

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA E GLUTATIONA DISSULFETO EM
FARINHA DE TRIGO E MASSAS DE PÃO FRESCA E CONGELADA POR
ELETROFORESE CAPILAR**

LETÍCIA GROFF FUNCK

Florianópolis, fevereiro de 2006.

LETÍCIA GROFF FUNCK

**DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA E GLUTATIONA DISSULFETO EM
FARINHA DE TRIGO E MASSAS DE PÃO FRESCA E CONGELADA POR
ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof(a). Dra. Alicia de Francisco

**DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA E GLUTATIONA DISSULFETO EM
FARINHA DE TRIGO E MASSAS DE PÃO FRESCA E CONGELADA POR
ELETROFORESE CAPILAR**

Por

Leticia Groff Funck

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Curso de
Ciência de Alimentos, pela comissão formada por:

Presidente: _____
Prof. Dra. Alicia de Francisco

Membro: _____
Prof. Dr. Tarso Benigno Ledur Kist

Membro: _____
Prof. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

Coordenador: _____
Prof. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz

**Florianópolis, SC.
2006**

*A Deus,
pelas grandes vitórias alcançadas.*

*Aos meus pais, Jorge e Dorly,
pelo imenso amor e incentivo, sempre.*

*A minha irmã, Ana Paula,
pela compreensão, pelo carinho e pela amizade.*

*Ao meu irmão, Adriano,
pelo apoio e afeto, mesmo à distância.*

*Ao Denis,
pelo amor que tudo suporta.
"Poderia ter todo o conhecimento,
mas, se não tivesse amor,
eu não seria nada." 1 Cor. 13:2*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alicia de Francisco, por ter me acolhido junto ao CERES, pelo apoio na realização desta dissertação e também por ter aberto caminhos para sonhos que se tornaram realidade.

Ao Prof. Dr. Tarso Kist, pelo incentivo, dedicação prestada e apoio integral a este trabalho.

À Profa. Dra. Patricia Rayas Duarte, por abrir as portas de seu laboratório e pelo apoio durante a realização da parte experimental.

À Cristina Escobar, pela importância de seu auxílio e seus conhecimentos durante meus experimentos na Universidade do Estado de Oklahoma (OSU) e pela amizade.

Ao amigo Paulo Trenhago, por sempre estar disposto a me ajudar e pela perseverança.

As minhas amigas Alejandra e Pauwei, pelas boas risadas e momentos de descontração na encantadora cidade de Stillwater, Estados Unidos. Ao Fadi, pela hospitalidade com que me recebeu no Laboratório de Química de Cereais, OSU.

A Gabriela, Ana, Eliane, Almy, Janaína, Carlos Alberto, Eduardo, Maria Helena, Gabriel, Karina e Rosa, por terem sido grandes amigos e pelo apoio quando estive em Stillwater.

À Prof. Dra. Renata Amboni, pelas sugestões e ajuda.

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi, Pró-Reitor de Pós-Graduação da UFSC, pelo apoio financeiro cedido.

A toda a equipe do CERES, pelos momentos de boas risadas, descontração e amizade. Obrigada pela convivência tão agradável, Aderley, Josiane, Alex, Patrícia e Malu. A Josiane e Malu pelo auxílio na realização das minhas análises.

A toda equipe do Laboratório de Biofísica da UFRGS, por terem me recebido e se disporem a ajudar.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A EMBRAPA Trigo, em especial, a Martha Z. de Miranda, pela doação da amostra.

As minhas irmãs de coração, Amélia, Jane Lúcia, Mirian, Esther, Nágila e Lilica pelas orações e momentos de extrema alegria.

As minhas amigas, Mariana S. Moreira, Alexandra Pissoli e Caroline Spilere por compartilharem momentos felizes comigo no CAL.

Aos meus amigos da Galera UFSC e a Letícia Diemer que compreenderam os momentos de distância, mas que trouxeram grande alegria nos reencontros.

Aos meus pais, Jorge e Dorly, por confiarem na minha capacidade e pelo apoio incondicional. Foram e sempre serão meu braço forte, meu amparo em todas as horas, meus confidentes e conselheiros em todas as dificuldades. Sei que vibram junto comigo neste momento especial.

A minha irmã, Ana Paula, que apesar de suportar a minha distância muitas vezes, soube sempre me acolher com carinho e boas risadas.

