maior produtor mundial. A produção de arroz no Brasil totalizou 12.317,7 mil toneladas na safra 2016/2017 (CONAB, 2017), o que faz do país o maior produtor mundial de arroz entre as nações não asiáticas (USDA, 2010). O Rio Grande do Sul é o principal estado produtor de arroz no Brasil, com produção equivalente a 65% da produção total do país (CONAB, 2011).

Apesar de apresentar menor custo, a farinha de arroz não possui volume de produção expressivo por não apresentar aplicação competitiva em relação à farinha de trigo; mas possui algumas vantagens especiais que a tornam um importante ingrediente alimentício como: não ser alergênica, resultar de variedades com ampla faixa de teor de amilose, o que permite a seleção de acordo com a finalidade, não ser tóxica para portadores de doença celíaca, podendo ser utilizada como substituto do trigo na elaboração de produtos sem glúten (FIGUEIRA et al., 2011).

3.9.2. Enzima transglutaminase

A enzima transglutaminase, é uma γ-glutamil-transferase que catalisa a reação entre um grupo ε-amino dos resíduos de lisina e um grupo γ-carboxiamida nos resíduos de glutamina e uma variedade de aminas primárias, levando a uma ligação cruzada covalente das proteínas (MOTOKI; SEGURO, 1998) o que converte proteínas solúveis em polímeros insolúveis de alta massa molecular (LARRE et al., 2000). Essa conversão faz com que essas proteínas apresentem capacidade de retenção de gás durante a fermentação, papel semelhante ao desempenhado pelo glúten. 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 da rede proteica e que têm um efeito positivo no comportamento reológico das massas em geral (CABALLERO et al., 2005).

3.9.3. Metilcelulose

As gomas ou hidrocolóides são muito utilizadas 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).

Os demais ingredientes que compõem o pão de arroz foram descritos anteriormente, nos itens 3.8.2, 3.8.3, 3.8.4, 3.8.5, 3.8.6, juntamente com suas respectivas funções.

3.10. APLICAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS EM PÃES

Figueira et al. (2011) estudaram o enriquecimento de pão de arroz com adição da microalga *Spirulina platensis* em diferentes concentrações 2, 3, 4 e 5% (base farinha) contendo na sua formulação o hidrocolóide hidroxipropilmetilcelulose e a enzima tranglutaminase e verificaram que em relação aos pães controle, os pães sem glúten com adição de até 4% da microalga não diferiram no volume específico e na dureza em relação ao

pão padrão de arroz; entretanto, quando elaborados com 2 a 5%, apresentaram cor do miolo mais escura e com tendência a cor verde com intensidade proporcional à adição da microalga. No ponto de vista sensorial, não houve preferência entre o pão com 3 e 5% de *Spirulina platensis*.

Segura-Campos et al. (2013) verificaram que a inclusão e hidrolisado de chia, de 1 e 3 $mg.g^{-1}$ em pão branco, aumentou a atividade antioxidante e a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I, sem afetar notavelmente a qualidade do produto.

Selmo e Salas-Mellado (2014) estudaram o efeito da adição de metilcelulose, enzima transglutaminase e *Spirulina* no pão de arroz, e verificaram melhora nas características tecnológicas do pão de farinha de arroz, usando metilcelulose, transglutaminase e *Spirulina*, permitindo a definição de formulações com boas características tecnológicas, químicas e sensoriais.

Coelho e Salas-Mellado (2015) relataram o efeito da substituição da farinha de trigo por sementes de chia (*Salvia hispanica L.*) na qualidade do pão. Ao reduzir o teor de gordura vegetal hidrogenada e incluindo sementes ou farinha de chia em pães, foi possível reduzir os teores de gordura saturada e aumentar os teores de gordura poliinsaturada, além de aumentar o nível de fibra, produzindo produtos com as características de alimentos funcionais. A qualidade tecnológica dos pães foi afetada pela adição de chia nas formulações, levando a uma diminuição no volume específico e nos valores de pontuação total.

Steffolani et al. (2015) estudaram o efeito da adição de diferentes formas de chia, sem ou com pré-hidratação, sobre as propriedades reológicas da massa de pão de trigo, sobre a qualidade tecnológica e sensorial dos pães. Os autores obtiveram como tendência geral, que a incorporação de chia reduziu o volume específico dos pães, embora fossem obtidos maiores valores com a adição de farinha chia quando comparados aos pães com a adição de sementes.

Graça et al (2016) estudaram a adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz e relataram que a adição de colágeno aos pães não colaborou para a formação de uma rede semelhante à formada pelo glúten. Entretanto o pão da formulação com 4% de colágeno em fibra (base farinha) apresentou as características tecnológicas mais próximas ao controle.

Verdú et al (2015) estudaram os efeitos físico-químicos da farinha de chia em cada fase do processo de fabricação de pão de trigo e armazenamento do produto. Foram testadas farinhas de trigo com três diferentes graus de substituição (5%, 10% e 15%) de farinha de chia. Neste estudo conclui-se que os graus de substituição, até 15%, poderiam ser utilizados para melhorar não apenas a provisão nutricional, mas também as propriedades

tecnológicas das farinhas de trigo. Mais estudos serão necessários para avaliar a aceitação dos consumidores nos produtos com esses graus de substituição e as propriedades de cada fração de componentes de semente de chia.

Fernandes e Salas-Mellado (2017) avaliaram a adição de mucilagem de sementes de chia para redução do teor de gordura em pão e bolos, utilizando mucilagem liofilizada e mucilagem seca em estufa a 50 °C. Os pães e bolos de chocolate, adicionados de mucilagem liofilizada e de mucilagem seca em estufa a 50 °C mostraram eficiência na substituição de gordura na formulação. Do ponto de vista sensorial, os produtos com mucilagem seca a 50 °C foram mais aceitáveis, o que apresenta uma vantagem, uma vez que este tipo de secagem é menos dispendioso que a liofilização.

Franco-Miranda et al. (2017) estudaram a inclusão de hidrolisado de feijão lima e feijão caupi de 1 e 3% (base farinha), na elaboração de pão doce mexicano tipo concha. Os autores demonstraram que a substituição afetou as propriedades reológicas, aumentou a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e a atividade antioxidante, tornando a adição de hidrolisado uma opção viável e melhorando o valor funcional do produto.

3.11. AVALIAÇÃO SENSORIAL

A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993) como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. É realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos as várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos.

A análise sensorial realizada através de testes discriminativos permite identificar diferenças significativas entre amostras ou entre uma amostra e um padrão. O teste de comparação pareada é um teste discriminativo de diferença e tem por finalidade determinar a diferença ou preferência entre dois produtos, com relação a um atributo ou a um critério pré-definido. Este teste é uma das formas mais simples, fáceis e seguras para determinação de diferenças e similaridades. Uma das principais vantagens é não causar fadiga aos órgãos do sentido, porém mostra-se inviável para realização de intercomparações. O teste de comparação pareada é o método onde testa-se a escolha de uma amostra sobre a outra, onde

são apresentadas duas amostras e pergunta-se ao provador qual ele prefere (TEIXEIRA; MAINERT; BARBETTA, 1987; SANCHO; BOTA; CASTRO, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

A farinha de chia desengordurada foi fornecida pela empresa Giroil, localizada na cidade de Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, RS. A farinha de arroz com a seguinte composição: carboidratos (91,58%), umidade (10,03%), proteínas (6,77%), lipídeos (0,51%) e cinzas (0,37%), foi fornecida pela Cerealle indústria e Comércio de Cereais Ltda., localizada na cidade de Pelotas, RS. A farinha de trigo com a seguinte composição: carboidratos (72,27%), umidade (13,49%), proteínas (10,03%), cinzas (0,68%) e lipídeos (0,53%) foi fornecida pelo moinho Galópolis, situado na cidade de Rio Grande, RS. Os ingredientes como fermento biológico, açúcar, sal e óleo de soja foram adquiridos no comércio local. A enzima transglutaminase (TGase) Activa, WM® foi fornecida pela indústria Ajinomoto, São Paulo. A metilcelulose (Methocel A4M premium) foi fornecida pela Colorcon, São Paulo. A enzima Alcalase® 2.4 L FG, uma endopeptidase bacteriana produzida a partir do *Bacillus linchenformis*, foi fornecida pela LNF Latino Americana, localizada em Bento Gonçalves, RS.

Os meios de cultura utilizados para realizar a atividade antimicrobiana foram o ágar infusão cérebro e coração (BHI) (Kaski, Itália); caldo infusão de cérebro e coração (Caldo BHI) (Himedia, Índia). Duas cepas de micro-organismos foram utilizados: um Gram positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e um Gram negativo *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) fornecidos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos os reagentes utilizados para a determinação da composição proximal e para a obtenção de concentrado e hidrolisado proteico de chia, assim como para a atividade antioxidante, foram de grau analítico.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Caracterização da matéria-prima e dos produtos

O conteúdo de umidade (método nº 935.29), cinzas (método nº 923.03), lipídeos (método nº 920.85) e proteínas (método de micro-Kjeldahl, nº 920.87) foram determinados de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists International* – AOAC (2000). O

conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença. As determinações foram realizadas nas farinhas de trigo e arroz, na farinha de chia desengordurada e no concentrado proteico de chia.

4.2.2. Obtenção da fração rica em proteína

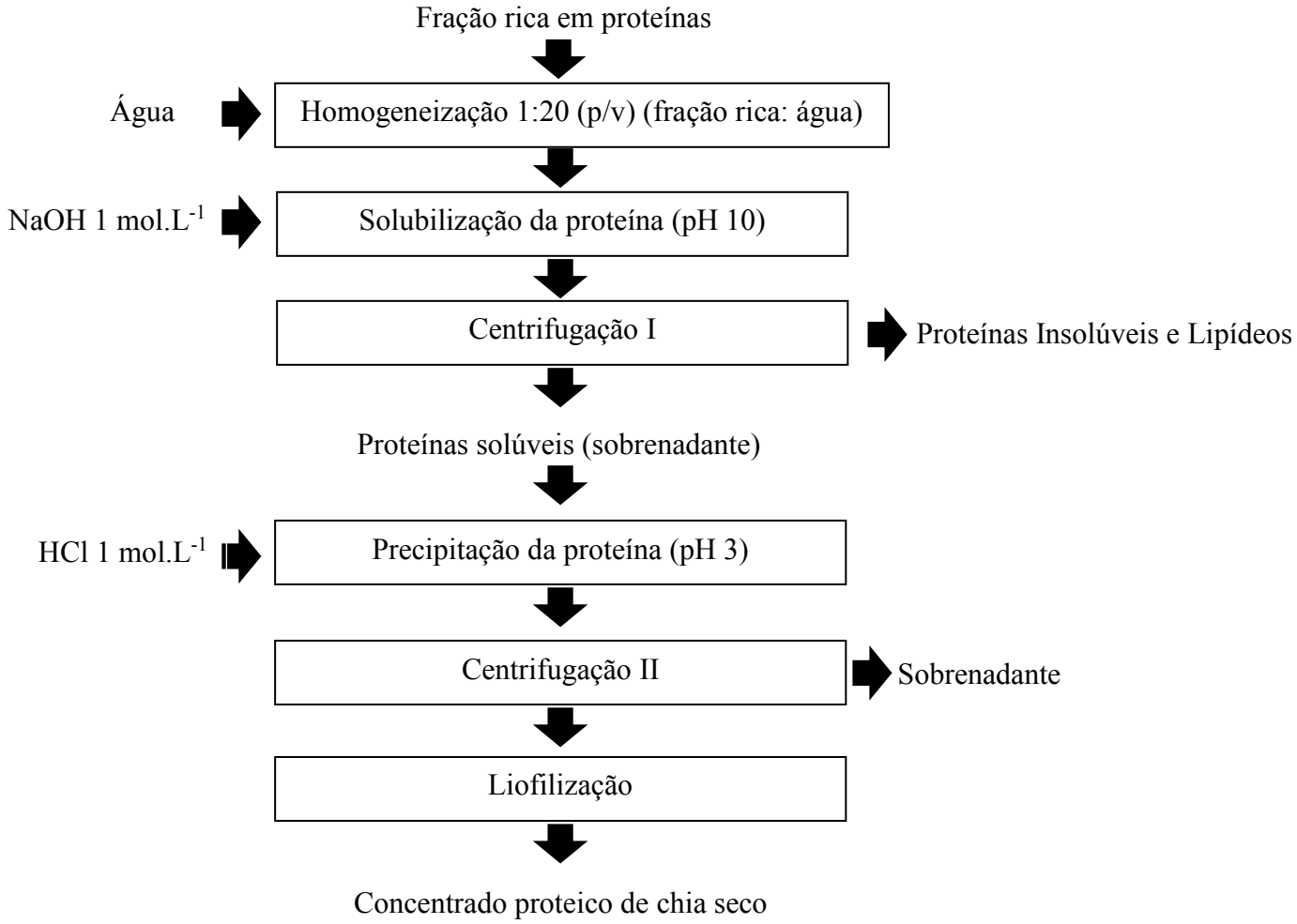
A fração rica em proteína foi obtida através do peneiramento de 250 g de farinha de chia desengordurada em peneira de 100 mesh, segundo o método de Otto; Baik e Czuchajowska (1997). Onde a fração retida (superior) é composta, principalmente, de fibras e a fração passante (inferior) principalmente de proteínas.

4.2.3. Obtenção do concentrado proteico

O concentrado proteico da fração rica em proteínas foi obtido pelo método de *pH-shifting* segundo Nolsoe e Undeland (2009) com modificações. A Figura 1 apresenta o fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico.

Primeiramente foi realizada a homogeinização sob agitação mecânica na proporção de 1:20 (fração rica em proteínas: água destilada; p/v). Em seguida, o pH do homogeneizado foi ajustado para 10, através da adição de hidróxido de sódio 1M, para solubilização proteica, sob agitação mecânica (Fisatom, 723, Brasil) constante durante 20 min. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada em centrifuga (Hanil, Supra 22k, Japão) a 14.308 x *g* a 25 ºC durante 20 minutos, obtendo-se três fases: proteínas insolúveis, lipídeos neutros e as proteínas solúveis, no sobrenadante. As proteínas insolúveis e lipídeos foram descartados e as proteínas solúveis precipitadas, através da adição de ácido cloridrico 1M até atingir o pH 3. Então foi homogeneizado durante 20 min a 25 ºC. Após foi realizada a centrifugação a 14.308 x *g,* a 25 °C durante 20 min, posteriormente o sobrenadante foi descartado e precipitado foi ultracongelado e ultrafreezer a -80 ºC por 48 h e posteriormente liofilizado em liofilizador (Liotop, L108, Brasil) durante 48 h obtendo-se o concentrado proteico de chia seco.

Figura 1. Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico de chia.



4.2.4. Atividade enzimática da enzima Alcalase

A atividade enzimática da enzima Alcalase foi realizada segundo o método descrito pela SIGMA-ALDRICH (2017) utilizando caseína (0,65%; p/v) como substrato. A caseína foi diluída em tampão fosfato de sódio pH 7,5 a 37 °C. Então, 1 mL da solução de enzima, diluída 10 vezes foi adicionada e incubada a 37 °C durante 10 min. Em seguida adicionou-se 5 mL de ácido tricloroacético (110 mM) para parar a reação. Logo, a suspensão foi centrifugada a 14,308 xg durante 30 min. Posteriormente, alíquotas de 2 mL do filtrado obtido foram utilizadas para realizar a reação colorimétrica, adicionando 5 mL de carbonato de sódio (500 mM) e 1 mL de Folin-Ciocalteau (1:4, v/v) e foram incubadas a 37 °C. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Kasuaki, IL-592, Brasil) a 660 nm. As curvas de tirosina nas concentrações de 0; 0,01; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,06 μmol/mL e de albumina nas concentrações de 0; 0,003, 0,013; 0,02 e 0,0027 e 0,03 mg/mL foram obtidas segundo os Apêndices 1 e 2, respectivamente, para cálculo da atividade enzimática. A

atividade específica da enzima foi expressa em U/mg de proteína, sendo que uma unidade de atividade (U) corresponde a 1 µmol de tirosina/min.

4.2.5. Hidrólise do concentrado proteico

O concentrado proteico da farinha de chia foi hidrolisado pelo método descrito por Pedroche et al. (2002) utilizando Alcalase como enzima, até atingir o grau de hidrólise de 30%. Para tanto, foram utilizandas as seguintes condições: concentração de proteína 2 g/100 mL (proteína/água), proporção enzima/substrato: de 30 U/g, levando em consideração a atividade enzimática da Alcalase de 7,9 U/mg, a pH 7 e a 50 ºC. O grau de hidrólise foi determinado pelo método de *pH-stat* utilizando as Equações 1, 2 e 3. Em intervalos de 5 min foi verificado o conteúdo de base consumida (ADLER-NISSEN, 1986).

$$GH = \frac{VxNb}{\alpha xhtotxMp} x100 \qquad (1)$$

Onde, V corresponde ao volume NaOH consumido durante a hidrólise para manter o pH constante (mL); Nb é a normalidade corrigida da base; htot é o número de ligações peptídicas (moles equiv/kg) para chia este valor é 8,0 moles equiv/kg (ADLER-NISSEN, 1986); Mp é a massa de proteína (g, determinado em N x fator de Kjeldahl – 6,25); e α é o grau de dissociação, o qual foi determinado segundo a Equação 2 de Adler-Nissen (1986):

$$\alpha = \frac{10^{pH-pKa}}{1+10^{pH-pKa}} \qquad (2)$$

Onde, pH é o pH ótimo de cada enzima utilizada para a hidrólise; pKa é a constante de dissociação, a qual foi determinada de acordo com a temperatura utilizada para a hidrólise enzimática segundo a Equação 3, de acordo com Steinhart e Beychok (1964 citado por KRISTINSSON; RASCO, 2000).

$$pKa = 7{,}8 + \frac{298-T}{298xT} x2400 \qquad (3)$$

T a temperatura em K.