Ao meu irmão, Adriano, meu médico favorito, que apesar de estar distante sabe valorizar o amor que sentimos um pelo outro.

A minha família e a do meu noivo, que sempre torceram pelo meu crescimento pessoal e profissional. As minhas cunhadinhas, Mirian e Suzana, e à mãe do meu noivo, Agueda, que tanto me amam e que oraram muito pela concretização deste sonho.

Ao meu amado Denis, meu incentivo a toda hora, meu companheiro sempre. Obrigada pelo teu amor que transborda. Obrigada por nunca deixar com que eu me abatesse frente às dificuldades. A concretização dos nossos grandes sonhos já começou. Agora podemos buscá-los com mais dedicação e cada vez mais próximos um do outro. Eu te amo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 TRIGO.....	18
2.1.1 Farinha de trigo.....	19
2.1.2 Glúten.....	20
2.2 LEVEDURAS.....	22
2.2.1 Identificação.....	22
2.2.2 Fermentação.....	22
2.3 MASSAS FERMENTADAS DE TRIGO.....	25
2.3.1 Massas de pão frescas.....	25
2.3.2 Massas de pão congeladas.....	27
2.4 GLUTATIONA.....	41
2.5 ELETROFORESE CAPILAR (EC).....	45
2.5.1 Classificação.....	46
2.5.2 Eletroforese Capilar de Zona (CZE).....	48
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
2.6.1 Linearidade.....	54
2.6.2 Precisão.....	55
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA E GLUTATIONA DISSULFETO EM FARINHA DE TRIGO BRS 208 (safra 2003) POR ELETROFORESE CAPILAR E ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA.....	67
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 AMOSTRA.....	70
2.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	71
2.3 EQUIPAMENTO.....	72
2.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR (EC) PARA DETERMINAR GLUTATIONA.....	73
2.4.1 Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração.....	73
2.4.2 Preparação dos extratos.....	73
2.4.3 Definição das condições de análise.....	76
2.5 ELETROFEROGRAMAS DAS SOLUÇÕES PADRÃO E DOS EXTRATOS DE FARINHA.....	77
2.6 CONCENTRAÇÕES DE GSH E GSSG NOS EXTRATOS E NA AMOSTRA.....	77
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1	ESCOLHA DA AMOSTRA	78
3.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	78
3.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR (EC) PARA DETERMINAR GLUTATIONA.....	79
3.3.1	Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração.....	79
3.3.2	Preparação dos extratos.....	84
3.4	ELETROFEROGRAMAS DOS EXTRATOS	85
3.5	CONCENTRAÇÕES DE GSH E GSSG PRESENTES NOS EXTRATOS E NA AMOSTRA.....	87
4	CONCLUSÃO.....	89
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

**CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA E GLUTATIONA
DISSULFETO EM MASSAS DE PÃO FRESCA E CONGELADA POR
ELETROFORESE CAPILAR E ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA**

1	INTRODUÇÃO	95
2	MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1	AMOSTRAS	97
2.1.1	Farinha de trigo.....	97
2.1.2	Massas de pão.....	98
2.2	MICROESTRUTURA DO GRÃO DE TRIGO.....	99
2.3	EQUIPAMENTO	99
2.4	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR (EC) PARA DETERMINAR GLUTATIONA.....	100
2.4.1	Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração.....	100
2.4.2	Preparação dos extratos.....	100
2.4.3	Definição das condições de análise	103
2.5	ELETROFEROGRAMAS DAS SOLUÇÕES PADRÃO E DOS EXTRATOS DE FARINHA.....	104
2.6	CONCENTRAÇÕES DE GSH E GSSG NOS EXTRATOS E NAS AMOSTRAS.....	104
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	104
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
3.1	ESCOLHA DA AMOSTRA	105
3.2	MICROESTRUTURA DO GRÃO DE TRIGO.....	105
3.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR (EC) PARA DETERMINAR GLUTATIONA.....	107
3.3.1	Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração.....	107
3.3.2	Preparação dos extratos.....	109
3.4	ELETROFEROGRAMAS DOS EXTRATOS	110
3.5	CONCENTRAÇÕES DE GSH E GSSG PRESENTES NOS EXTRATOS E NAS AMOSTRAS	113
4	CONCLUSÃO.....	116
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

CONCLUSÃO GERAL.....120

SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS.....122

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Secção longitudinal do grão de trigo	18
FIGURA 2. Reação biológica para a obtenção de álcool etílico e CO ₂	23
FIGURA 3. Ilustração esquemática da interconversão das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) da glutathiona	24
FIGURA 4. Estruturas químicas da glutathiona – GSH (a) e glutathiona dissulfeto – GSSG (b) .	41
FIGURA 5. Biossíntese de glutathiona em <i>S. cerevisiae</i>	43
FIGURA 6. Classificação dos tipos de eletroforese conforme a natureza do sistema eletrólito	47
FIGURA 7. Classificação da eletroforese conforme a contribuição do fluxo eletrosmótico	47
FIGURA 8. Separação esquemática em CZE com EOF	49
FIGURA 9. Diagrama esquemático de um instrumento de eletroforese capilar	52

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Grão e farinha de trigo da cultivar BRS 208, safra 2003.....	71
FIGURA 2. Equipamento Beckman Coulter P/ACE MDQ (San Ramon, CA) acoplado a software 32 Karat [®] (Beckman Coulter).....	72
FIGURA 3. Fluxograma de preparação de extratos de farinha de trigo.....	75
FIGURA 4. Eletroferograma das soluções de GSH 100 µM (1) e GSSG 100 µM (2) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).....	80
FIGURA 5. Eletroferograma das soluções de GSH 500 µM (1) e GSSG 500 µM (2) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).....	80
FIGURA 6. Curva de calibração de glutathiona (GSH) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0)	82
FIGURA 7. Curva de calibração de glutathiona dissulfeto (GSSG) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).....	82
FIGURA 8. Eletroferogramas do extrato de farinha de trigo em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).....	86

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Representação esquemática da clivagem da ligação protéica dissulfeto por duas reações consecutivas SH/SS entre as cadeias.....	96
FIGURA 2. Grão de trigo da cultivar BRS 208, safra 2003, lote 166/03.....	98
FIGURA 3. Fluxograma de preparação dos extratos de massa de pão	102
FIGURA 4. Micrografia do endosperma amiláceo	106
FIGURA 5. Micrografia da parte externa e camada de aleurona do grão de trigo.....	106
FIGURA 6. Eletroferograma das soluções de GSH 300 µM (1) e GSSG 300 µM (2) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0)	107
FIGURA 7. Curva de calibração de glutathiona (GSH) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0)	108
FIGURA 8. Curva de calibração de glutathiona dissulfeto (GSSG) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).....	108
FIGURA 9. Eletroferogramas dos extratos de massa de pão fresca em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).....	111
FIGURA 10. Eletroferogramas dos extratos de massa de pão congelada em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).....	112

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

TABELA 1. Composição centesimal da farinha de trigo da cultivar BRS 208, safra 2003, lote 166/03	79
TABELA 2. Repetitividade do método	83
TABELA 3. Reprodutibilidade do método	84
TABELA 4. Concentrações de GSH e GSSG no extrato de farinha de trigo BRS 208 (2003)..	87
TABELA 5. Concentrações de GSH e GSSG na amostra de farinha de trigo BRS 208 (2003)	87
TABELA 6. Comparação dos valores de GSH e GSSG em farinha de trigo branca encontrados por diferentes autores.....	88

CAPÍTULO 3

TABELA 1. Comparação entre as concentrações de GSSG nos extratos de massa de pão fresca e congelada	113
TABELA 2. Concentrações de GSH e GSSG nos extratos de massas de pão.....	114
TABELA 3. Concentrações de GSH e GSSG nas amostras de massa de pão.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CZE	eletroforese capilar de zona
°C	grau Celsius
DATEM	ésteres de ácido diacetiltartárico com mono e diglicerídeos
DI	diâmetro interno
DSC	calorimetria diferencial de varredura
EC	eletroforese capilar
EOF	fluxo eletrosmótico
Eq.	equação
escore	características externas/aparência, textura, cor da miolo e escore geral
g	gramas
G'	módulo de armazenamento, Pa
G''	módulo de perda, Pa
tan δ	G''/G'
GSH	glutathiona
GSSG	glutathiona dissulfeto
h	horas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
MEV	microscopia eletrônica de varredura
min.	minutos
m/m	massa/massa
mM	milimolar
μ M	micromolar
M _r	massa molar