Foi realizada a inativação térmica do hidrolisado de chia a 85 ºC por 15 min. O hidrolisado obtido foi liofilizado em liofilizador (Liotop, L108, Brasil) e a acondicionado a 4°C, até o momento do uso.

4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HIDROLISADO DE CHIA

4.3.1. Teste de disco difusão

A atividade antimicrobiana foi realizada pelo teste de disco difusão, segundo o método descrito por Gómez-Guillén et al. (2010). As placas de Petri contendo ágar infusão de coração e cérebro-BHI foram inoculadas com o *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) ou *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43895). Após 24 h as culturas foram padronizadas com a densidade de células de 1 x 10^8 UFC/mL comparando com o padrão de (McFarland 0,50). Então, discos estéreis de papel filtro (5 mm de diâmetro) com 40µL da amostra de hidrolisado de chia, em diferentes concentrações (2,5; 5; 25; 50 e 100 mg/mL), foram dispostos assepticamente nas placas contendo o ágar BHI solidificado. As placas de ágar foram incubadas a 37 °C durante 24 h. O halo de inibição foi avaliado através da medição utilizando régua milimetrada. Os resultados foram expressos em mm de halo de inibição subtraído do diâmetro do disco. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3.2. Porcentual de inibição

O porcentual de inibição foi avaliada de acordo com o protocolo proposto pelo Manual do *National Committe for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS, 2005) com modificações. Utilizou-se as 2 cepas de micro-organismos *S. aureus* (ATCC 10832) e *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895). Para isto foram utilizadas microplacas de 96 poços, onde a cada poço foi adicionado 180 µL de caldo BHI, 20 µL de inóculo (água salina e micro-organismo 1 x 10^8 UFC/mL), 40 µL da amostra hidrolisado de chia, em diferentes concentrações (2,5; 5; 25; 50 e 100 mg/mL), 20 µL de água salina (branco sem micro-organismo), 100 µL de água destilada (branco sem amostra). Após o preparo da amostra, o percentual de inibição foi mensurado em espectrofômetro (Biochrom EZ Read 400, Brasil) a 620 nm. Em seguida foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Então, fez-se a leitura após 24 h de incubação em

espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de inibição.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO E DOS PÃES DE TRIGO E ARROZ ENRIQUECIDOS COM HIDROLISADOS DE CHIA

4.4.1. Preparo da amostra de hidrolisado

O hidrolisado foi preparado em 3 concentrações distintas definido por testes preliminares, para de 0,5, 1 e 2 mg de hidrolisado de chia/mL de tampão correspondente para cada tipo de método realizado de atividade antioxidante, após homogeneizou-se a amostra em agitador Vórtex (Ionlab,Warmnest, Brasil) por 30 segundos e logo em seguida realizou-se a atividade antioxidante.

4.4.2. Preparo das amostras de pães

As amostras de pães foram preparadas em 3 concentrações distintas de 25, 50 e 75 mg de pão de trigo e de arroz moídos/ mL de tampão (correspondente para cada tipo de método realizado de atividade antioxidante). Em seguida centrifugou-se a 14,308 x *g* em centrífuga (Biosystems, MPW 350/350 R, Brasil), por 10 minutos. Então o sobrenadante de cada amostra foi filtrado em papel Whatman nº 1 segundo o método descrito por Franco-Miranda et al. (2017) com modificações. O filtrado foi utilizado para a determinação da atividade antioxidante.

4.4.3. Capacidade do sequestro do radical DPPH·

A capacidade de sequestrar o radical DPPH foi determinada no hidrolisado e nos pães padrão de trigo e arroz adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado de chia/g de farinha segundo o método descrito por Nicklisch; Herbert Waite (2014) com modificações, em microplaca de 96 poços. Adicionou-se 0,3% (v/v) de Triton X-100 ao tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 7,0) e preparou-se o DPPH em metanol. Foi preparada uma solução de (2,0 mM).

Logo em seguida, alíquotas de 190 µL de amostra, 10 µL de DPPH e 10µL de metanol foram adicionados em uma microplaca de 96 poços.

O percentual (%) de eliminação do radical DPPH de cada amostra foi determinada utilizando a Equação 4, onde: %ES é a porcentagem de efeito sequestrante; ABS_{branco} a absorbância do branco e $ABS_{amostra}$ é a absorbância da amostra.

$$\%ES = \frac{(ABS_{branco} - ABS_{amostra})x100}{ABS_{branco}} \quad (4)$$

4.4.4. Poder redutor

A determinação da capacidade de redução do hidrolisado de chia e dos pães de trigo e de arroz padrão e adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado de chia/ g de farinha foi realizado pelo método descrito por Yen e Chen (1995) com adaptações, em microplacas de 96 poços. Amostra foi homogeneizada com tampão fosfato de sódio (200 mM) pH 6,6 logo em seguida alíquotas de 70 µL das amostras foram adicionados em 35 µL de ferricianeto de potássio (1%; p/v) e incubadas durante 20 min a 50 °C. Em seguida, adicionaram-se 135 µL de água Milli-Q, 33 µL de ácido tricloroacético (TCA- 10%; p/v) e 27 µL de cloreto férrico - $FeCl_3$, (0,1%; p/v). Então, foram incubados durante 10 min a temperatura ambiente e as absorbâncias mensuradas a 700 nm em leitor de microplacas.

4.4.5. Captura do radical $ABTS^{\cdot+}$ [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]

O ensaio de ABTS foi realizado no hidrolisado de chia e nos pães de trigo e de arroz padrão e adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado de chia/ g de farinha segundo método descrito por Re et al. (1999) com modificações de Zheng et al. (2016). Primeiramente, foi preparada uma solução de ABTS (7 mM), desta solução retirou-se 5 mL e homogeneizou-se com 88 µL persulfato de potássio (2,45 mM). A solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente durante 12-16 h no escuro para produzir radical $ABTS^+$. A solução do radical $ABTS^+$ foi então diluída com tampão fosfato salino (50 mM) (PBS; pH 7,4) para se obter uma absorbância de 0,70 ± 0,02 a 734 nm. Após adicionou-se 150 µL de $ABTS^+$ e 50 µL de amostra em cada poço da microplaca de 96 poços. A absorbância foi mensurada após 6 min de reação a 30 °C. 50 µL de PBS pH 7,4 foi utilizado como o branco.

4.5. ELABORAÇÃO DOS PÃES

Foram elaborados pães padrão, sem adição de hidrolisado proteico de chia e pães com conforme Segura-Campos et al. (2013) a adição de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/ g de farinha de trigo, conforme a Tabela 1 e 2.

Tabela 1. Formulações dos pães de farinha de trigo.

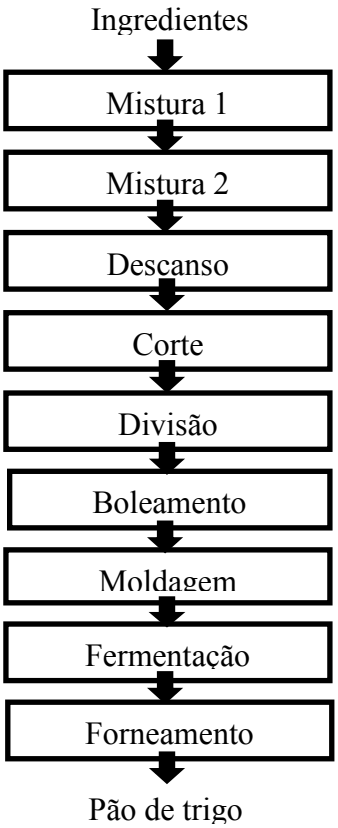
Ingredientes	**Formulação padrão**	**Formulação 1**	**Formulação 3**	**Formulação 5**
		Quantidade		
Farinha de trigo (g)	100	100	100	100
Sal (g)	2	2	2	2
Açúcar (g)	5	5	5	5
Fermento biológico (g)	2	2	2	2
Gordura vegetal hidrogenada (g)	3	3	3	3
Ácido ascórbico (g)	0,009	0,009	0,009	0,009
Água (mL)	60	60	60	60
Hidrolisado proteico de chia (g)	-----	0,1	0,3	0,5

F1= formulação composta de 1mg de hidrolisado de chia/g de farinha; F3 = formulação composta de 3mg de hidrolisado de chia/g de farinha; F5 = formulação composta de 5mg de hidrolisado de chia/g de farinha.

Na mistura 1 foram adicionados os ingredientes secos foram adicionados em batedeira planetária (Kitchenaid, Brasil) durante 1 min em velocidade média, a seguir na mistura 2 foi adicionada a água, gordura vegetal, fermento e o hidrolisado de chia, solubilizado em água destilada. Então, homogeneizou-se durante 9 min sendo mantida a mesma velocidade até o desenvolvimento do glúten. A massa ficou em repouso por 10 min. Em seguida a massa foi dividida em porções de 165 g, sendo estes posteriormente boleados e moldados com rolo de madeira até formar as bisnagas, que foram levadas a fermentação a 30 °C durante 90 min com U.R de 80%. A seguir foram forneados a 200 °C durante 20 min em forno elétrico (Fischer, Diplomata, Brasil). Os pães foram retirados do forno e arrefecidos a temperatura ambiente por 1 h, sendo analisados posteriormente.

A Figura 2 esta apresenta o fluxograma de elaboração do pão de trigo.

Figura 2. Elaboração do pão de trigo



Na mistura 1 os ingredientes secos foram colocados em batedeira planetária (Kitchenaid, Brasil) durante 2 min a velocidade média, a seguir foram adicionados a mistura 2 o óleo de soja, a água, fermento e o hidrolisado solubilizado em água destilada e homogeneizados por 10 min sendo mantida a mesma velocidade. A massa resultante foi colocada em um recipiente e levada para estufa a 30 ºC por 60 min com U.R de 80%, para uma primeira fermentação. Posteriormente foram colocados 175 g de massa em formas metálicas, sendo levada a fermentação final por mais 55 min a 30 ºC com U.R de 80%. Então, foram assadas a 200 ºC por 20 min em forno elétrico (Fischer, Diplomata, Brasil). Os pães foram retirados do forno logo após assados e arrefecidos a temperatura ambiente por 1 h, sendo então encaminhados para análises específicas.

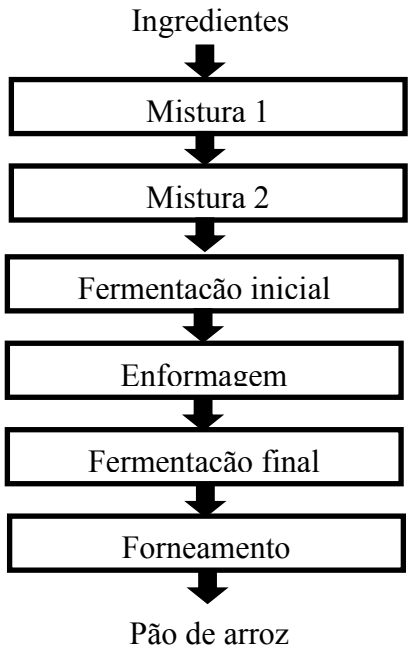
Tabela 2. Formulações dos pães de farinha de arroz.

Ingredientes	Formulação padrão	Formulação 1	Formulação 3	Formulação 5
		Quantidade		
Farinha de arroz (g)	100	100	100	100
Sal (g)	2	2	2	2
Açúcar (g)	5	5	5	5
Fermento biológico seco (g)	2	2	2	2
Óleo de soja (g)	2	2	2	2
Ácido ascórbico (g)	0,009	0,009	0,009	0,009
Água (mL)	120	120	120	120
Metilcelulose (g)	2	2	2	2
Enzima Transglutaminase (g)	0,5	0,5	0,5	0,5
Hidrolisado proteico de chia (g)	-----	0,1	0,3	0,5

F1= formulação composta de 1mg de hidrolisado de chia/g de farinha; F3 = formulação composta de 3mg de hidrolisado de chia/g de farinha; F5 = formulação composta de 5mg de hidrolisado de chia/g de farinha.

A Figura 3 apresenta o fluxograma de elaboração do pão de arroz.

Figura 3. Fluxograma da elaboração do pão de arroz.



4.6. AVALIAÇÃO TECNOLOGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS PÃES

4.6.1. Volume específico

Foi realizada a determinação de volume específico (VE), onde os pães foram pesados em balança de precisão e seu volume foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (PIZZINATTO; CAMPAGNOLLI, 1993). O volume específico foi calculado segundo a razão entre o volume e a massa do pão assado (mL/g).

4.6.2. Pontuação total

Os pães foram avaliados por análise de características internas e externas segundo planilha de El-Dash (1978) (Anexo 1). Essa atribui a pontuação aos pães com valor máximo de 100 pontos distribuídos nos parâmetros volume (VE x 3,33), cor da crosta, quebra, simetria, característica da crosta, cor do miolo, estrutura da célula do miolo, textura do miolo, aroma e sabor.

4.6.3. Firmeza do miolo do pão

Para verificar o grau de firmeza do miolo dos pães foram realizadas análises no analisador de textura TAXT2 (Stable Micosystem,TA.XT.Plus, Inglaterra), utilizando o software (Exponent da Stable Micro System). O teste foi realizado segundo método 74-09.01 da AACC (2000), que consiste em colocar uma fatia de 25 mm de espessura no centro da plataforma do analisador de textura, a qual foi comprimida com um probe cilíndrico de 36 mm de diâmetro. Para tanto, as seguintes condições de trabalho foram utilizadas: velocidade de pré-teste: 1,0 mm/s; velocidade de teste: 1,7 mm/s; velocidade de pós-teste: 10,0 mm/s; compressão: 40%; trigger force: 5g. Foram realizadas medições de 3 fatias em cada amostra .

4.6.4. Cor do miolo e da crosta dos pães

As análises de cor do miolo e da crosta foram realizadas em colorímetro (Minolta, CR-400, Japão), seguindo o sistema de cor no espaço L*, a* e b*, definido pela CIE-L*a*b*,

(CIE, 1976). Os valores de L* (luminosidade), a* e b* (coordenadas de cromaticidade) foram avaliados. Realizou-se 6 medidas para cor do miolo e cor da crosta de cada amostra.

4.7. AVALIAÇÃO SENSORIAL

A avaliação sensorial foi aprovada pelo comitê de ética (Anexo 2) da Universidade Federal do Rio Grande e realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Escola de Química e Alimentos da mesma Universidade. As amostras foram apresentadas na de forma de cubos de pão, 2 cm de aresta, e codificadas com algarismos de três dígitos. Foram escolhidos os pães de trigo e de arroz adicionados de 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha por ter sido os que apresentaram os melhores resultados, sendo submetidos ao teste de comparação pareada. Um termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (Anexo 3) foi fornecido a cada julgador para o seu consentimento em participar da pesquisa mediante assinatura do julgador, pesquisador e orientador. A análise foi realizada com 60 julgadores, consumidores de pão dos sexos masculino e feminino. Foi elaborada uma ficha de avaliação (Apêndice 3 e 4) onde cada julgador deveria escolher o pão da sua preferência comparando o pão padrão com o pão adicionado de 3 mg de hidrolisado/g de farinha. Foram realizadas duas avaliações, uma para o pão de trigo e outra para o pão de arroz.

A interpretação dos resultados baseou-se no número de julgamentos totais versus o número de julgamentos positivos, mediante a aplicação direta da Tabela de Roessler (ROESSLER et. al., 1956 (Anexo 4) que indica o número mínimo de observações corretas, com as quais é possível concluir se existe diferença ao nível de 5% de significância (QUEIROZ; TREPTOW, 2006).

4.8. TRATAMENTO DE DADOS

Todas as análises, exceto a análise sensorial, foram realizadas em triplicata. Os resultados das análises foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA), e comparados através do teste de Tukey ($p < 0,05$), empregando o programa *Statistica 5.0* (Statsoft, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA FARINHA DE CHIA DESENGORDURADA, DA FRAÇÃO RICA EM PROTEÍNAS E DO CONCENTRADO PROTEICO.

A Tabela 3 apresenta a composição proximal da farinha de chia desengordurada, da fração rica em proteínas e do concentrado proteico liofilizado.

Tabela 3. Composição proximal (bu) da farinha de chia desengordurada, fração rica em proteínas e concentrado proteico.

Componentes	Farinha de chia desengordurada	Fração rica em proteínas	Concentrado proteico
Umidade (%)	$9{,}08^{a} \pm 0{,}18$	$8{,}97^{a} \pm 0{,}04$	$2{,}05^{b} \pm 0{,}39$
Cinzas (%)	$6{,}29^{a} \pm 0{,}02$	$7{,}31^{a} \pm 0{,}04$	$1{,}26^{b} \pm 0{,}09$
Lipídeos (%)	$1{,}55^{b} \pm 0{,}11$	$2{,}02^{a} \pm 0{,}15$	$0{,}46^{c} \pm 0{,}01$
Proteínas (%)	$32{,}52^{c} \pm 0{,}54$	$46{,}84^{b} \pm 2{,}70$	$79{,}56^{a} \pm 4{,}25$
Carboidratos (%)	50,46	34,86	16,66

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ($p < 0{,}05$).

bu: base úmida

Segundo Ramos, (2013) a farinha de chia desengordurada é maioritariamente obtida na sequência do processo de extração do óleo de chia, sendo por isso considerada um subproduto. As características das sementes de chia dependem muito do local de produção e condições climáticas da produção da planta (AYERZA; COATES, 2004). A produção de concentrados proteicos é uma alternativa para o processamento deste subproduto (ALUKO, 2004).

Observou-se que na medida em que se realizaram as etapas de obtenção da fração rica em proteínas e do concentrado proteico, aumentou significativamente o teor de proteínas ($p < 0{,}05$). Além disso, o conteúdo de lipídeos e cinzas diminuiu significativamente ($p < 0{,}05$) no concentrado proteico. A etapa da fração rica tem como vantagem ser um processo de fracionamento a seco, não usando água ou outros solventes, não gerando efluentes ou resíduos. A fração retida (superior) é composta, principalmente, de fibras e a fração passante (inferior) principalmente de proteínas (OTTO; BAIK; CZUCHAJOWSKA, 1997). O processo de obtenção do concentrado proteico inicia-se pela etapa de solubilização alcalina, onde a

maior parte dos lipídios e das proteínas insolúveis é separada durante a primeira centrifugação. A precipitação da proteína em pH ácido, ocasionou um aumento no teor de proteínas de cerca de 100% em relação a farinha de chia desengordurada. Este fato que não ocorreu para a farinha de chia desengordurada e a fração rica em proteínas, que é obtida por peneiramento onde a fração superior consiste principalmente de fibras e a inferior de proteínas (BATISTA; PIRES; NELHAS, 2007; IJAROTIMI et al., 2018).

Segura-Campos et al. (2013) trabalhou com farinha de chia desengordurada e a fração rica em proteína, sendo que a primeira apresentou 34,01% proteínas, 13,44% lipídeos, 6,17% de umidade e 5,85% cinzas, e a segunda 44,02% proteínas, 8,84% cinzas, 7,67% umidade e 0,54% lipídeos. No presente estudo, a matéria prima foi obtida de uma indústria onde foi utilizado um método de prensagem a frio para a retirada do óleo. Nesse, a semente de chia passa pelo moinho de martelo ocorrendo à extração de grande parte do óleo, e posteriormente transformada em uma farinha fina de granulometria 14-16 mesh. No entanto, o processo utilizado para desengordurar as sementes de chia por Segura-Campos et al., (2013) consistiu em triturar a semente, obtendo uma farinha de onde foi extraído o óleo por extração com solvente. Devido a isto, os valores expressos para a composição da farinha de chia desengordurada e a fração rica em proteínas apresentam variações com relação ao nosso trabalho.

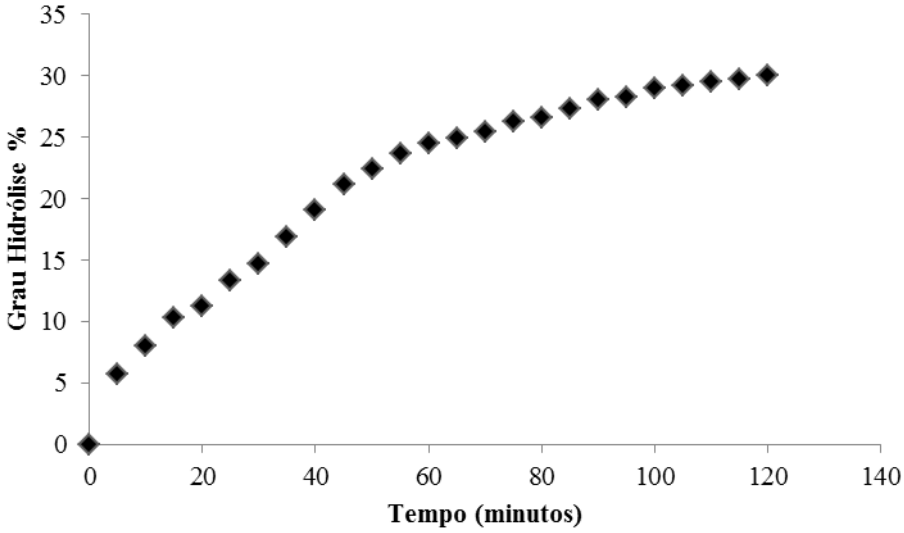
Vázquez-Ovando et al (2010) estudaram farinha de chia desengordurada de diferentes origens com teores proteicos de 28,14 e 44,62%. Estes valores são diferentes ao obtido neste estudo, o qual foi de 46,84% para a fração rica em proteínas. Isso pode ter ocorrido devido ao teor de proteína variar de acordo com a região geográfica, o cultivar e a genética da planta de chia (RUPFLIN, 2011).

5.2. HIDRÓLISE DO CONCENTRADO PROTEICO

A Figura 4 apresenta a cinética de obtenção do hidrolisado a partir do concentrado proteico de chia.

A taxa de aumento de grau de hidrólise (GH) é maior no período inicial da reação, isto ocorre porque as cadeias polipeptídicas fracamente ligadas são clivadas, diminuindo com o tempo (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009). De acordo com Guerard, Guimas e And Binet (2002), a redução na taxa de reação, ocorre devido à limitação da atividade enzimática e à diminuição da concentração de substrato disponível.

Figura 4. Grau de hidrólise com relação ao tempo de obtenção do hidrolisado enzimático proteico de chia utilizando a enzima Alcalase.



Neste estudo obteve-se um grau de hidrólise de 30% em 120 min de reação, diferente do estudo realizado por Segura-Campos et al. (2013), que promoveram a hidrólise sequencial da fração rica da proteína de chia com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. Onde Alcalase foi utilizada na pré-hidrólise por 60 min obtendo 23% de GH, em seguida foi adicionada a enzima Flavourzyme chegando a um GH de 43,8% em 150 min de reação. A diferença observada no GH dos hidrolisados pode ocorrer devido ao tempo de reação enzimática, que afeta o número de ligações peptídicas rompidas e também das distintas atividades catalíticas das duas enzimas utilizadas pelos autores.

Uraipong e Zhao (2015) promoveram a hidrólise de frações proteicas de farelo de arroz no tempo de 240 min, onde a Alcalase resultou no hidrolisado de maior grau de hidrólise quando comparada com a Flavourzyme, ambas com valores abaixo de 15%. Isto pode ter ocorrido em função da enzima Alcalase ser uma endoprotease, que atua no interior da cadeia proteica e a Flavourzyme ser uma mistura de endo e exoproteases, atuando nos grupamentos aminos (aminopeptidase) e carboxílicos (carboxipeptidases), liberando no meio aminoácidos ou dipeptídeos. Piotrowicz e Mellado (2015) também encontraram valores de GH menores para a enzima Flavourzyme comparado com a Alcalase após 6 horas de hidrólise do músculo de pescado.

5.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HIDROLISADO DE CHIA

A Tabela 4 apresenta a atividade antimicrobiana testada pelo método de disco de difusão do hidrolisado do proteico de chia em diferentes concentrações, frente aos micro-organismos *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana frente *S. aureus* e *E. coli* do hidrolisado proteico de chia.

Concentração de hidrolisado proteico (mg/mL)	**Halo de inibição (mm)**	
	S. aureus	***E. coli***
100	2,42 ± 0,34[b]	4,60 ±0,01[a]
50	N.I	N.I
25	N.I	N.I
5	N.I	N.I
2,5	N.I	N.I

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$). N.I = não inibiu.

Os dois micro-organismos foram inibidos pela maior concentração de hidrolisado de chia testada (100 mg/mL), sendo que a amostra de hidrolisado apresentou uma inibição significativamente maior ($p < 0,05$) frente à *E.coli*, uma bactéria Gram-negativa, do que contra *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva. Este resultado é importante, visto que o *E.coli* possui uma membrana externa mais difícil de ser penetrada. Essa membrana externa dos micro-organismos Gram-negativos tem a característica de ser composta por lipopolissacarídeos, fosfolipídios, lipoproteínas e proteínas que sustentam toda a célula bacteriana (SEDAGHATI et al., 2016).

Diferente deste estudo, Segura-Campos et al (2013) realizou testes de atividade antimicrobiana com hidrolisado de chia frente a 7 micro-organismos usando o método de disco de difusão, onde não inibiu a multiplicação das bactérias Gram-negativas (*E. coli, S. typhi, S. Flexneri*) e Gram-positivas (*K. pneumonia, S. aureus, B. subtilis, S. agalactae*) mesmo na menor concentração de micro-organismo ($1x10^3$ UFC/mL). Isto pode ter ocorrido, devido ao GH (43,8%) elevado encontrado pelos autores, o que sugere que o hidrolisado obtido por esses autores possuía peptídeos de baixa massa molecular, que restringe seu potencial de atividade antimicrobiana (PANYAM; KILARA, 1996; RIVERA; RAMOS;

DESGARENNES, 2007). Jang et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do hidrolisado de proteína sarcoplasmática bovina, frente a 6 patógenos: *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*. Eles mostraram um forte efeito de inibição contra os micro-organismos Gram-negativos seguido dos Gram-positivos respectivamente, semelhante ao encontrado neste estudo.

A Tabela 5 apresenta os resultados da mínima concentração inibitória do hidrolisado proteico de chia, necessária para a inibição dos micro-organimsos *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 5. Percentual de inibição microbiana do hidrolisado de chia

Concentração (mg/mL)	***S. aureus* (%)**	***E. coli* (%)**
2,5	$2,84^{eA} \pm 0,85$	$1,32^{dB} \pm 0,48$
5	$16,98^{dA} \pm 1,48$	$9,68^{dB} \pm 1,03$
25	$54,46^{cA} \pm 1,94$	$43,07^{cB} \pm 2,76$
50	$76,58^{aA} \pm 2,22$	$70,42^{aA} \pm 4,15$
100	$63,02^{bB} \pm 1,41$	$71,68^{aA} \pm 1,68$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$).

A menor concentração de hidrolisado de chia testada apresentou inibição, mas foi menor quando comparados com as demais concentrações de hidrolisado testados. O hidrolisado de chia na concentração de 50 mg/mL apresentou a maior inibição contra o *S. aureus*, quando comparado com as outras concentrações estudadas ($p < 0,05$). Contudo, a bactéria *E.coli* foi inibida pela maior concentração de amostra testada. Quando comparou-se os dois micro-organismos entre as diferentes concentrações de amostra de hidrolisado, as menores concentrações apresentaram maior inibição contra o *S. aureus*, em relação a *E.Coli* ($p > 0,05$). Entretanto, para a *E.coli* entre as concentrações de 50 e 100 mg/mL de amostra de hidrolisado de chia não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na MIC. Além disso, a concentração de 100 mg/mL de amostra apresentou a maior inibição ($p > 0,05$) para *E.coli*. Isso pode ter ocorrido pela diferença da composição da parede celular, uma vez que o *S.*

aureus Gram-positiva e a *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, dificultando assim a ação do hidrolisado.

Segundo Murray, Rosenthal e Pfaller (2009) as bactérias Gram-negativas contém uma membrana exterior que rodeia a camada de peptideoglicano, e nas Gram-positivas a membrana celular é rodeada por uma camada espessa de peptideoglicano, devido a isso a interação do peptídeo com a parede celular pode ter dificultado sua ação inibitória. Sendo que é largamente aceito que os peptídeos antimicrobianos interagem com as membranas das bactérias (SU et al., 2012).

5.4. CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DOS PÃES DE TRIGO E DE ARROZ ADICIONADOS DE HIDROLISADO PROTEICO DE CHIA.

5.4.1. Volume específico, dureza e pontuação total dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado de chia

A Tabela 6 apresenta os valores de volume específico, dureza e pontuação dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado de chia.

Tabela 6. Características tecnológicas dos pães de trigo padrão e com adição de hidrolisado proteico de chia.

Pão	VE (mL/g)	Firmeza do miolo (N)	Pontuação
TP	$4,31^{ab} \pm 0,04$	$2,44^{b} \pm 0,09$	$93,78^{a} \pm 0,74$
T1	$4,35^{ab} \pm 0,04$	$2,69^{b} \pm 0,06$	$88,47^{b} \pm 0,24$
T3	$4,63^{a} \pm 0,29$	$2,05^{c} \pm 0,13$	$86,98^{b} \pm 0,89$
T5	$3,96^{b} \pm 0,14$	$4,65^{a} \pm 0,23$	$80,69^{c} \pm 0,89$

TP= pão de trigo padrão, T1, T3 e T5= pães de trigo acionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.VE: volume específico. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

O aumento de adição de hidrolisado de chia aos pães de trigo reduziu o VE, aumentou a dureza do miolo e diminuiu a pontuação global. Isto pode ter ocorrido devido à inclusão da proteína de chia, que sendo diferente as proteínas de trigo, interfere na formação do glúten que é o responsável da estrutura final do pão. O hidrolisado pode ter influenciado na

formação de um número maior de alvéolos menores e mais compactos no miolo do pão, reduzindo o volume específico (FRANCO-MIRANDA et al., 2017).

Fernandes e Salas-Mellado (2017), com o objetivo de adicionar mucilagem de chia para a redução do teor de gordura em pães e bolos, verificaram que o volume específico dos pães substituídos de 25%, 50% e 75% da gordura pela adição de mucilagem de chia, não diferiram estatisticamente do pão controle. Para os pães com total substituição da gordura, os valores encontrados foram menores. Entretanto houve apenas uma redução de cerca de 8% do volume específico do pão com adição de 100% de mucilagem seca a 50 ºC em relação ao pão controle, e de 16% para o pão com adição de 100% de mucilagem liofilizada, indicando que a adição de mucilagem não prejudicou esta característica tecnológica dos pães. A ligeira diminuição no volume específico pode ser devido à interrupção da rede de proteínas influenciada pela adição de mucilagem (PAREYT et al., 2011).

No entanto, Coelho e Salas-Mellado (2015) com objetivo de avaliar adição de semente de chia seca e hidratada e farinha de chia seca e hidratada em pães de trigo, obtiveram valores maiores de volume específico quando adicionada 2% semente de chia. Nos pães adicionados de 20% semente de chia, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à semente e farinha hidratada e seca, comprovando que a chia afeta o desenvolvimento e crescimento da massa, ou seja, quanto maior o teor de chia na formulação em substituição à farinha de trigo, menor é o valor do volume específico. Isto pode ter ocorrido, pois a chia, tem uma maior capacidade de absorção de água e apresenta um maior rendimento da massa quando adicionada em pães.

Uma característica importante na formulação estudada é a dureza, sendo esta, um dos parâmetros tecnológicos mais importantes e que está relacionada com a força aplicada para ocasionar uma deformação ou rompimento da amostra, avaliada por texturômetros mecânicos (ESTELLER; AMARAL; LANNES, 2004). Observa-se na Tabela 6, que a adição da maior quantidade de hidrolisado, resultou em maior dureza em relação ao pão padrão e aos pães adicionados de 1 e 3 mg de hidrolisado proteico de chia/g de farinha. Este comportamento era esperado, visto que na maior concentração de hidrolisado testada foi verificado o menor volume específico, onde estas grandezas agem de maneira inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o volume específico menor e a dureza. A maior quantidade de hidrolisado resulta na maior mudança na formação da rede de glúten devido ao tipo e natureza das proteínas presentes (FRANCO-MIRANDA et al., 2017).

Como relatado por Moore et al. (2006) e Mezaize et al. (2009), há uma correlação negativa entre volume específico (VE) e a dureza dos pães, justificada pela maior

compactação das células de gás existentes nos pães de menor VE, resultando em maior dureza do miolo pelo aumento da resistência à deformação desses pães.

Resultados similares foram verificados por Franco-Miranda et al. (2017) onde estudaram a adição de hidrolisado de feijão lima e feijão caupi em pão doce tipo mexicano nas concentrações de 1 e 3%, sendo constatado que a maior inclusão de hidrolisado provocou maior dureza nos produtos. De Oliveira et al. (2017) elaboraram pão enriquecido com farinha de barata *cinérea* (*Nauphoeta cinerea*) nas concentrações de 5, 10 e 15% e verificaram também que a medida que aumentou a quantidade de farinha de barata em relação a farinha de trigo na formulação, aumentou a dureza dos pães.

A qualidade do pão pode ser determinada pela avaliação das características externas, onde se inclui o volume específico, a cor da crosta, a quebra e a simetria; e pelas características internas como cor do miolo, estrutura da célula do miolo e textura do miolo, além de aroma e sabor (LOPES et al., 2007). De acordo com Ferreira, Oliveira e Pretto (2001) o pão para ser considerado aceito deve apresentar aparência de massa cozida com simetria, cor, aroma e sabor característicos, além de duas crostas, um exterior, que ao ser manipulada pode soltar-se e, a outra, mais consistente, bastante aderida ao miolo. A cor da parte externa superior deve ser dourada/amarelada, natural, uniforme e da parte inferior deve possuir a cor marrom. Casca sem brilho ou opaca pode ocorrer devido a falta de vapor no forno, formação de casca no pão cru ou falta de açúcares residuais na formulação.

As pontuações totais dos pães deste estudo variaram de 80,69 a 93,78, sendo que o pão com adição de 5 mg de hidrolisado/g de farinha apresentou a menor pontuação, enquanto a maior pontuação foi obtida pelo pão padrão. Menezes et al. (2014) estudaram a adição de colágeno hidrolisado na qualidade da farinha de trigo para a produção de pão tipo forma, onde verificaram que os pães sem a adição de colágeno hidrolisado obtiveram a maior pontuação total, com 73,69 pontos, de 100 possíveis. A adição em níveis de 4,0% de colágeno hidrolisado proporcionou prejuízo às características do produto, que obteve a menor pontuação de 64,51 pontos.

Filho et al. (1997) avaliaram a incorporação de farelo em farinhas de trigo e realizaram planilha de El-Dash (1978) para a avaliação dos produtos, a pontuação obtida variou de 92,10 para o pão padrão a 63,80 pontos para pães com adição de 20% de farelo de trigo. Sendo assim a adição de ingredientes não-convencionais em pães promove uma queda na pontuação da avaliação global dos produtos.