NaOH	hidróxido de sódio
nM	nanomolar
NIR	infravermelho próximo
Pa	Pascal
s.	segundos
SSL	esteroil lactilato sódico
UV	ultravioleta

RESUMO

Métodos de eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção por absorção ultravioleta (UV) foram desenvolvidos para separação rápida e sensível de glutathiona (GSH) e glutathiona dissulfeto (GSSG) em farinha de trigo e massas de pão fresca e congelada. A amostra de farinha foi caracterizada por análises físico-químicas, microscópicas e reológicas (força do glúten). A preparação dos extratos envolveu os passos de diluição em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6), centrifugação, ultrafiltração (filtro Microcon, $M_r = 3000$ kDa), liofilização e reconstituição com tampão bicarbonato 20 mM (pH 6). Para a análise por eletroforese capilar utilizou-se o equipamento P/ACE MDQ (Beckman Coulter, San Ramon, CA) com detector de absorção UV a 200 nm. Os limites mínimos de quantificação foram de 5 e 15 μ M para GSSG e GSH, respectivamente. O método apresentou boa correlação linear, com coeficientes de correlação (r) de 0,9977 para GSH e 0,9994 para GSSG ($p < 0,005$). As concentrações de GSH e GSSG na amostra de farinha foram 21,86 e 26,90 nmol/g de farinha, respectivamente. Nas amostras de massas de pão fresca e congelada foi encontrada apenas GSSG, equivalente a 10,60 e 9,09 nmol/g de massa fresca e congelada, respectivamente, e sem diferenças significativas entre estes valores. Os níveis de GSSG foram maiores nas massas fresca e congelada quando comparados àquele na farinha, provavelmente devido à oxidação de GSH durante a mistura e congelamento. O método desenvolvido apresentou simples preparação dos extratos, curto tempo de migração dos analitos (2-3 min.) e alta performance analítica (especificidade na detecção, linearidade, repetitividade e reprodutibilidade na concentração dos analitos).

Palavras-chave: glutathiona, glutathiona dissulfeto, farinha de trigo, massa de pão, eletroforese capilar, absorção ultravioleta.

ABSTRACT

Determination of glutathione and glutathione disulfide in wheat flour and fresh and frozen doughs by capillary electrophoresis

Methods for capillary zone electrophoresis (CZE) using ultraviolet detection (UV) were developed for quick and sensitive separation of glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) in wheat flour, fresh and frozen doughs. The flour sample was characterized by physico-chemical, microscopic and rheological (gluten strength) analyses. The extracts were diluted in centrifuged, ultra filtrated (Microcon, cut-off 3000 kDa), freeze dried and reconstituted in 20 mM bicarbonate buffer (pH 6.0). The analyses were done in a Beckman P/ACE MDQ system equipped with UV detector at 200 nm. The minimum quantification limits were 5 and 15 μM for GSSG and GSH respectively. The method showed good linear correlation and the correlation coefficients (r) were 0,9977 for GSH and 0,9994 for GSSG ($p < 0,005$). Glutathione and glutathione disulfide concentrations in flour samples were 21,86 and 26,90 nmol/g flour respectively. Only GSSG was found in dough samples, equivalent to 10,60 e 9,09 nmol/g fresh and frozen dough, respectively, and without significant differences among them. GSSG levels were higher in fresh and frozen doughs than in flour, probably because GSH oxidation during mixing and freezing. The new method showed easy extract preparation of the samples, short migration time of analytes (2-3 min.), high analytical performance (it's specified to detect GSH and GSSG and has good linearity, repeatability and reproducibility).

Key words: glutathione, glutathione disulfide, wheat flour, dough, capillary electrophoresis, ultraviolet detection.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

¹ Parte desta revisão foi submetida à revista “Boletim do CEPPA” em maio de 2005, intitulada “Efeitos do congelamento e dos ciclos de gelo-degelo em massas de pão”. Artigo aceito em maio de 2006.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as necessidades dos consumidores percebidas globalmente, destacam-se os produtos práticos, saudáveis e inovadores, principalmente ingredientes congelados para assar/cozinhar, como as massas de pão congeladas (ACNielsen, 2002).

Há uma tendência de crescimento na indústria de panificação para produzir grandes volumes de massa que seriam congelados e estocados para posterior cozimento. Esta estratégia oferece duas vantagens principais: um único padeiro pode produzir todas as massas em um certo período e estas bateladas de massa assam durante o dia. A mesma frescura e atratividade dos aromas de padaria são oferecidos ao consumidor (KENNEDY, 2000).

Na maioria das padarias, o pão é produzido numa unidade central e comercializado em diversos pontos de venda. O mercado para produtos de panificação congelados tem crescido rapidamente e, no Brasil, ainda trata-se de uma tecnologia recente e pouco estudada (GUTKOSKI et al., 2005).

As maiores deficiências dos pães congelados são: baixo volume (AUTIO E SINDA, 1992; GÉLINAS; LAGIMONIERE E DUBORD, 1993; HOLMES E HOSENEY, 1987), estrutura do miolo aberta e mais firme (BERGLUND E SHELTON, 1993), tempo de fermentação excessivamente longo, razoável qualidade do produto por apenas algumas semanas. O potencial de panificação da massa decresce substancialmente com o tempo de armazenamento (BERGLUND; SHELTON E FREEMAN, 1991; BERGLUND E SHELTON, 1993; HSU; HOSENEY E SEIB, 1979a; RÄSÄNEN; HÄRKÖNEN E AUTIO, 1995; VAN DAM E HILLE, 1992) e com os ciclos de congelamento e descongelamento parciais, que podem ocorrer durante a distribuição, transporte e armazenamento do produto (HSU; HOSENEY E SEIB, 1979b; INOUE E BUSHUK, 1991, 1992; INOUE; SAPIRSTEIN E BUSHUK, 1995). Tais desvantagens têm sido minimizadas, devido ao enorme avanço na qualidade de produtos de panificação e aprimoramento das formulações, da tecnologia de processo e da metodologia de congelamento (JACKEL, 1991), assim como dos tipos de levedura (GÉLINAS; LAGIMONIERE E DUBORD, 1993; MERIC et al., 1995), de farinha (INOUE E BUSHUK, 1992), de agentes oxidantes (HSU; HOSENEY E SEIB, 1979a) e conservantes (KNIGHTLY, 1988).

A produção de pães a partir de massas congeladas possui qualidade inferior, principalmente quanto ao volume, quando comparada com os pães elaborados a partir de massas frescas. Uma das causas da redução do volume é a presença de substâncias redutoras na massa. Com a morte das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) durante o congelamento,

pode ocorrer liberação destas substâncias, como glutathiona (GSH) e glutathiona dissulfeto (GSSG) (INOUE E BUSHUK, 1991; INOUE et al., 1994), que causam o enfraquecimento das massas, devido à clivagem das ligações dissulfeto entre as proteínas da farinha (REED E PEPLER, 1973). Como a perda da força da massa pode ser explicada pela mudança na estrutura do glúten - rede de proteínas que tem a capacidade de reter CO₂ durante a fermentação (NICOLAS et al., 2003), esta redução das proteínas, provoca menor retenção de CO₂, aumenta o tempo de fermentação e, conseqüentemente, diminui o volume do pão.

Assumindo que GSH e GSSG podem afetar as propriedades reológicas das massas de pão, principalmente congeladas, os objetivos deste trabalho foram:

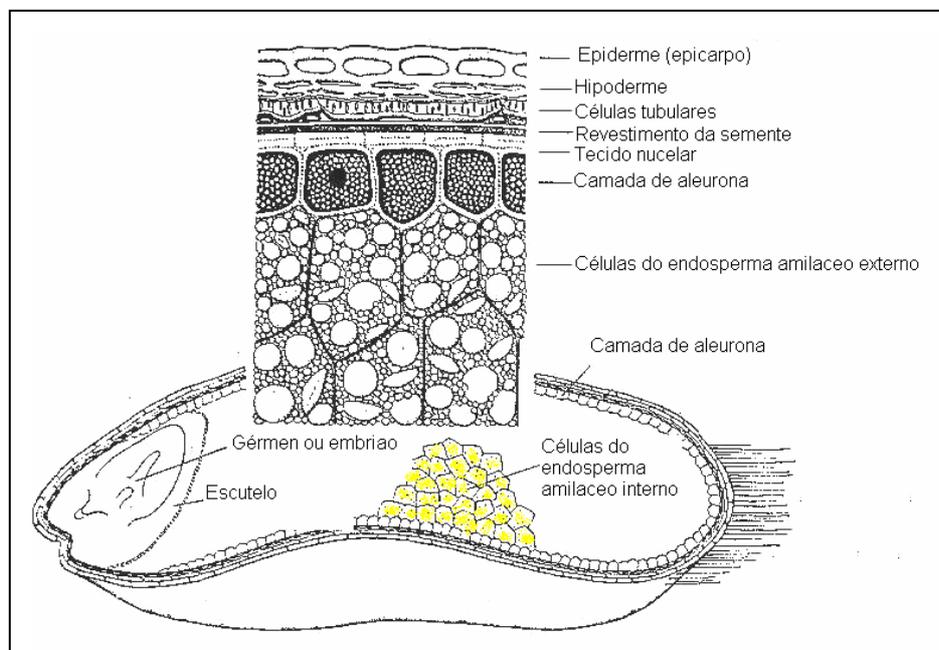
- otimizar um método quantitativo de eletroforese capilar rápido, simples e confiável para determinar GSH e GSSG, simultaneamente, usando detecção por absorção ultravioleta (UV) em farinha de trigo e seus produtos fermentados (massa de pão fresca e congelada);
- determinar os seguintes parâmetros para o método: tamanho do capilar, solução tampão para preparação dos extratos e para corrida no capilar, pressão e tempo de injeção da amostra, voltagem, temperatura do termostato para o capilar e corrente elétrica de análise;
- verificar se houve diferenças nas concentrações de GSH e GSSG entre as diferentes amostras: farinha de trigo, massas de pão fresca e congelada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Trigo

O trigo (*Triticum*) é, desde a pré-história, o mais importante dos cereais, devido a sua adaptação a todo tipo de solo e a diferentes climas. Do ponto de vista comercial, apenas são importantes as espécies: *Triticum vulgare* e *Triticum durum*, sendo que a primeira é utilizada para produzir farinha e a segunda é empregada, fundamentalmente, como sêmola para fabricação de massas alimentícias (QUAGLIA, 1991).

O grão de trigo (cariópse) é composto pelo tecido nucelar, endosperma e germe (Figura 1). Destes componentes, o endosperma é o que tem maior influência na panificação, devido aos seus teores de proteínas e amido. O endosperma compreende o endosperma amiláceo (70-80 % do grão) e a camada de aleurona (rica em proteínas e com grandes quantidades de lipídios, enzimas e vitaminas). As proteínas de aleurona, sendo aproximadamente metade delas hidrossolúveis (globulinas e albuminas), carecem das propriedades panificáveis do trigo. O embrião ou germe se une ao endosperma pelo escutelo e é rico em enzimas e lipídios (BELITZ E GROSCH, 1997).



Fonte: BELITZ, GROSCH (1997).

Figura 1. Secção longitudinal do grão de trigo

As células do endosperma são preenchidas com grânulos de amido imersos numa matriz protéica. Para a produção de farinha de trigo, esta ligação entre amido e proteínas, mantida por uma proteína hidrossolúvel, pode ser amenizada com adição de água. A principal proteína de armazenamento do trigo é o glúten (HOSENEY, 1994).

De acordo com o conteúdo protéico, o trigo pode ser classificado como duro ou forte e macio ou fraco. No primeiro há forte adesão, sendo que a proteína cobre e adere muito bem à superfície do amido. No trigo mole, estes componentes têm aparência semelhante, mas a proteína não cobre a superfície do amido. A união proteína-amido se rompe facilmente, devido à fraca adesão entre eles. Durante a moagem, o endosperma vítreo do trigo duro tende a se quebrar entre as células, produzindo uma farinha granular ao toque e que escoia livremente. O endosperma branco, farináceo, do trigo macio tende a pulverizar-se, sendo deixadas poucas células inteiras ou mesmo nenhuma (GRISWOLD, 1972; HOSENEY, 1994).

O endosperma do trigo varia em textura (dureza) e aparência (qualidade de vítreo). Geralmente, trigos duros com alto teor protéico tendem a ser vítreos e trigos moles de baixo teor protéico, a ser opacos. A dureza é causada por uma força controlada geneticamente das ligações entre proteína e amido no endosperma e o mecanismo de controle parece ser a quantidade de proteína na amostra. Trigos duros (para pão) têm sido selecionados pela alta absorção de água (HOSENEY, 1994).