5.4.2. Volume específico, dureza e pontuação total dos pães de arroz padrão e adicionados de hidrolisado de chia.

Os resultados de volume específico, dureza e pontuação dos pães de arroz adicionados de hidrolisado de chia encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Características tecnológicas dos pães de arroz padrão e com adição de hidrolisado de chia.

Pão	VE (mL/g)	Firmeza do miolo (N)	Pontuação
AP	$3,38^{ab} \pm 0,16$	$1,32^{a} \pm 0,18$	$88,75^{a} \pm 0,52$
A1	$3,32^{b} \pm 0,13$	$1,56^{a} \pm 0,37$	$83,05^{b} \pm 0,44$
A3	$3,63^{a} \pm 0,10$	$1,25^{a} \pm 0,07$	$84,61^{b} \pm 0,34$
A5	$3,43^{ab} \pm 0,05$	$1,36^{a} \pm 0,14$	$80,57^{c} \pm 0,46$

AP= pão de arroz padrão, A1, A3 e A5= pães de arroz adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.VE: volume específico. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Foi possível observar que o pão com adição de 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha apresentou maior volume específico, em relação ao pão adicionado de 1 mg de hidrolisado/g de farinha ($p > 0,05$). Em relação à dureza não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães adicionados de hidrolisado e o pão padrão. No entanto, na pontuação à medida que aumentou a concentração de hidrolisado adicionado, houve um decréscimo na pontuação dos pães em relação ao pão padrão.

Segundo Nunes et al. (2009), o volume do pão é uma medida de qualidade realizada com o intuito de apurar a capacidade da farinha em reter no interior da massa o gás produzido na fermentação, consequentemente ocasionar o crescimento dos pães. De acordo com os mesmos autores, além da capacidade de retenção de gases, o volume específico depende também da elasticidade da massa, o que é de suma importância para permitir a expansão durante as etapas de fermentação e forneamento.

Figueira et al. (2011), Selmo (2014) e Graça et al (2016) realizaram estudos em que se utilizou a mesma formulação de pão do presente estudo. Figueira et al. (2011), com o objetivo de aumentar o conteúdo proteico dos pães elaborados com farinha de arroz, observaram que a adição de *Spirulina platensis* até 4% à farinha de arroz, não causou diferença significativa no volume dos pães elaborados. No entanto, Selmo (2014), com o objetivo de avaliar o efeito da adição da metilcelulose, da enzima transglutaminase e da

Spirulina na qualidade tecnológica e nutricional de pães de farinha de arroz, observou que o aumento da adição de *Spirulina* afetou positivamente o volume específico dos pães. Entretanto, no estudo realizado por Graça et al. (2016) com o objetivo de verificar o efeito da adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz nas características tecnológicas, observaram que o pão padrão apresentou o maior volume específico em relação aos pães adicionados de colágeno. Isto pode ter ocorrido pelo fato do volume específico depender de alguns fatores, como os extrínsecos e da qualidade da matéria-prima.

Conforme relatado por Sciarini et al. (2010) e Capriles e Arêas (2011) os hidrocolóides aumentam a viscosidade da massa, melhorando a capacidade de retenção de gás durante a mistura e impermeabilização, gerando pães com maior volume e miolos com melhores características estruturais e de textura, o que comprova o efeito benéfico da metilcelulose na formulação dos pães deste estudo.

Em relação a dureza, o pão padrão e os pães com diferentes concentrações de hidrolisado do presente estudo, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Este resultado é favorável, visto que adição de hidrolisado afetou de maneira positiva a dureza. Ingredientes proteicos podem ser usados para melhorar a aparência, sabor e as características de textura do miolo, de pães sem glúten como o hidrolisado proteico de chia utilizado no presente estudo. Alguns estudos adicionaram farinha de soja, isolado proteico de soja, leite, e isolado proteico do leite e obtiveram melhores características tecnológicas e também contribuíram para aumentar o valor nutricional dos produtos (RANHOTRA, LOEWE e PUYAT, 1975; SÁNCHEZ, OSELLA e DE LA TORRE, 2002, 2004; GALLAGHER et al., 2003; RIBOTTA et al., 2004). Além disso, a incorporação de ingredientes proteicos pode ser melhorada com adição da transglutaminase, enzima que catalisa reações entre proteínas, podendo formar redes proteicas, o que contribui para a estrutura de pães sem glúten (CAPRILES; ARÊAS, 2011). A combinação do hidrocolóide metilcelulose, enzima transglutaminase e hidrolisado proteico de chia contribuíram para obter pães elaborados com farinha de arroz mais macios. No estudo de Marco e Rosell (2008) observaram aumento de volume e redução da dureza do miolo de formulações à base de farinha de arroz, após a inclusão de isolado proteico de soja, hidroxipropilmetil-celulose e transglutaminase.

No entanto, neste estudo a pontuação a medida que aumentou a concentração de hidrolisado proteico de chia diminuiu. Vallejos (2013) na avaliação da vida útil de pão sem glúten e efeito de aditivos, ao avaliar as propriedades tecnológicas de pães sem glúten em função das concentrações de óleo vegetal e polisorbato 80, verificou que os valores de

pontuação total registrados ficaram entre 73,92 e 86,64, sendo a maior pontuação encontrada (86,64) atribuída ao pão que continha 2% de óleo vegetal e 0,1 de polisorbato 80.

Kringel (2015) verificou no estudo realizado sobre efeito da fosfatação da farinha de arroz na qualidade do pão armazenado sob congelamento, uma pontuação de 84,42 para pão de farinha de arroz nativa e de 86,45 para o pão de farinha de arroz fosfatada. Estes valores são diferentes do encontrado no presente estudo onde a menor pontuação foi obtida para o pão de arroz adicionado de 5 mg de hidrolisado de chia/g de farinha (80,57) e a maior pontuação foi para o pão de arroz padrão (88,75).

De acordo com El- Dash (1994) e Tedrus et al., (2001) pães que utilizam farinha de arroz em sua formulação tendem a apresentar miolo compacto com alvéolos bem pequenos, característico de massas que não apresentaram gás no momento do cozimento da massa e textura que passa de suave, macia e elástica à grossa, diferente do encontrado para os pães de arroz elaborados com a farinha de arroz e adicionados de hidrolisado proteico de chia deste estudo, que embora apresentassem miolos com alvéolos pequenos, apresentaram textura extremamente macia.

5.4.3. Cor da crosta e do miolo dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado de chia

A Tabela 8 apresenta os parâmetros de cor da crosta e do miolo dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado proteico de chia.

Tabela 8. Parâmetros de cor da crosta e do miolo dos pães de trigo padrão e adicionados de hidrolisado

	Cor da crosta			**Cor do miolo**		
	L*	**a***	**b***	**L***	**a***	**b***
TP	$50,34^{b}\pm4,17$	$14,37^{b}\pm1,72$	$31,47^{a}\pm2,07$	$64,87^{a}\pm3,02$	$-0,74^{a}\pm0,03$	$15,14^{a}\pm1,22$
T1	$34,88^{d}\pm0,76$	$14,85^{b}\pm0,13$	$19,10^{c}\pm1,14$	$64,96^{a}\pm1,38$	$-0,65^{b}\pm0,10$	$15,57^{a}\pm0,11$
T3	$61,05^{a}\pm2,46$	$13,39^{b}\pm1,51$	$33,84^{a}\pm0,38$	$64,29^{a}\pm0,97$	$-0,52^{c}\pm0,07$	$15,60^{a}\pm0,11$
T5	$46,58^{c}\pm0,94$	$17,65^{a}\pm1,22$	$29,63^{b}\pm0,77$	$64,19^{a}\pm2,43$	$-0,79^{a}\pm0,09$	$15,37^{a}\pm0,28$

TP= pão de trigo padrão, T1, T3 e T5 pães de trigo adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.

L* = luminosidade; a* e b* = cromas.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Para produtos cozidos, a cor da crosta é diretamente influenciada pela reação de Maillard e pela caramelização, as principais alterações químicas causadas durante o cozimento. A cor da crosta é influenciada pela farinha de trigo, quanto menor o tamanho de partícula, mais brilhante a cor (POPOV-RALJIC' et al., 2009). Observa-se na Tabela 8 que o pão de trigo com 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha obteve a crosta com mais brilho, sendo que o pão com adição de 1mg de hidrolisado apresentou menos brilho em relação ao pão padrão e aos pães com adicionados de hidrolisado. Observa-se que os valores do croma a* da crosta foram positivos para todas as formulações o que indica uma coloração vermelha (dourada), que é desejável para a crosta dos pães, onde apenas o pão com adição de 5 mg de hidrolisado de chia/g de farinha diferiu dos demais. Os valores obtidos para o parâmetro b* para crosta foram positivos tendendo a uma coloração amarelo, havendo diferença significativa entre os mesmos ($p < 0.05$). Acredita-se que a adição de hidrolisado tenha influenciado na coloração devido a sua fácil solubilização.

Para a cor do miolo não houve diferença entre os pães no parâmetro L* variando de 64,19 a 64,96 assim, quanto maior seu valor, mais clara é a amostra e, portanto, menor é o escurecimento. Com relação ao croma a* os valores obtidos foram negativos tendendo levemente para o verde onde as amostras de pães diferiram significativamente entre si, e observando os valores do parâmetro b* verifica-se não que houve diferença entre o pão padrão e os adicionados de hidrolisado, tendendo a coloração amarelo, ou seja, a adição de hidrolisado não alterou a coloração levemente amarelada do miolo quando comparado com o pão padrão. Isto pode ser observado nas Figuras 5 e 6.

Figura 5. Fotografias de pães de trigo padrão a) adicionado de 1 mg de hidrolisado de chia g/ de farinha b).

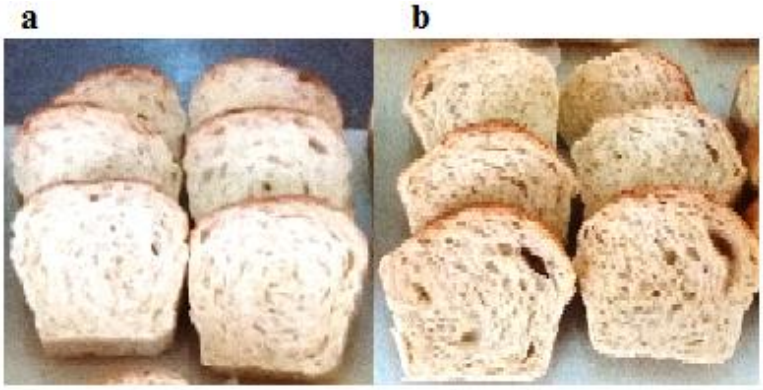
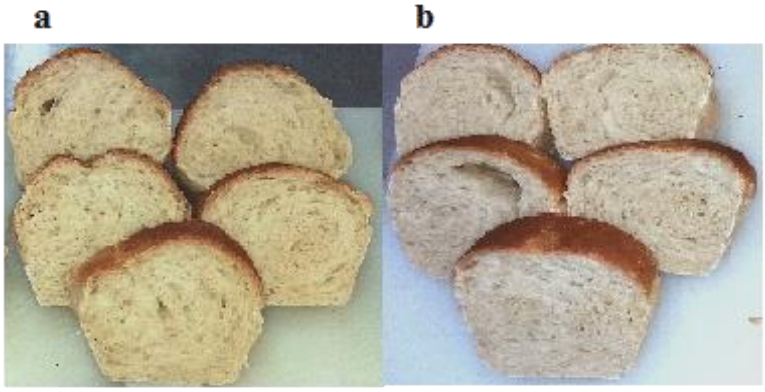


Figura 6. Fotografias de pães de trigo adicionados de 3mg a) e 5mg de hidrolisado de chia por g/ de farinha b).



Menezes et al. (2014) utilizaram colágeno hidrolisado em pães de farinha de trigo tipo forma e observaram em relação a cor do miolo, que não houve diferença significativa entre as amostras com relação a luminosidade entre a formulação padrão e as demais adicionadas de colágeno hidrolisado, para a cromaticidade a* os valores variaram de - 1,31 a - 1,37, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os valores de b* variaram de 10,28 a 10,61, não havendo diferença entre as amostras ($p > 0,05$).

5.4.4. Cor da crosta e do miolo dos pães de arroz padrão e adicionados de hidrolisado de chia

A Tabela 9 apresenta os parâmetros de cor da crosta e do miolo dos pães de arroz padrão e adicionados de hidrolisado proteico de chia.

Tabela 9. Parâmetros de cor da crosta e do miolo dos pães de arroz padrão e adicionados de hidrolisado proteico de chia.

	Cor da crosta			**Cor do miolo**		
	L*	**a***	**b***	**L***	**a***	**b***
AP	$77,50^{a}\pm2,06$	$-0,33^{a}\pm0,14$	$13,42^{a}\pm2,25$	$69,06^{a}\pm2,43$	$-1,07^{b}\pm0,15$	$6,09^{c}\pm0,56$
A1	$76,91^{a}\pm3,04$	$-0,23^{a}\pm0,47$	$15,00^{a}\pm1,54$	$70,73^{a}\pm0,16$	$-1,34^{a}\pm0,09$	$7,81^{b}\pm0,36$
A3	$73,03^{a}\pm3,80$	$-0,08^{b}\pm0,10$	$16,60^{a}\pm2,20$	$69,60^{a}\pm1,41$	$-0,87^{c}\pm0,09$	$9,76^{a}\pm0,52$
A5	$77,33^{a}\pm0,69$	$-0,40^{a}\pm0,12$	$17,10^{a}\pm2,27$	$68,01^{b}\pm0,57$	$-0,90^{c}\pm0,05$	$9,12^{a}\pm0,58$

AP= pão de arroz padrão, A1, A3 e A5= pães de arroz adicionados de1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.

L* = luminosidade; a* e b* = cromas.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Segundo Esteller e Lannes (2005), a avaliação da cor é um parâmetro crítico em produtos forneados. No Sistema CIELAB, os valores para claro e escuro são representados pelo L*, o vermelho é representado +a*, o verde por –a*, amarelo por +b* e azul por –b*, em um plano cartesiano. Valores de L* mais altos indicam maior refletância da luz traduzindo-se em pães com coloração clara, pobres em açúcares, ou presença de farinhas e amidos na crosta, e valores altos para b* são traduzidos para amostras com forte coloração amarelada ou dourada predominante em pães ricos em proteínas, açúcares redutores e ovos (carotenoides).

A cor da crosta é um dos principais atributos para a tomada de decisão do consumidor com relação à aceitação de pães. No estudo, foi possível observar que a luminosidade da crosta dos pães padrão e com adição de hidrolisado apresentaram uma coloração clara, desejável neste produto, onde não houve diferença significativa entre os pães ($p > 0,05$). A crosta dos pães de farinha de arroz padrão e adicionados de hidrolisado não obtiveram diferença significativa nos parâmetros a* e b*.

Em relação ao miolo, no parâmetro L* apenas o pão com adição de 5 mg de hidrolisado/g de farinha apresentou diferença significativa em relação ao pão padrão e aos pães adicionado de 1 e 3 mg de hidrolisado/ g de farinha. Quanto ao parâmetro a* todos os pães apresentaram leve tendência a coloração verde havendo diferença significativa entre os pães ($p < 0,05$). De acordo com a coordenada de cromaticidade b* o miolo dos pães apresentaram uma coloração amarela, mais pronunciada para o pão com adição de 3 mg de hidrolisado/g de farinha. A incorporação de hidrolisado aos pães de farinha de arroz pode ter influenciado na coloração mais amarelada em relação ao pão padrão de farinha de arroz sem adição de hidrolisado. Segundo De Oliveira et al. (2015), a hidrólise de proteínas produz peptídeos com cor acastanhada que podem gerar uma alteração de cor nos produtos alimentícios nos quais estes hidrolisados são adicionados, o que pode ser observado nas Figuras 7 e 8.

Evangelho et al., (2012) ao avaliar as características de cor de crosta e miolo dos pães elaborados com diferentes misturas de farinha de arroz extrusada encontraram para a amostra controle, que corresponde à formulação que continha o máximo de farinha de arroz branco polido (75%), um valor de luminosidade da crosta de 57,78, coordenada de cromaticidade a* de 3,76 e de coordenada de cromaticidade b* de 37,58. Para o miolo do pão os autores encontraram os seguintes valores: 69,68, -6,64 e 20,45, para L*, a* e b*, respectivamente. Com relação à crosta dos pães de arroz os valores obtidos são diferentes do presente estudo onde a luminosidade da crosta apresentou valores de 73,03 a 77,50 considerando quando mais próxima de 100, apresentando uma coloração mais clara, a croma

a* teve uma tendência a coloração verde e o parâmetro b* obteve valores de 13,42 a 17,10 tendendo a uma coloração levemente amarela. Em relação ao miolo os valores se aproximaram do encontrado pelos autores.

Graça et al. (2016) ao verificar as características de cor de crosta e miolo dos pães de farinha de arroz elaborados com adição de colágeno, onde testaram diferentes concentrações de colágeno em pó e em fibra, observaram que a luminosidade da crosta dos pães com colágeno em pó foi maior que dos pães adicionados de colágeno em fibra. Os valores encontrados para o croma a* da crosta foram positivos para as formulações padrão e dos pães adicionados de colágeno em fibra, indicando uma tendência à cor vermelha. Para as outras formulações, o valor do croma a* foi praticamente zero, aproximando-se da neutralidade. Os valores obtidos para o croma b* da crosta variaram entre 12,53 (2% de colágeno em pó) e 31,19 (2% de colágeno em fibra), tendendo ao amarelo. Observa-se que quanto à luminosidade a cor da crosta e do miolo aproximou-se das obtidas pelos autores. No entanto o parâmetro b* e a* obtiveram valores diferentes de Graça et al., (2016).

Figura 7. Fotografias de pães de arroz padrão a) adicionados de 1mg de hidrolisado de chia/ g de farinha b).

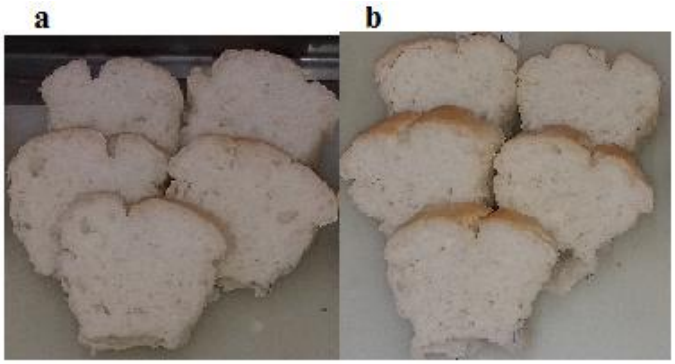
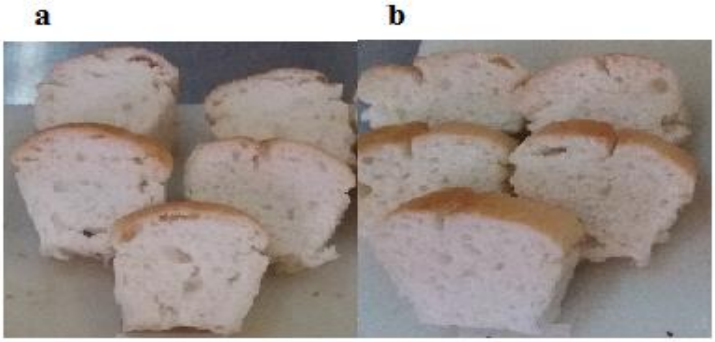


Figura 8. Fotografias de pães de arroz adicionados de 3 mg a) 5 mg de hidrolisado de chia/g de farinha b).



5.4.5. Comparação das características tecnológicas dos pães de trigo e arroz padrão e adicionados de hidrolisado de chia

Na Tabela 10 esta apresentada uma comparação das características tecnológicas dos pães de trigo e de arroz padrão e com adição de hidrolisado proteico de chia em diferentes quantidades.

Os pães de trigo obtiveram maior volume específico em relação aos pães de arroz resultado esperado devido à presença nos pães de trigo das proteínas do glúten (gliadinas e gluteninas) que são capazes de reter os gases formados pelas leveduras. A firmeza do miolo foi menor para os pães de arroz, isto pode ter ocorrido devido ao hidrocolóide metilcelulose contribuir para reforçar a rede proteica formada pelas proteínas da farinha de arroz e, consequentemente, auxiliou na retenção de CO_2 produzido pelas leveduras durante o processo fermentativo, proporcionando um pão mais macio, efeito que também foi verificado por Moore et al.(2004).

Tabela 10. Características tecnológicas dos pães de trigo e de arroz padrão e com adição de hidrolisado proteico de chia.

Pão	VE (mL/g)	Firmeza do miolo (N)	Pontuação
TP	$4,31^{ab} \pm 0,04$	$2,44^{bc} \pm 0,09$	$93,78^{a} \pm 0,74$
T1	$4,35^{ab} \pm 0,04$	$2,69^{ab} \pm 0,06$	$88,47^{ab} \pm 0,24$
T3	$4,63^{a} \pm 0,29$	$2,05^{cd} \pm 0,13$	$86,98^{bc} \pm 0,89$
T5	$3,96^{bc} \pm 0,14$	$4,65^{a} \pm 0,23$	$80,69^{c} \pm 0,89$
AP	$3,38^{d} \pm 0,16$	$1,32^{e} \pm 0,18$	$88,75^{bc} \pm 0,52$
A1	$3,32^{d} \pm 0,13$	$1,56^{de} \pm 0,37$	$83,05^{bc} \pm 0,44$
A3	$3,63^{cd} \pm 0,10$	$1,25^{e} \pm 0,07$	$84,61^{bc} \pm 0,34$
A5	$3,43^{d} \pm 0,05$	$1,36^{e} \pm 0,14$	$80,57^{c} \pm 0,46$

TP= pão de trigo padrão, T1, T3 e T5= pães de trigo adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha. AP= pão de arroz padrão, A1, A3 e A5= pães de arroz adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.VE: volume específico. Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença entre amostras de pães ($p > 0,05$).

Para avaliar a qualidade do pão vem sendo empregado o sistema de pontuação total, que consiste em avaliar as características do pão. Segundo Dutcosky (1996) e de acordo com os parâmetros avaliados pelo sistema de pontuação El-Dash (1978), o pão que apresenta uma pontuação de 81 a 100 pode ser classificado como um pão de boa qualidade, de 61 a 80

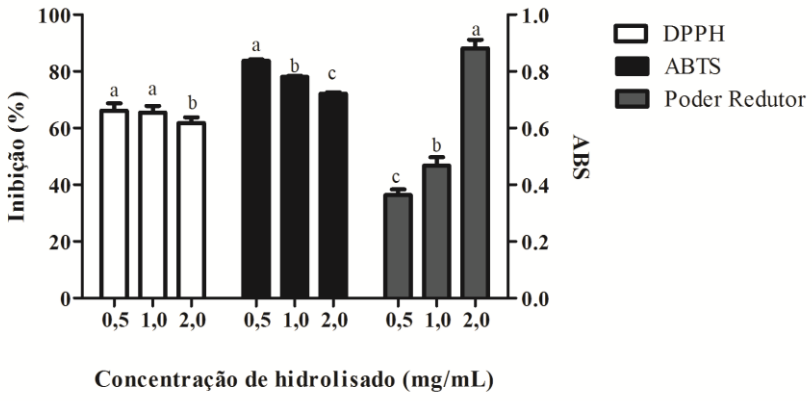
regular, de 31 a 60 ruim e com menos de 30 pontos de qualidade inaceitável. Neste trabalho, os pães de trigo padrão e com adição de hidrolisado apresentaram pontuação total de 93,78, 88,47 e 86,98 que correspondem o pão padrão e aos pães com 1 e 3 mg de hidrolisado de chia. Os pães de arroz padrão e com adição de hidrolisado apresentaram os respectivos valores de 88,75, 83,05 e 84,61 que correspondem ao pão padrão e aos pães com 1 e 3 mg de hidrolisado de chia/ g de farinha, sendo estes considerados pães de boa qualidade com exceção dos pães de trigo e de arroz com adição de 5 mg de hidrolisado de chia/ g de farinha que apresentaram pontuação de 80,69 e 80,57, sendo considerados pães regulares.

Verifica-se que houve uma influência positiva da adição de hidrolisado aos pães de trigo em relação ao volume específico e aos pães de arroz em relação a sua dureza, não apresentando os pães uma perda marcante nestas duas características tecnológicas. A adição de hidrolisado afetou de maneira mais notável a pontuação total dos pães, sendo mais marcante o efeito nos pães de arroz.

5.5. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO E DOS PÃES DE TRIGO E DE ARROZ COM ADIÇÃO DE HIDROLISADO DE CHIA

A Figura 9 apresenta a atividade antioxidante do hidrolisado proteico de chia determinada pelos diferentes métodos utilizados.

Figura 9. Atividade antioxidante apresentada pelo hidrolisado de proteína de chia analisado por diferentes métodos.



Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações testadas para o mesmo método. ABS: absorbância.

A atividade antioxidante não pode ser atribuída a um único mecanismo, pois no processo oxidativo devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (ALVES et al., 2010). Assim, foram aplicados os métodos DPPH, ABTS e poder redutor para avaliar a atividade antioxidante do hidrolisado de chia e dos pães de trigo e arroz adicionados de 3 mg de hidrolisado/g de farinha.

Nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL o hidrolisado apresentou os maiores valores de atividade antioxidante pelo método DPPH, de 66,09 e 65,43% respectivamente, não apresentando diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). A menor concentração de hidrolisado avaliado (0,5 mg/mL) para o método de captura do radical ABTS apresentou a maior atividade antioxidante de 83,74% ($p < 0,05$). Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para o método de sequestro do radical livre DPPH e poder redutor. Para o poder redutor houve um acréscimo na atividade antioxidante com aumento da concentração de amostra sendo que o aumento da absorbância indica aumento da capacidade redutora. A amostra de hidrolisado na concentração de 2,0 mg/mL apresentou o maior poder redutor com um valor de absorbância de 0,881. Verificou-se que avaliando os resultados dos três métodos testados, o hidrolisado de proteína de chia apresentou poder antioxidante.

O método de sequestrar o radical $DPPH^{\bullet}$ baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o $DPPH^{\bullet}$, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura mudando gradualmente para amarelo. O radical $DPPH^{\bullet}$ possui coloração púrpura, absorvendo a um comprimento de onda máxima de aproximadamente 518 nm (OLIVEIRA, 2015), podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

Esteve, Marina e Garcia (2015) obtiveram valores na faixa de 42,8 a 68,6 % para o sequestro do radical $DPPH^{\bullet}$ do hidrolisado de semente de azeitona com diferentes enzimas. Além disso, as maiores capacidades antioxidantes foram obtidas com as enzimas Alcalase (68,6%) e Neutrase (61,2%), seguida das enzimas Flavourzyme (52,5%) e PTN (42,8%) para a concentração de 3 mg/mL de hidrolisado de semente de azeitona. Estes valores são diferentes do obtido no presente estudo, onde nas menores concentrações de hidrolisado de chia testado apresentaram a maior capacidade antioxidante. Isto pode ter ocorrido devido aos diferentes graus de hidrolise obtidos nos diferentes hidrolisados. Evangelho et al., (2015) avaliou a atividade antioxidante de hidrolisado proteico de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L)

e obtiveram um valor de 37,15% para o hidrolisado com a enzima Alcalase. Ortiz-Valdez et al. (2012) estudaram hidrolisados proteicos de feijão Azufrado (*Phaseolus vulgaris*) verificando 44% de inibição do radical DPPH. Estes resultados são inferiores ao obtido no presente estudo. As diferenças obtidas nos diferentes trabalhos, além do grau de hidrólise atingido nos hidrolisados, também pode ser devido as diferentes matérias-primas utilizadas com composições proteicas diferentes.

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) ($ABTS^{+}$), que ocorre através da doação de um átomo de hidrogênio, onde o mesmo é analisado através de uma reação colorimétrica. O radical possui uma coloração azul/verde, com absorção máxima a 734 nm. Uma reação positiva, muda a intensidade da coloração da reação para verde claro, a qual é detectada pela diminuição na absorbância, medindo a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (BORGES et al., 2011; CHI et al., 2015; KUSKOSKI et al, 2005). O resultado apresentado na Figura 9 revelou que o hidrolisado de chia contem peptídeos potencialmente doadores de átomos de hidrogênio, os quais podem interagir com os radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis.

Nascimento (2015) estudou a obtenção de hidrolisado proteico de semente de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) onde avaliou a sua capacidade antioxidante pelo método do ABTS e obteve um valor de 77,38%. Ng et al. (2013) avaliaram hidrolisado de torta de dendê pelo mesmo método e obtiveram 70% de atividade antioxidante. Esteve, Marina e Garcia (2015) estudaram hidrolisado de semente de azeitona e verificaram um valor de 72% para captura do radical $ABTS^{+}$, esses valores são diferentes ao obtido no presente estudo. Na literatura sugere-se que a atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas poderia ser afetada significativamente pelo grau de hidrólise (GH), uma vez que esta característica afeta o comprimento da cadeia peptídica, bem como a exposição de grupos amino finais (RAMEZANZADE; HOSSEINI; NIKKHAH, 2017).

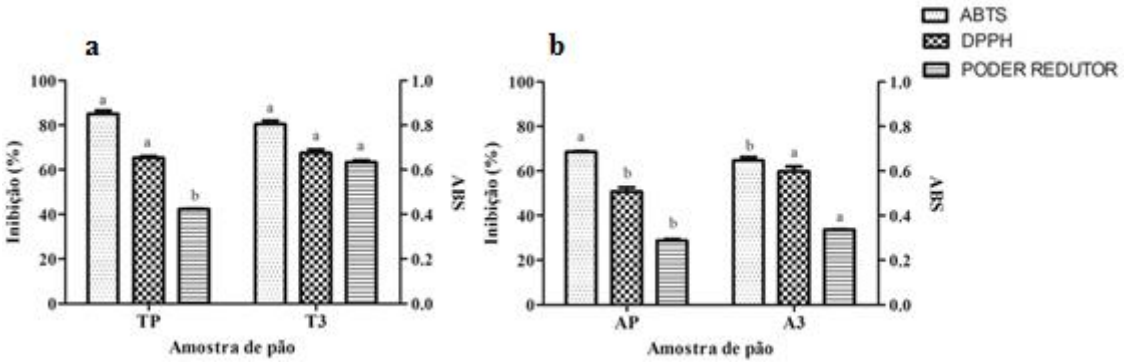
A propriedade redutora de componentes também pode ser verificada pela habilidade que o antioxidante possui para transferir um elétron para a redução de radicais, metais ou carbonilas, onde a presença do antioxidante resulta na redução do complexo Fe^{3+} utilizando como indicativo a mudança de cor do oxidante (SUN; TANUMIHARDJO, 2007). Piotrowicz (2016) estudou as propriedades antioxidante e anti-hipertensiva de peptídeos derivados do concentrado proteico de farelo de arroz (*Oryza Sativa* L.) e avaliou a capacidade redutora e observou que os peptídeos menores que 3 kDa obtidos com a enzima Flavourzyme apresentaram os maiores valores de poder redutor com absorbâncias de 0,96 e 0,88 para a

concentração de 2,5 mg/mL de amostra. A absorbância de 0,88 é igual a obtida neste estudo para a concentração de 2 mg/mL de hidrolisado de chia. Jamdar et al. (2010) observaram o poder redutor para os hidrolisados de amendoim em diferentes graus de hidrólise e verificaram um poder de redução na faixa de 0,72-0,98 estes valores são próximos do obtido no presente estudo.

Chang, Wu e Chiang (2007) relataram valores de 0,08-0,25 para a capacidade redutora na maior concentração (5 mg/mL) para o hidrolisado de hemoglobina, esses valores são inferiores ao obtido no presente estudo que obteve um poder redutor na faixa de 0,36-0,88. Piotrowicz e Mellado (2015), ao estudarem o efeito dos hidrolisados de anchoita, obtiveram valores de absorbância menores que os de hidrolisados de chia. Isso pode ser justificado pelo tipo de proteína estudada, além da condição de hidrólise ter sido diferente.

A Figura 10 mostram a atividade antioxidante determinada pelos três métodos DPPH, ABTS e Poder Redutor apresentada pelos pães padrão de trigo e arroz comparados com os pães adicionados de 3 mg de hidrolisado de chia/ g de farinha na concentração de 75 mg/mL, foram realizados testes preliminares (Anexos 5, 6 e 7) , contatando-se que os pães de trigo e de arroz adicionados de 3 mg de hidrolisado de chia /g de farinha apresentou a maior atividade antioxidante com relação as demais concentrações testadas.

Figura 10. Atividade antioxidante determinada pelos métodos de DPPH, ABTS e Poder Redutor dos pães de trigo a) e arroz b) padrão comparados com os pães adicionados de 3mg de hidrolisado de chia.



TP= pão de trigo padrão; T3 = pão de trigo adicionado de 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha.
AP= pão de arroz padrão; A3= pão de arroz adicionado de 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha.
Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre o mesmo método ($p < 0,05$), entre as amostras.
ABS: absorbância.

Para os pães de trigo, apenas o método do Poder Redutor apresentou atividade antioxidante maior para o pão adicionado de 3 mg de hidrolisado/g de farinha em relação ao pão de trigo padrão ($p < 0,05$). No entanto, os pães de arroz adicionados de 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha apresentaram maior atividade antioxidante mensurada através dos métodos DPPH e Poder Redutor em relação ao pão padrão, demonstrando que a adição de hidrolisado de chia nestes pães apresentou uma influência maior do que nos pães de trigo.

Observando os resultados determinados pelo método ABTS, o pão de trigo padrão e o adicionado de 3 mg de hidrolisado/g de farinha, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles.

Segura-Campos et al (2013) estudaram a adição de hidrolisado de chia em pães de trigo nas concentrações de 1 e 3 mg/g de farinha, verificando que não houve diferença na atividade antioxidante pelo método ABTS com relação ao pão padrão de trigo e adicionados de hidrolisado. Esse resultado é igual ao obtido no presente estudo, no entanto os autores justificaram que isto poderia ter ocorrido devido a temperatura elevada durante o cozimento, que provavelmente reduziu o potencial biológico dos compostos antioxidantes, fazendo com que o pão de trigo adicionado de hidrolisado não obtivesse uma atividade antioxidante maior que o pão padrão.

No entanto Franco-Miranda et al (2017) adicionaram hidrolisados de feijão lima e feijão caupi nas concentrações de 1% e 3% em pão doce (tipo mexicano), constatando que os pães adicionados de hidrolisado de feijão lima e caupi apresentaram as maiores atividades antioxidantes pelo método ABTS. Esse resultado é diferente do obtido no presente estudo, isto pode ter ocorrido porque a atividade antioxidante dos peptídeos pode depender das proteases específicas usadas para produzir o hidrolisado, da concentração da enzima utilizada, do GH alcançado e da natureza dos peptídeos libertados com massas moleculares, composição e sequência de aminoácidos diferentes e do tipo de matéria-prima utilizada (SEGURA-CAMPOS et al., 2012).

Entretanto, o mesmo método aplicado nos pães de arroz, mostrou que o pão padrão de arroz obteve uma capacidade antioxidante maior que o pão de arroz adicionado de 3mg de hidrolisado/g de farinha. Isto pode ter ocorrido porque a farinha de arroz contém vários compostos com atividade antioxidante como compostos fenólicos, tocoferóis, tocotrienóis e γ oryzanol (IQBAL; BHANGER; ANWAR, 2005) e que a concentração de hidrolisado de chia adicionado ao pão de arroz pode não ter sido o suficiente para aumentar sua capacidade antioxidante.