2.1.1 Farinha de trigo

A farinha de trigo mole é mais macia ao toque do que a feita com trigo duro e tende a aglomerar-se, como o talco. A importância desta diferença está nas qualidades para assar, uma vez que a farinha de trigo duro é especialmente indicada para preparar pão e a de trigo mole é melhor para produtos de confeitaria (bolos, pastelaria, biscoitos). A superioridade da farinha de trigo duro para elaborar pães deve-se a grande quantidade e a boa qualidade do glúten que a farinha forma quando misturada com água. O trigo *durum* é extremamente duro e de alto conteúdo protéico e sua farinha é indicada para fabricar macarrão e espaguete (GRISWOLD, 1972).

A farinha de trigo resulta da moagem de grãos de trigo, que tem por objetivo quebrar o grão, retirar o máximo de endosperma (livre de farelo e germe) e reduzi-lo à farinha. Esta separação é possível em função das diferentes propriedades físicas do farelo, germe e endosperma. O farelo é resistente devido ao seu alto conteúdo de fibra, enquanto o endosperma é friável. O germe forma flocos ao passar entre os rolos de redução, por causa do

alto conteúdo de óleo. As partículas das várias partes do grão também diferem em densidade, facilitando sua separação com o uso de correntes de ar (GUTKOSKI, ANTUNES E ROMAN, 1999).

O processamento do trigo envolve as etapas de recepção e estocagem dos grãos, limpeza, moagem seca, peneiragem, purificação e embalagem da farinha. Após a limpeza dos grãos para remover as impurezas (partículas metálicas, pedras, materiais estranhos), procede-se o acondicionamento, que utiliza calor e água e separa o farelo do endosperma pela diferença de friabilidade. A adição de água até o nível ótimo de umidade enrijece o farelo e amacia o endosperma, como dito anteriormente, separando o amido da matriz protéica (HOSENEY, 1994; GUTKOSKI, ANTUNES E ROMAN, 1999).

A farinha branca de trigo contém aproximadamente 70 % das proteínas totais e 80 % do amido dos grãos iniciais (CHEFTEL, CUQ E LORIENT, 1989) e, ao misturar-se com a água, forma uma massa viscoelástica coesiva que se pode amassar (BELITZ E GROSCH, 1997). Além das proteínas do glúten, importantes para a panificação, a farinha de trigo contém gomas (pentosanas solúveis e insolúveis em água), que têm notável efeito sobre as propriedades de panificação das farinhas de trigo e de centeio, porque aumentam o volume e melhoram a uniformidade das células de gás, as características do miolo e a elasticidade do pão (HOSENEY, 1994). O amido é substrato para as amilases durante o processo de fermentação, produzindo açúcares para a fermentação pelas leveduras e sendo um reservatório para absorção de água e um diluente para o glúten, o que contribui para as ótimas propriedades viscoelásticas da massa (SANDSTEDT, 1955 apud KUSUNOSE; FUJII E MATSUMOTO, 1999).

No Brasil estão instalados aproximadamente 191 moinhos de trigo, sendo que 72 % estão localizados na região sul. A região sudeste é a maior produtora de farinha (42 % da produção do país), seguida pela região sul (31 %) e 55 % da farinha produzida é destinada à panificação (PROPAN, 2004 e 2006).

2.1.2 Glúten

O glúten possui as proteínas de armazenamento do grão de trigo, que são facilmente isoladas na forma relativamente pura, devido a sua insolubilidade em água (HOSENEY, 1994). Esta fração pode ser separada da farinha através da adição de água até formar uma massa dura e amassamento sob água corrente para retirar outros constituintes, principalmente

o amido. O glúten úmido é uma massa coesa e elástica que se expande quando assada, resultando numa bola porosa e leve (GRISWOLD, 1972).

Quando a farinha é misturada com água, forma-se uma massa viscoelástica e coesiva, devido ao glúten, que consegue reter o gás produzido durante a fermentação ou liberado por substâncias químicas (HOSENEY, 1994). Os grupos reativos do glúten, envolvidos nas mudanças que, provavelmente, ocorrem durante a oxidação e redução, estão presentes nos aminoácidos contendo enxofre (cisteína, cistina e metionina) (GRISWOLD, 1972).