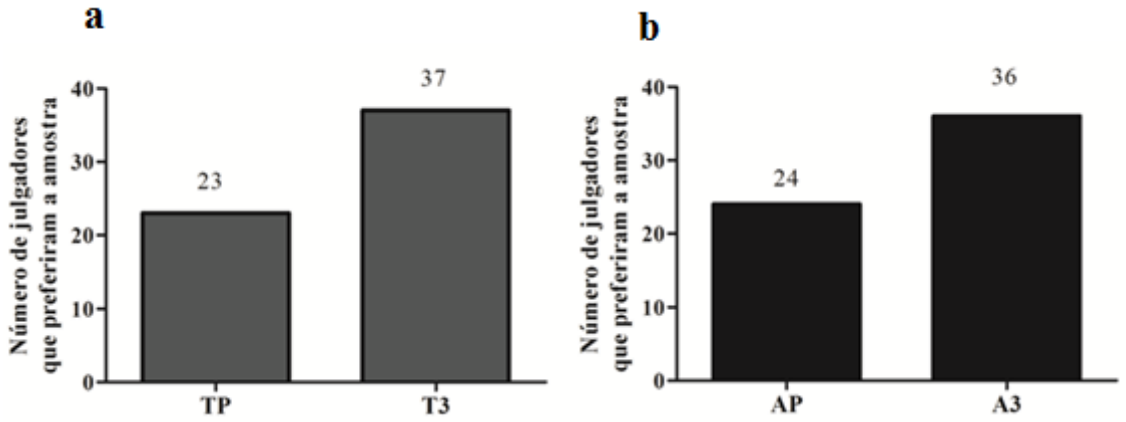
Da Silva (2016) demonstrou que biscoitos adicionados de farinha de caroço de manga apresentaram maior capacidade antioxidante pelo método DPPH em relação aos biscoitos controle, sem farinha de caroço de manga, sugerindo que isto pode ter ocorrido porque o caroço de manga possui compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis e esteróis como verificado por (RAO et al., 2012; ABDALLA et al, 2007; MASIBO; HE, 2008)

Avaliando o poder redutor nos pães de trigo e de arroz, observa-se que os pães adicionados de 3mg de hidrolisado de chia apresentaram uma capacidade redutora maior que os pães padrão. Pawlak (2015) trabalhando com a adição de 3, 5 e 7% de azeitonas tipo "alcaparras" em formulação de pão transmontano verificou que os produtos apresentaram atividade antioxidante, determinada pelo Poder Redutor. Ela sugere que este resultado pode ter ocorrido devido ao poder antioxidante dos compostos fenólicos presentes nas azeitonas.

5.6. ANALISE SENSORIAL DOS PÃES DE TRIGO E DE ARROZ ADICIONADOS DE HIDROLISADO PROTEICO DE CHIA

A Figura 11 apresenta os resultados da analise sensorial realizado em pães de trigo.

Figura 11. Comparação pareada de preferência entre os pães de trigo a) e arroz b) padrão e do adicionado de 3 mg de hidrolisado de chia/g de farinha.



Para o número de julgadores N=60 e nível de probabilidade p (1/2) = 5% do tipo bilateral preferência. TP= pão de trigo padrão, T3= pão de trigo adicionado de 3 mg de hidrolisado/g de farinha. AP= pão de arroz padrão, A3= pão de arroz com 3 mg de hidrolisado/g de farinha.

A amostra de pão padrão de trigo (TP) apresentou 23 respostas positivas de preferência e a amostra de pão de trigo adicionado de 3 mg de hidrolisado/g de farinha (T3) apresentou 37 respostas positivas. Para um número de 60 julgadores, é necessário que

existam 39 respostas positivas para uma das amostras, para indicar que houve diferença significativa entre elas, verificando-se a preferência. A comparação pareada entre as duas amostras testadas indicou que não houve diferença significativa entre as amostras à nível de 5% de significância, isto demonstra que a adição de hidrolisado de proteína de chia nos pães de trigo não influenciou na preferência, proporcionando boas características sensoriais visto que o pão adicionado de hidrolisado de chia não apresentou características sensoriais inferiores ao pão padrão.

Da Silva et al. (2012) com o objetivo de avaliar o valor nutritivo, a preferência e a intenção de compra de pão de sal produzido com farinha mista, composta de trigo e de ora-pronobis (*Pereskia aculeata)* nas concentrações 5 e 10%, verificaram que o pão com a menor concentração de ora-pronobis foi o mais preferido, os autores comentam que o motivo da preferência pode ser devido a textura e sabor que a fibra confere ao produto com maior quantidade de *P. aculeata*. Diferente do resultado obtido neste estudo.

Lima et al., (2009) estudaram as características físico-químicas e sensoriais de diferentes formulações de pães de forma enriquecidas com soro de leite em pó sem tratamento térmico e com tratamento térmico, os autores avaliaram as sete formulações incluindo pão convencional de forma e pães de forma com soro de leite em pó sem tratamento térmico misturado diretamente a farinha nas concentrações de 5, 7,5 e 10% e pães de forma com soro de leite em pó dissolvido e tratado termicamente nas mesmas concentrações, o teste de comparação pareada foi realizado nas formulações de pães de forma com soro de leite sem tratamento térmico concentração 5 e 7,5% e dos pães de forma adicionados de soro de leite com tratamento térmico 5 e 10% e verificaram que tanto para os pães com soro de leite sem tratamento térmico, como os pães com soro de leite com tratamento térmico, não houve preferência entre as amostras. Este resultado é semelhante ao obtido no presente estudo.

A amostra de pão padrão de arroz (AP) apresentou 24 respostas positivas de preferência e a amostra de pão de arroz adicionado de 3 mg de hidrolisado/g de farinha (A3) apresentou 36 respostas positivas. Para um número de 60 julgadores, é necessário que existam 39 respostas positivas para uma das amostras, para indicar que houve diferença significativa entre as amostras e verificar preferência por uma delas. A comparação pareada entre as duas amostras testadas, indicou que nenhuma delas foi preferida, isto demonstra que a adição de hidrolisado de proteína de chia nos pães de arroz influenciou de maneira positiva, proporcionando boas características sensoriais visto que o pão adicionado de hidrolisado de chia não apresentou características sensoriais inferiores ao pão padrão.

Figueira et al. (2011) estudaram a adição da microalga *Spirulina* em diferentes concentrações nos pães de arroz, e realizou o teste de preferência onde escolheram os pães adicionados de 3 e 5% de *Spirulina platensis* com base nas melhores características químicas e tecnológicas, onde 36 julgadores não treinados avaliaram os pães, sendo que a fazer análise estatística demonstrou que não houve amostra preferida. Este resultado é semelhante ao obtido no presente estudo.

6. CONCLUSÕES

6.1. CONCLUSÕES PARCIAS

Elaborou-se concentrado proteico proveniente da fração rica em proteínas obtida através de peneiramento da farinha de chia desengordurada. Do concentrado proteico obteve-se o hidrolisado de chia por via enzimática com grau de hidrólise 30%.

Através da hidrólise foi possível melhorar as características antioxidantes e antimicrobianas das proteínas concentradas. O hidrolisado de proteína de chia apresentou poder antioxidante. A maior concentração de hidrolisado de chia testada, apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Elaboraram-se pães de trigo e de arroz padrão e com adição de hidrolisado de chia nas concentrações de 1, 3 e 5 mg/g de farinha. Para os pães de trigo constatou-se que a maior concentração de hidrolisado reduziu o volume específico, aumentou a dureza do miolo e diminuiu a pontuação global. No entanto, para os pães de arroz, o volume específico na concentração de 3mg de hidrolisado de chia/ g de farinha apresentou o maior volume específico, quanto à dureza não se diferenciou comparado com o pão padrão, e na pontuação total diminuiu à medida que aumentou a concentração de hidrolisado na formulação.

Para o pão de trigo com adição de 3 mg de hidrolisado, o poder antioxidante aumentou apenas na determinação pelo o método do poder redutor, sendo que o pão de arroz adicionado de hidrolisado demonstrou atividade antioxidante maior utilizando os métodos DPPH e poder redutor, constatando que a adição de hidrolisado proporcionou maior poder antioxidante aos pães de arroz do que aos pães de trigo.

Quanto a analise sensorial, não houve preferência entre os pães adicionados de hidrolisado e os pães de trigo e de arroz padrão, demonstrando que as proteínas hidrolisadas de chia não influenciaram negativamente as características sensoriais dos produtos.

6.2. CONCLUSÃO GERAL

A adição de hidrolisado de chia proporcionou aos pães de trigo e de arroz boas características tecnológicas como pães volumosos e macios, com boa propriedade antioxidante, proporcionando boas características sensoriais visto que os pães de trigo e de

arroz adicionado de hidrolisado de chia não apresentaram características sensoriais inferiores aos pães padrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC (American Association Of Cereal Chemists). **Approved Methods of the AACC**. 10th edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, 2000.

ABDALLA, A. E. M.; DARWISH, S. M.; AYAD, E. H. E.; EL-HAMAHMY, R.M. Egyptianmango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. **Food Chemistry**, v. 103, n.4, 2007.

ABIMAPI - Associação Brasileira das industrias de biscoitos, massas alimentícias e pães e bolos industrializados. Disponível em < http://www.abimapi.com.br/estatistica-paes-bolos.php>. Acesso em: setembro de 2016.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas: terminologia**. 1993. 8 p.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishing, 1986.

AJIBOLA, C.F.; MALOMO, S. A.; FAGBEMI, T. N.; ALUKO, R. E. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa)* albumin, globulin and protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, Canada, n. 56, p. 189-200, 2016.

ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B., MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p.407–413, 2011.

ALUKO, R. E. The extraction and purification of protein: an introduction. In: YADA, R.Y. (Editor). **Proteins in food processing**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, p. 325-351, 2004.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of International. 17 th. 1 **CD-ROM**, 2000.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia na produção de alimentos**, v. 4, São Paulo: Editora Blücher, n. 371, p. 383-385, 2008.

AQUINO, V. C. **Estudo da estrutura de massas de pães elaborados a partir de diferentes processos fermentativos.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

AYERZA, R; COATES, W. Composition of chia (*Salvia hispanica L.)* grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. **Tropical Science**, n. 44, p. 131–135, 2004.

BATISTA, I.; PIRES, C.; NELHAS, R. Extraction of sardine proteins by acidic and alkaline solubilization; **Food Science and Technology International**, v.13, p189-194, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância sanitária (ANVISA). **Portaria nº 90, de 18 de outubro de 2000.** Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão.

BELMESSIERI, D.; GOZLAN, C.; DUCLOS, M. C.; DUMITRESCU, O.; LINA, G.; REDL, A.; DUGUET, N.; LEMAIRE, M. Dodecyl sorbitan ethers as antimicrobials against Gram-positive bacteria. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 20, p. 4660–4663, 2017.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. D. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1–20, 2011.

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**. n.42, p.93-100, 2005.

CAPITANI, M.I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S.M.; TOMÁS, M.C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica L.*) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 94-112, 2012.

CARUSO, M. C.; FAVATI, F.; DI CAIRANO, M.; GALGANO, F.; LABELLA, R.; SCARPA, T.; CONDELLI, N. Shelf-life evaluation and nutraceutical properties of chia seeds from a recent long-day flowering genotype cultivated in Mediterranean area. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 400–405, 2018.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H.; FARFÁN, J.; WADA, J. Caracterização de concentrado e isolado protéico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma gradiflorum Schum*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 01–08, 2009.

CAPRILES, V. D.; ARÊAS, J. A. G.; Avanços na produção de pães sem glúten: aspectos tecnológicos e nutricionais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 129-136, 2011.

CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Tecnologia da panificação**. Editora Manole, 2ª Edição, Barueri, SP, 2009. 2p.

CHANG, C. Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine hemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v.100, p.1537–1543, 2007.

CHI, C. F.; HU, F. Y.; WANG, B.; LI, T.; DING, G. F. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 301–313, 2015.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. DE LAS M. Effects of substituting chia (*Salvia hispanica L.*) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 729–736, 2015.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Revisão: Composição química, propriedades funcionais e aplicações tecnológicas da semente de chia (*Salvia hispânica L.*) em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 259-268, 2014.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2010/2011: décimo levantamento.** 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_07_15_11_03_18_boletim_julho_-_2011.pdf>. Acesso em: 11/10/17.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento**. Perspectivas para a agropecuárias,** v.5, produtos de verão. 2017/2018, 2017.

DA SILVA, C. G. **Desenvolvimento de biscoitos enriquecidos com farinha de caroço de manga: incorporação de substâncias bioativas e aproveitamento de resíduos agroindustriais.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Nutrição). Universidade Federal de Fluminense, Niterói, 2016.

DE ALMEIDA, K. N.; ALVIM, T. C.; DE SOUZA, A. R. M.; LACERDA, G. E.; ALVIM, F. A. L. S.; ALVIM, J. C. Hidrólise enzimática da lactose de permeado de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 70, n. 2, p. 55-63, 2015.

DE OLIVEIRA, M. S. R.; FRANZEN, F. L.; TERRA, N. N.; KUBOTA, E. H. Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 199-210, 2015.

DE OLIVEIRA, L. M.; DA SILVA LUCAS, A. J.; CADAVAL, C. L.; MELLADO, M. S. Bread enriched with flour from cinereous cockroach (*Nauphoeta cinerea).* **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 44, n. August, p. 30–35, 2017.

DI BERNARDINI, R.; RAI, D. K.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HARNEDY, P.; HAYES, M. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. **Peptides**, v. 32, n. 2, p. 388–400, 2011.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Editora Champagnat, 1996. 123 p.

EITEL, N. B. **Hidrólise enzimática do farelo de soja desengordurado para obtenção de peptídeos bioativos: capacidade antioxidante e atividade anti-hipertensiva.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

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

EL-DASH, A.; CABRAL, L. C.; GERMANI, R. **Tecnologia de farinhas mistas**. Empresa Brasileira de Pesquisa, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. – Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

ERDMAN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRODER, H. The possible roles of food- derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p.643-654, 2008.

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; LANNES, S.C.S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, 802-806, 2005.

ESTEVE, C.; MARINA, M. L.; GARCÍA, M. C. Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. **Food Chemistry**, v. 167, p. 272–280, 2015.

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

EVANGELHO, J. A.; BERRIOS, J. J.; ANTUNES, M. D.; VANIER, N. L.; PINTO, V. Z.; ZAVAREZE, E. R. Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de feijão preto (*Phaseolus vulgaris L.)* **Anais do 5º Simpósio de Segurança alimentar Alimentação e Saúde.** n. 51, p. 3–6, 2015.

EVANGELHO, J. A. D.; VANIER, N. L.; PINTO, V. Z.; BERRIOS, J. J. D.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. D. R.. Black bean (*Phaseolus vulgaris L.)* protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v.214, p.460–467, 2017.

FERNANDES, S. S.; SALAS-MELLADO, M. DE LAS M. Addition of chia seed mucilage for reduction of fat content in bread and cakes. **Food Chemistry**, v. 227, p. 237–244, 2017.

FERREIRA, S. M. R; OLIVEIRA, P.V; PRETTO, D. Parâmetros de qualidade do pão francês. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.19, n.2, p.301-318, 2001.

FERREIRA, T. R. B. **Caracterização nutricional e funcional da farinha de chia (*Salvia hispanica*) e sua aplicação no desenvolvimento de pães**. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 112, 2013.

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**, v. 14, n. 4, p. 308–316, 2011.

FIGUEIREDO, V. R. G. **Concentração e hidrólise enzimática das proteínas de okara.** Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

FILHO, A. A. A.; ARAUJO, W. M. C.; FALCIROLLI, D. M. C.; PILLA, N.; MARQUES, A. O. Avaliação da qualidade tecnológica de pães enriquecidos com farelo de trigo. **Alimentos e Nutrição**, v. 8, n. 1, p. 17-25, 1997.

FITZGERALD, C.; GALLAGHER, E.; DORAN, L.; AUTY, M.; PRIETO, J.; HAYES, M. Increasing the health benefits of bread: Assessment of the physical and sensory qualities of bread formulated using a renin inhibitory Palmaria palmata protein hydrolysate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 398–405, 2014.

FONSECA, R. A. D. S. DA. **Atividade antioxidante de peptídeos provenientes de hidrolisado proteico de bijupirá (*Rachycentron canadum*)**. Tese (Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, p. 131, 2014.

FRANCO-MIRANDA, H., CHEL-GUERRERO, L., CASTELLANOS-RUELAS, S.G.T. A., BETANCUR-ANCONA, D. Physicochemical, rheological, bioactive and consumer acceptance analyses of concha-type Mexican sweet bread containing Lima bean or cowpea hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**. v. 80. P. 250-256, 2017.

GALLAGHER, E.; KUNKEL, A.; GORMLEY, T.R.; ARENDT, E.K. The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. **European Food Research and Technology**, v.218, n.1, p.44-48, 2003.

GOH, K. K. T.; MATIA-MERINO, L.; CHIANG, J. H.; QUEK, R.; STEPHANIE JUN BING SOH, S. J. B.; LENTLE, R.G. The physico-chemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 297-307, 2016.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. A.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review**. Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813–1827, 2011.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; ALÉMAN, A.; LÓPEZ DE LACEY, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. **Sea by-products as real material**, v. 661, n. 2, p. 89–115, 2010.

GRAÇA, C. S.; BARBOSA, J. B.; DE SOUZA, M. Z.; MOREIRA, A. S.; LUVIELMO, M. M.; SALAS MELLADO, M. M. Addition of collagen to gluten-free bread made from rice flour Adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2016.

GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A.; KMIECIK, D. Functional Aspects of Antioxidants in Traditional Food. Functional **Properties of Traditional Foods.** Springer, p.3-8, 2016.

GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial de trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 9-14 p.

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.19, p.489–498, 2002.

GUERREIRO, L. **Dossiê Técnico Panificação**. REDETEC Rede de Tecnologia do Rio de janeiro. Dezembro / 2006.

GUTKOSKI, L. C.; NODARI, L. M.; NETO, R. J. Avaliação de farinhas de trigos cultivados no Rio Grande do Sul na produção de biscoitos**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 91-97, 2003.

HARNEDY, P. A.; O'KEEFFE, M. B.; FITZGERALD, R. J. Fractionation and identification of antioxidant peptides from an enzymatically hydrolysed Palmaria palmata protein isolate. **Food Research International**, v. 100, n. July, p. 416–422, 2017.

HE, R., JU, X.; YUAN, J.; WANG, L.; GIRGIH, A. T.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. **Food Research International**, v.49, p.432–438, 2012.

HE, R.; GIRGIH, A. T.; MALOMO, S. A.; JU, X.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 219–227, 2013.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4501–4523, 2002.

HERPANDI, HUDA, N.; ROSMA, A.; WAN NADIAH, W. A. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases international. **Food Research Journal**, Toronto, v. 19, n. 3, p. 863-867, 2012.

IGLESIAS-PUIG, E.; HAROS, M. Evaluation of performance of dough and bread incorporating chia (*Salvia hispanica L.*). **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 6, p. 865–874, 2013.

IJAROTIMI, O. S.; MALOMO, S. A.; FAGBEMI, T. N.; OSUNDAHUNSI, O. F.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of Buchholzia coriacea seed flour and protein concentrate at different pH and protein concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 275–288, 2018.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I.; ANWAR, F. Antioxidant properties and components of some commercially viable varieties of rice bran in Pakistan. **Food Chemistry**, v.93, n.2, p.265-272, 2005.

IUMB. Enzyme Nomenclature. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/21/62.html>. Acesso em: 28/12/2016.

JANG, A.; JO, C.; KANG, K. S.; LEE, M. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 327–336, 2008.

JEŻOWSKA-BOJCZUK, M.; STOKOWA-SOŁTYS, K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 997–1009, 2018.

JE, J.; QIAN, Z.; BYUN, H.; KIM, S. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 840–846, 2007.

JI, N.; SUN, C.; ZHAO, Y.; XIONG, L.; SUN, Q. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 161, p. 148–154, 2014.

JIANG, J.; XIONG, Y. L.; CHEN, J. PH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8035–8042, 2010.

JIANG, L.; WANG, B.; LI, B.; WANG, C.; LUO, Y. Preparation and identification of peptides and their zinc complexes with antimicrobial activities from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 64, p. 91-98, 2014.

JIN, D.-X.; LIU, X.-L.; ZHENG, X.-Q.; WANG, X.-J.; HE, J.-F. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v.204, p.427–436, 2016.

KAČMÁROVÁ, K.; LAVOVÁ, B.; SOCHA, P.; URMINSKÁ, D. Characterization of protein fractions and antioxidant activity of chia seeds (*Salvia hispanica l.*). **Scientific Journal for Food Industry,** v. 10, n. 1, p. 78-82, 2016.

KIMATU, B. M.; ZHAO, L.; BIAO, Y.; MA, G.; YANG, W.; PEI, F.; HU, Q. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. **Food Chemistry**, v. 230, p. 58–67, 2017.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p. 1297-1308, 2006.

KRINGEL, D. H. **Efeito da fosfatação da farinha de arroz na qualidade do pão armazenado sob congelamento.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 131–139, 2000.

KUROZAWA, L.; PARK, K.; HUBINGER, M. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 29, p. 557-566, 2009.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI_FILHO, J.; FETT, R. Aplicatíon de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

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.

LIMA, A. DE S.; MACIEL, J. F.; QUEIROGA, R. DE C. R. DO E.; NETO, E. DE A. L.; ANJOS, U. U. DOS; FARIAS, L. R. G. DE. Avaliação físico-química e sensorial de pães de forma enriquecidos com soro de leite em pó. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 366–372, 2009.

LOPES, A. S.; ORMENESE, R. C. S. C.; MONTENEGRO, F. M.; FERREIRA JÚNIOR, P. G.; Influência do uso simultâneo de ácido ascórbico e azodicarbonamida na qualidade do pão francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.307-312, 2007.

LUNA PIZARRO, P.; ALMEIDA, E. L.; SAMMÁN, N. C.; CHANG, Y. K. Evaluation of whole chia (*Salvia hispanica L.)* flour and hydrogenated vegetable fat in pound cake. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 73–79, 2013.

MARCO, C.; ROSELL, C.M. Bread making performance of protein enriched, gluten-free breads. **European Food Research and Technology**, v.227, n.4, p.1438-1447, 2008.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A.V.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Hidrolisado proteico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, 2009 .

MASIBO, M.; HE, Q. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n.4, 2008.

MENEZES, J. M. B.; ZAMBELLI, R. A.; CHINELATE, G. C. B.; RODRIGUES, C. P.; PONTES, D. F. Adição de colágeno hidrolisado na qualidade da farinha de trigo para a produção de pães tipo forma. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Pombal, v. 3, n. 1, p. 10-22, 2014.

MENGA, V.; AMATO, M.; PHILLIPS, T. D.; ANGELINO, D.; MORREALE, F.; FARES, C. Gluten-free pasta incorporating chia (Salvia hispanica L.) as thickening agent: An approach to naturally improve the nutritional profile and the in vitro carbohydrate digestibility. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1954–1961, 2017.

MEZAIZE, S,; CHEVALLIER, S.; LE BAIL, A.; DE LAMBALLERIE, M.; Optimization of gluten-free formulations for french-style breads. **Journal of Food Science**, v.74, n.3, p.140-146, 2009.

MIGLIAVACCA, A. R.; SILVA, B. R. T.; VASCONCELOS, S. L. A.; FILHO, M. W.; BAPTISTELLA, C. L. J.; O cultivo da chia no brasil: futuro e perspectivas - **Journal of Agronomic Sciences**, v.3, p.161-179, 2014.

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

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

MORONTA, J.; PAOLA L. SMALDINI, P. L.; DOCENA, G. H.; AÑÓN, M. C. Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 463-473, 2016.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends Food Science & Technology**. n. 5, p. 204-210, 1998.

MUÑOZ, L. A.; COBOS, A.; DIAZ, O.; AGUILERA, J. M. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 216–224, 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. 6d, Barcelona, Elsevier España, 960p, 2009.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 178–185, 2012.

NARAYANA, J. L; CHEN, J. Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. **Peptides**, v. 72, p. 88–94, 2015.

NASCIMENTO, E. S. **Obtenção de Hidrolisado proteico de sementes de quiabo *abelmoschus esculentus* (*L.*) moench e sua capacidade antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

NICKLISCH, S. C. T.; WAITE, J. H. Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins. **MethodsX**, v. 1, n. October, p. 233-238, 2014.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods. Standardization of Antimicrobial Sensitivity Tests by Disk-diffusion**, v. 20, n.1, 2005.

NG, K. L.; AYOB, M. K.; SAID, M.; OSMAN, M. A.; ISMAIL, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 725–731, 2013.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v.29, p.464– 72, 2011.

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–27, 2009.

NONGONIERMA, A. B.; LE MAUX, S.; DUBRULLE, C.; BARRE, C.; FITZGERALD, R. J. Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl

peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 112–118, 2015.

NORDSTRÖM, R.; NYSTRÖM, L.; ANDRÉN, O. C. J.; MALKOCH, M.; UMERSKA, A.; DAVOUDI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Membrane interactions of microgels as carriers of antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 513, p. 141–150, 2018.

NUNES, M. H. B.; MOORE, M. M; RYAN, L. A. M.; ARENDT, E. K. Impacto of emulsifiers on the quality and rheological properties of gluten-free breads and batters. **European Food Research and Technology**, v.228, p.633-642, 2009.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OLIVOS-LUGO, B. L.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. Á.; TECANTE, A. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). **Food Science and Technology International**, v.16, n.1, p. 89-96, 2010.

ORONA-TAMAYO, D.; VALVERDE, M. E.; NIETO-RENDON, B.; PAREDES-LOPEZ, O. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica L.*) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. **LWT - Food Science and Technology,** n. 64, p. 236-242, 2015.

ORTIZ-VALDEZ, A.; FUENTES-GUTIÉRREZ, C. I.; GERMÁN-BÁEZ, L. J.; GUTIÉRREZ-DORADO, R.; MEDINA-GODOY, S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. **LWT – Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-96, 2012.

OTTO, T.; BAIK, B.; CZUCHAJOWSKA, Z. Wet fractionation of garbanzo bean and pea flours. **Cereal Chemistry**, 74, 141–146, 1997.

OWENS, W. G. **Cereals processing technology.** Cambridge: Woodhead Publishng. p. 256, 2001.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliaçãoo da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

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

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p. 120–125, 1996.

PAREYT, B.; FINNIE, S. M.; PUTSEYS, J. A.; DELCOUR, J. A. Lipids in bread making: sources, interactions, and impact on bread quality. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p. 266–279, 2011.

PAWLAK, C. **Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Sensorial do Pão Transmontano com azeitonas verdes descaroçadas do tipo "alcaparras".** Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2015.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 9, p. 960–965, 2002.

PELLEGRINI, N.; AGOSTONI, C. Nutritional aspect of gluten-free products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.95, p.2380-2385, 2015.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, MC.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. **Isolation of active compounds from Sebastiania brasiliensis**, v.77, p.37-40, 2001.

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

PIOTROWICZ, I. B. B.; **Avaliação das propriedades antioxidante e anti-hipertensiva de peptídeos derivados do concentrado proteico de farelo de arroz (*oryza sativa* l.).** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

PIOTROWICZ, I. B. B.; MELLADO, M. M. S. Antioxidant hydrolysates production from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) with different enzymes. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1203–1211, 2015.

PIZZINATO, A.; CAMPAGNOLLI, D. M. F. Avaliação tecnológica de produtos derivados da farinha de trigo (pão, macarrão, biscoitos). **Boletim ITAL**, 1993.

POPOV-RALJIC´, J. V.; MASTILOVIC´, J. S.; LALIC˘IC´-PETRONIJEVIC´, J. G.; POPOV, V. S. Investigations of bread production with postponed staling applying instrumental measurements of bread crumb color. **Sensors**, v.9, p.8613–8623, 2009.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O. **Análise sensorial para a avaliação da qualidade dos alimentos.** Rio Grande :Ed. FURG, p. 268. 2006.

RAMEZANZADE, L.; HOSSEINI, S. F.; NIKKHAH, M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 234, p. 220–229, 2017.

RANHOTRA, G.S.; LOEWE, R.J.; PUYAT, L.V. Preparation and evaluation of soy-fortified gluten-free bread. **Journal of Food Science**, v.40, n.1, p.62-64, 1975.

RAMOS, S. C. F. **Avaliação das propriedades gelificantes da farinha de chia Salvia hispanica L .): Desenvolvimento de novas aplicações culinárias.** Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio Janeiro, p. 111, 2013.

RAO, V. S.; CARVALHO, A. C.; TREVISAN, M. T. S.; ANDRADE, G. M.; NOBRE JÚNIOR, H. V.; MORAES, M. O.; IURY, H. I. MAGALHÃES, H.; MORAIS, T. C.; SANTOS, F. A. Mangiferin ameliorates 6-hydroxydopamineinduced cytotoxicity and oxidative stress in ketamine model of schizophrenia. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 4, 2012.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine.** v. .26, p.1231–1237, 1999.

RIBOTTA, P. D.; AUSAR, S. F.; MORCILLO, M. H.; PÉREZ, G.T.; BELTRAMO, D. M.; LEON, A. E. Production of gluten-free bread using soybean flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.14, p.1969-1974, 2004.

RIVERA, L. E. C.; RAMOS, A. P.; DESGARENNES, C. P. Artículo de revisión Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 51, p. 57–67, 2007.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da Hidrólise Enzimática sobre Propriedades Funcionais de Caseína Bovina Coagulada pela Ação da Quimiosina. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v. 25, p. 468 – 474, 2005.

RUPFLIN, D. I. A. Caracterización de la Semilla Del Chan (*Salvia hispanica L.*) y Diseño de um Producto Funcional que la Contiene como Ingrediente. **Revista 23 de la Universidad del Valle de Guatemala**. p. 43-49, 2011.

RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G. F.; STANTON. C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v.3, p.765-791, 2011.

RYDLO, T.; MILTZ, J.; MOR, A. Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, 2006.

SABEENA FARVIN, K. H.; ANDERSEN, L. L.; OTTE, J.; NIELSEN, H. H.; JESSEN, F.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 204, p. 409–419, 2016.

SAMARANAYAKA, A.G.P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v.3, p.229-254, 2011.

SÁNCHEZ, H. D.; OSELLA, C. A.; DE LA TORRE, M. A. Optimization of gluten-free bread prepared from cornstarch, rice flour and cassava starch. **Journal of Food Science***,* v.67, n.1, p.416-419, 2002.

SÁNCHEZ, H.D.; OSELLA, C.A.; DE LA TORRE, M. A. Use of response surface methodology to optimize gluten-free **European Food Research and Technology**, v.218, n.1, p.44-48, 2004.

SANCHO, J.; BOTA, E.; CASTRO, J.J. **Introducción al análisis sensorial de los alimentos.** Barcelona: Alfaomega grupo Editos, 2002.

SANDOVAL-OLIVEROS, M. R.; PAREDES-LOPEZ, O. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (Salvia hispanica L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 1, 2013.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p.1949–1954, 2010.

SCIARINI, L. S.; RIBOTTA, P. D.; LEON, A. E.; PEREZ, G. T. Effect of hydrocolloids on gluten-free batter properties and bread quality. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 2306-2313, 2010.

SCIARINI, L.S; RIBOTTA, P.D; LEON, A.E; PEREZ, G.T. Incorporation of several additives into gluten free breads: Effect on dough properties and bread quality. **Journal of Food Engineering**, v.111, p. 590–597, 2012.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144–1150, 2009.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; BOOJAR, M. M. A.; EBRAHIMI, M. T.; KOBARFARD, F. Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of β-casein. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 217-225, 2016.

SEGURA-CAMPOS, M. R.; SALAZAR-VEGA, I. M.; CHELGUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Biological Potential of Chia (*Salvia hispanica* L.) Protein Hydrolysates and Their Incorporation Into Functional Foods. **Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 723-731, 2013.

SEGURA-CAMPOS, M.; RUIZ-RUIZ, J.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Antioxidant activity of Vigna unguiculata L. walp and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysates. **CYTA - Journal of Food**, v. 11, n. 3, p. 208–215, 2012.

SELMO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Technological quality of bread from rice flour with Spirulina. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 4, p. 1523–1528, 2014.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: < http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/life-science-video/universal-protease.html> Acesso em: março de 2017.

SILVA, C. M. **Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por peptídeos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*).** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SILVA, S.V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v.15, p.1-15, 2005.

STEFFOLANI, E.; MARTINEZ, M. M.; LEÓN, A. E.; GÓMEZ, M. Effect of pre-hydration of chia (*Salvia hispanica L.*), seeds and flour on the quality of wheat flour breads. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 401–406, 2015.

STORK, 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**. v.12, p. 71-77, 2009.

SU, Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco). **Comparative Biochemistry and Physiology - Biochemistry and Molecular Biology**, v. 158, n.2, p. 149–154, 2011.

SUN, T.; TANUMIHARDJO. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of Food Science**, v.72, p.159-165, 2007.

TANIGUCHI, M.; KAWABE, J.; TOYODA, R.; NAMAE, T.; OCHIAI, A.; SAITOH, E.; TANAKA, T. Cationic peptides from peptic hydrolysates of rice endosperm protein exhibit antimicrobial, LPS-neutralizing, and angiogenic activities. **Peptides**, v. 97, n. August, p. 70–78, 2017.

THAMNARATHIP, P.; JANGCHUD, K.; NITISINPRASERT, S.; VARDHANABHUTI, B. Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 329–335, 2016.

TEDRUS, G de A. S.; ORMENESE, R. de C. C.; SPERANZA, S. M.; CHANG, Y. K; BUSTOS, F. M.. Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade de pães. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21, n. 1, 2001.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos.** Florianópolis: Ed. da UFSC, 1987. 180 p.

TIMILSENA, Y. P.; WANG, B.; ADHIKARI, R.; ADHIKARI, B. Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 554-563, 2016.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 11-24, 2012.

UDENIGWE, C. C.; LIN, Y. S.; HOU, W. C.; ALUKO, R. E. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 199–207, 2009.

UGOLINI, L.; CINTI, S.; RIGHETTI, L.; STEFAN, A.; MATTEO, R.; D'AVINO, L.; LAZZERI, L. Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 15–23, 2015.

URAIPONG, C.; ZHAO, J. Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro a-amylase, B-glucosidase and ACE-inhibition activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1101–1110, 2015.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, supply and distribution online** – Foreign Agricultural Service. 2010. Disponível em: < http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdResult.aspx>. Acesso em: 29/11/17.

VALLEJOS, V.B. **Estudo da vida útil de pão sem glúten: avaliação e efeito de aditivos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

VÁZQUEZ-OVANDO, J. A.; ROSADO-RUBIO, J. G.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Procesamiento en seco de harina de chía (*Salvia hispanica L.*): Caracterización química de fibra y proteína. **CYTA - Journal of Food**, v. 8, n. 2, p. 117–127, 2010.

VERDÚ, S.; VÁSQUEZ, F.; IVORRA, E.; SÁNCHEZ, A. J.; BARAT, J. M.; GRAU, R. Physicochemical effects of chia (*Salvia hispanica L.*) seed flour on each wheat bread-making process phase and product storage. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 67–73, 2015.

WERGEDAHL, H.; LIASET, B.; GUDBRANDSEN, O. A.; LIED, E.; ESPE, M.; MUNA, Z.; BERGE, R. K. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. **The Journal of Nutrition,** v.134, p.1320-1327, 2004.

WU, H.; CHEN, H.; SHIAU, C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, n. 9-10, p. 949–957, 2003.

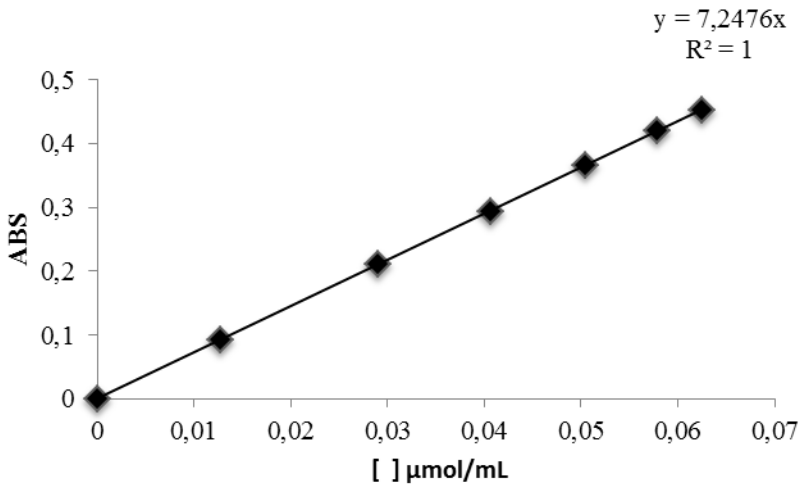
YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.43, p.27–32, 1995.

ZHANG, M.; MU, T. H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies.** v.43, p.92-101, 2017.

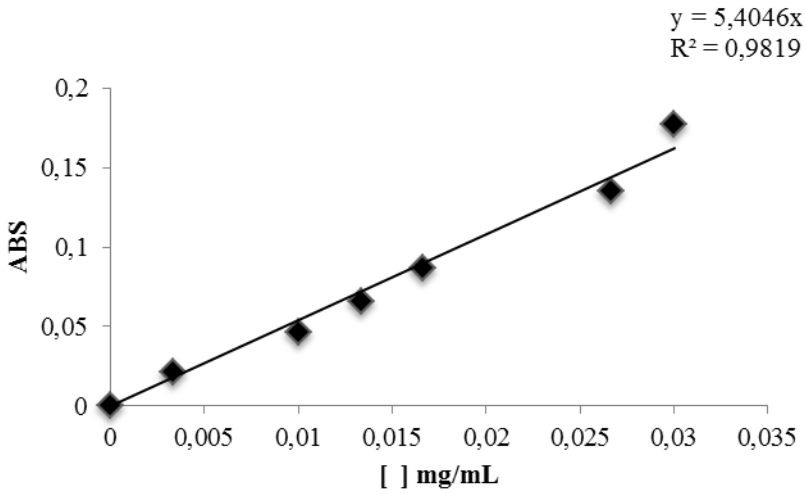
ZHENG, L.; ZHAO, M.; XIAO, C.; ZHAO, Q.; SU, G. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. **Food Chemistry**, v. 192, p. 288–294, 2016.

APÊNDICES

Apêndice 1. Curva da tirosina



Apêndice 2. Curva da Albumina



Apêndice 3. Ficha de teste de comparação pareada para os pães de trigo

Teste de comparação pareada

Nome:_____ Data:_____

Produto: Pão de trigo

Por favor, avalie as amostras da esquerda para direita, coloque os códigos e assinale a amostra de sua preferência.

Amostra	Assinale a amostra preferida.
_____	( )
_____	( )

Comentários:

Apêndice 4. Ficha teste de comparação pareada para os pães de arroz

Teste de comparação pareada

Nome:_____ Data:_____

Produto: Pão de arroz

Por favor, avalie as amostras da esquerda para direita, coloque os códigos e assinale a amostra de sua preferência.

Amostra	Assinale a amostra preferida.
_____	( )
_____	( )

Comentários:

ANEXOS

Anexo 1. Pontuação total, qualidade do pão. Planilha de El Dash

CARACTERÍSTICAS EXTERNAS	VALOR MÁXIMO	NOTA
Volume específico (VE x 3,33)	20	
Cor da crosta (fatores indesejáveis: não uniforme, opaca, muito clara, muito escura)	10	
Quebra (fatores indesejáveis: muito pequena, áspera, lados desiguais)	05	
Simetria (fatores indesejáveis: laterais, pontas e parte superior desiguais)	05	
SUBTOTAL	**40**	

CARACTERÍSTICAS INTERNAS	VALOR MÁXIMO	NOTA
Características da crosta (fatores indesejáveis: crosta "borrachenta", quebradiça, dura, muito grossa, muito fina)	05	
Cor do miolo (características indesejáveis: miolo cinza, opaco, desigual, escuro)	10	
Textura do miolo (fatores indesejáveis: falta de uniformidade, miolo áspero, compacto, seco)	10	
Estrutura da célula do miolo (fatores indesejáveis: falta de uniformidade, buracos muito abertos ou fechados)	10	
SUBTOTAL	**35**	

AROMA E SABOR	VALOR MÁXIMO	NOTA
Aroma (fatores indesejáveis: falta de aroma, aroma desagradável, "estranho", muito fraco ou forte)	10	
Gosto (fatores indesejáveis: ácido, "estranho", sabor de goma ou massa, gosto residual)	15	
SUBTOTAL	**25**	

TOTAL	**100**	

Anexo 2. Documento de aprovação Comitê de ética em pesquisa na área da saúde

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

PARECER Nº 179/ 2017

CEPAS 42/2017

Processo: 23116.004644/2017-21
CAAE: 69120217.1.0000.5324
Título da pesquisa: Enriquecimento de pão de trigo e de arroz com peptídeos bio-ativos da proteína de chia (salvia hispânica l)
Pesquisador Responsável: Karina Medeiros Madruga

PARECER DO CEPAS:

O Comitê, considerando tratar-se de um trabalho relevante, o que justifica seu desenvolvimento, bem como o atendimento à pendência informada no parecer 91/2017, emitiu o parecer de **APROVADO** para o projeto **"Enriquecimento de pão de trigo e de arroz com peptídeos bio-ativos da proteína de chia (salvia hispânica l)".**

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

Data de envio do relatório final: 31/03/2018.

Após aprovação, os modelos de autorizações e ou solicitações apresentados no projeto devem ser re-enviados ao Comitê de Ética em Pesquisa devidamente assinados.

Rio Grande, RS, 14 de novembrode 2017.

Eli Sinnott Silva

Profª. Eli Sinnott Silva
Coordenadora do CEPAS/FURG

Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: "Enriquecimento de pão de trigo e de pão de arroz com peptídeos bioativos da proteína de chia (*Salvia hispânica l*)."
Nome do (a) Pesquisador (a): Karina Medeiros Madruga
Nome do (a) Orientador (a): Myriam de las Mercedes Salas Mellado

1. **Natureza da pesquisa**: A Sra. (Sr.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade o desenvolvimento de pão de trigo e pão de arroz elaborado com hidrolisados de chia. Os pães serão produzidos de acordo com as normas de higiene e segurança exigidos através de Boas Práticas de Fabricação segundo a Resolução - RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002.
2. **Participantes da pesquisa**: 60 julgadores não treinados, entre professores e alunos da instituição, todos consumidores de pão.
3. **Envolvimento na pesquisa**: Ao participar deste estudo a Sra. (Sr.) permitirá que os pesquisadores utilizem suas respostas para publicar em um estudo de dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos. 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.). Além disso, sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone dos pesquisadores do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.
4. **Sobre as entrevistas**: Serão feitas duas perguntas para saber o quanto a Sra. (Sr.) gostou do produto, e se a Sra. (Sr.) normalmente consumiria pão de trigo e pão de arroz adicionado de hidrolisados de chia, através de uma ficha de avaliação será solicitado que avalie escolhendo o pão de sua preferencia.
5. Antes de aceitar participar da pesquisa, leia atentamente as explicações que informam sobre o procedimento da pesquisa:
   a) Cada participante receberá 2 amostras diferenciadas de pães. O procedimento terá o tempo de duração de aproximadamente 10 minutos para a degustação das amostras.
   b) As amostras serão provadas individualmente, e entre as amostras, o participante receberá água mineral para lavagem da cavidade oral e neutralização do paladar.
   c) O participante receberá uma ficha de avaliação para as duas amostras.
   Durante a sua participação, você poderá recusar a responder a qualquer pergunta.
6. **Riscos e desconforto**: A participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Os procedimentos usados oferecem riscos mínimos. Caso o julgador sinta algum desconforto estomacal como náusea ou apresente outros problemas, este será encaminhado incialmente ao ambulatório da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Campus Rio Grande para que receba um primeiro atendimento, que está localizado na Avenida Itália, km 08, CEP 96201-900, no mesmo endereço do Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade da FURG, campus Carreiros, onde serão realizados os testes de análise sensorial dos pães de trigo e pães de arroz com adição de hidrolisados da proteína de chia. Se necessário, após atendimento no ambulatório do Campus Carreiros, o julgador será encaminhando ao Pronto Atendimento do Hospital Universitário da FURG.

7. **Confidencialidade**: Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores e seu orientador (e/ou equipe de pesquisa) terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo até publicar os resultados dessa pesquisa.
8. **Benefícios**: Ao participar desta pesquisa a Sra. (Sr.) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo obtenha informações importantes sobre as características sensoriais dos pães desenvolvidos, de forma que a partir desta pesquisa possam ser disponibilizados produtos de melhor qualidade a disposição do público consumidor. Os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.
9. **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: Karina Medeiros Madruga, (53) 984512745.
Telefone do Comitê: (53) 3233-0235
E-mail: cepas@furg.br

Anexo 4. Teste de comparação pareada. Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância em vários níveis de probabilidade.

nº total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)					
	Bilateral (p=1/2), preferência			Unilateral (p=1/2), diferença		
	5%	1%	0,1%	5%	1%	0,1%
5	-	-	-	5	-	-
6	6	-	-	6	-	-
7	7	-	-	7	7	-
8	8	8	-	7	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	-	9	10	10
11	10	11	11	9	10	11
12	10	11	12	10	11	12
13	11	12	13	10	12	13
14	12	13	14	11	12	13
15	12	13	14	12	13	14
16	13	14	15	12	14	15
17	13	15	16	13	14	16
18	14	15	17	13	15	16
19	15	16	17	14	15	17
20	15	17	18	15	16	18
21	16	17	19	15	17	18
22	17	18	19	16	17	19
23	17	19	20	16	18	20
24	18	19	21	17	19	20
25	18	20	21	18	19	21
26	19	20	22	18	20	22
27	20	21	23	19	20	22
28	20	22	23	19	21	23
29	21	22	24	20	22	24
30	21	23	25	20	22	24

nº total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)					
	Bilateral (p=1/2), preferência			Unilateral (p=1/2), diferença		
	5%	1%	0,1%	5%	1%	0,1%
31	22	24	25	21	23	25
32	23	24	26	22	24	26
33	23	25	27	22	24	26
34	24	25	27	23	25	27
35	24	26	28	23	25	27
36	25	27	29	24	26	28
37	25	27	29	24	26	29
38	26	28	30	25	27	29
39	27	28	31	26	28	30
40	27	29	31	26	28	30
41	28	30	32	27	29	31
42	28	30	32	27	29	32
43	29	31	33	28	30	32
44	29	31	34	28	31	33
45	30	32	34	29	31	34
46	31	33	35	30	32	34
47	31	33	36	30	32	35
48	32	34	36	31	33	36
49	32	34	37	31	34	36
50	33	35	37	32	34	37
60	39	41	44	37	40	43
70	44	47	50	43	46	49
80	50	52	56	48	51	55
90	55	58	61	54	57	61
100	61	64	67	59	63	66

Fonte: ABNT, NBR 13088, 1994

Anexo 5. Atividade antioxidante dos pães de trigo e de arroz pelo método ABTS

	Concentração		
Pães	25 mg/mL	50 mg/mL	75 mg/mL
TP	$69,68^{bC} \pm 1,28$	$73,72^{bB} \pm 0,74$	$80,15^{aA} \pm 1,51$
T1	$66,81^{bB} \pm 1,69$	$77,82^{aA} \pm 1,14$	$77,97^{aA} \pm 1,61$
T3	$72,87^{aC} \pm 0,41$	$78,94^{aB} \pm 0,84$	$80,48^{aA} \pm 1,68$
T5	$75,11^{aC} \pm 0,64$	$80,35^{aA} \pm 1,73$	$78,95^{aB} \pm 1,80$

TP= pão de trigo padrão, T1, T3 e T5= pães de trigo acionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha

Letra maiúscula igual na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações testadas para a mesma amostra de pão.

Letra minúscula igual na mesma coluna indica que não a diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães adicionados de diferentes conteúdos de hidrolisados.

	Concentração		
Pães	25 mg/mL	50 mg/mL	75 mg/mL
AP	$32,62^{cC} \pm 1,31$	$51,70^{bB} \pm 1,34$	$68,51^{bA} \pm 0,34$
A1	$34,45^{cC} \pm 0,32$	$54,25^{bB} \pm 1,53$	$64,94^{cA} \pm 0,19$
A3	$39,61^{bC} \pm 0,85$	$59,96^{abB} \pm 1,71$	$64,82^{cA} \pm 1,46$
A5	$51,02^{aC} \pm 0,81$	$61,14^{aB} \pm 0,89$	$71,41^{aA} \pm 1,02$

AP= pão de arroz padrão, A1, A3 e A5= pães de arroz adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.

Letra maiúscula igual na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações testadas para a mesma amostra de pão.

Letra minúscula igual na mesma coluna indica que não a diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães adicionados de diferentes conteúdos de hidrolisados.

Anexo 6. Atividade antioxidante dos pães de trigo e de arroz pelo método DPPH

	Concentração		
Pães	25 mg/mL	50 mg/mL	75 mg/mL
TP	$49,36^{abC}$± 1,332	$62,27^{aB}$± 1,17	$65,39^{aA}$± 0,73
T1	$46,81^{bC}$±0,77	$62,91^{aA}$± 1,57	$55,52^{bB}$± 1,95
T3	$51,19^{aC}$± 1,17	$64,85^{aB}$± 1,36	$67,57^{aA}$±1,57
T5	$47,14^{bC}$ ±0,35	$63,69^{aB}$±0,25	$68,18^{aA}$± 1,11

TP= pão de trigo padrão, T1, T3 e T5= pães de trigo acionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha

Letra maiúscula igual na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações testadas para a mesma amostra de pão.

Letra minúscula igual na mesma coluna indica que não a diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães adicionados de diferentes conteúdos de hidrolisados.

	Concentração		
Pães	25 mg/mL	50 mg/mL	75 mg/mL
AP	$36,70^{bB}$± 2,67	$49,03^{aA}$± 0,98	$50,81^{bA}$± 1,89
A1	$41,81^{aC}$± 0,42	$48,58^{aB}$± 1,44	$62,85^{aA}$±0,95
A3	$36,09^{bC}$± 1,48	$48,36^{aB}$± 0,98	$59,86^{aA}$± 2,17
A5	$35,98^{bC}$± 1,55	$47,58^{aB}$± 1,01	$59,91^{aA}$± 2,52

AP= pão de arroz padrão, A1, A3 e A5= pães de arroz adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.

Letra maiúscula igual na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações testadas para a mesma amostra de pão.

Letra minúscula igual na mesma coluna indica que não a diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães adicionados de diferentes conteúdos de hidrolisados.

Anexo 7. Atividade antioxidante dos pães de trigo e de arroz pelo método Poder Redutor

	Concentração		
Pães	25 mg/mL	50 mg/mL	75 mg/mL
TP	$0,220^{dC}$± 0,002	$0,318^{dB}$±0,010	$0,424^{bA}$±0,002
T1	$0,252^{cC}$±0,006	$0,349^{cB}$±0,006	$0,446^{bA}$±0,16
T3	$0,318^{aC}$± 0,006	$0,421^{bB}$±0,016	$0,635^{aA}$±0,008
T5	$0,278^{bC}$± 0,001	$0,530^{aB}$±0,006	$0,654^{aA}$±0,036

TP= pão de trigo padrão, T1, T3 e T5= pães de trigo acionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha

Letra maiúscula igual na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações testadas para a mesma amostra de pão.

Letra minúscula igual na mesma coluna indica que não a diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães adicionados de diferentes conteúdos de hidrolisados.

	Concentração		
Pães	25 mg/mL	50 mg/mL	75 mg/mL
AP	$0,180^{abC}$±0,003	$0,230^{bB}$±0,002	$0,288^{bA}$ ±0,006
A1	$0,182^{abC}$±0,011	$0,233^{bB}$±0,007	$0,328^{aA}$±0,019
A3	$0,175^{bC}$±0,004	$0,257^{aB}$±0,008	$0,337^{aA}$±0,002
A5	$0,193^{aC}$±0,006	$0,250^{aB}$±0,005	$0,342^{aA}$±0,010

AP= pão de arroz padrão, A1, A3 e A5= pães de arroz adicionados de 1, 3 e 5 mg de hidrolisado/g de farinha.

Letra maiúscula igual na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações testadas para a mesma amostra de pão.

Letra minúscula igual na mesma coluna indica que não a diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães adicionados de diferentes conteúdos de hidrolisados.