O glúten é um complexo de proteína-lipídio-carboidrato com a seguinte composição: proteínas (75%); carboidratos (15%); lipídios (6%) e minerais (0,8%). Suas proteínas representam 80% das proteínas totais dos grãos e compreendem duas classes: gliadinas, que pertencem à classe das prolaminas (solúveis em álcool etílico) e gluteninas, da classe das glutelinas (solúveis em ácidos e bases diluídos) (HOSENEY, 1994; SGARBIERI, 1996).

Gliadina e a glutenina fortemente hidratadas formam uma massa elástica chamada glúten, principal responsável pelas propriedades mecânicas da massa. Pode-se expressar a qualidade de uma farinha quanto a sua capacidade para formar um produto final com excelentes características organolépticas, como sabor e odor, de bom valor nutritivo e custo competitivo (QUAGLIA, 1991).

As gliadinas têm em média M_r (massa molar) aproximadamente de 40000 e são constituídas de cadeia simples. Tornam-se extremamente viscosas quando hidratadas, têm pequena ou nenhuma resistência à extensão e parecem ser responsáveis pela coesividade da massa (HOSENEY, 1994). Possuem teores excepcionalmente elevados de ácido glutâmico (38-56%, em sua maioria na forma de glutamina), prolina (15-30 %) e fenilalanina e baixo conteúdo de aminoácidos básicos - lisina, arginina e histidina (WONG, 1995).

As gluteninas são um grupo heterogêneo de proteínas, com cadeias ramificadas e M_r variável de 100000 a vários milhões (M_r média é ao redor de 3 milhões). Fisicamente são elásticas, mas predispostas à ruptura. Aparentemente fornecem à massa sua resistência à extensão (HOSENEY, 1994). Apresentam polimorfismo mais acentuado que as gliadinas, devido à tendência de associar-se através de interações hidrofóbicas, de ligações de hidrogênio e uniões intermoleculares dissulfeto (CHEFTEL, CUQ E LORIENT, 1989).

O rápido decréscimo da viscosidade da glutenina mediante a clivagem das ligações dissulfeto e a sensibilidade da massa panificável a reagentes que as atacam, são evidências de que estas ligações intermoleculares são importantes na determinação das propriedades da glutenina (SGARBIERI, 1996).

Gliadinas e gluteninas estão caracterizadas pelo alto conteúdo de glutamina (40-45%) e nitrogênio. As proteínas do glúten estão pouco carregadas a um pH próximo da neutralidade e as interações eletrostáticas não têm papel determinante na formação da rede protéica do glúten durante a panificação. O elevado conteúdo de glutaminas induz a pensar que a formação de ligações hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas ou com as moléculas de água é quantitativamente importante. Isto explica a capacidade de absorção de água, assim como as propriedades de coesão e adesão do glúten (CHEFTEL, CUQ E LORIENT, 1989).

2.2 Leveduras

2.2.1 Identificação

Em 1938, Meyen arbitrariamente designou três tipos de espécies de levedura: *S. cerevisae*, *S. vini* e *S. pomorum*, para identificar, respectivamente, levedura da cerveja e leveduras que fermentam suco de uva e suco de maçã (REED E PEPPLER, 1973). As leveduras são um grupo particular de organismos unicelulares caracterizados pela capacidade de transformar os açúcares mediante mecanismos redutores (fermentações) ou também oxidantes (QUAGLIA, 1991).

O conteúdo principal da parede celular de *S. cerevisae* isolada é: 83% de carboidratos, 10% de proteínas, 3% de lipídios, 0,45% de esterol, 0,3% de ácido ribonucléico e 0,04% de ácido desoxirribonucléico (REED E PEPPLER, 1973).

2.2.2 Fermentação

As enzimas que estão presentes na farinha e no malte transformam o amido em maltose ou dextrose, que, junto com a sacarose, são transformados pelas enzimas das leveduras em glicose e frutose. Pela ação da enzima zimase, estes açúcares se transformam em gás carbônico e álcool etílico, em diversos aldeídos, cetonas e outros álcoois e compostos aromáticos (QUAGLIA, 1991) (Figura 2).

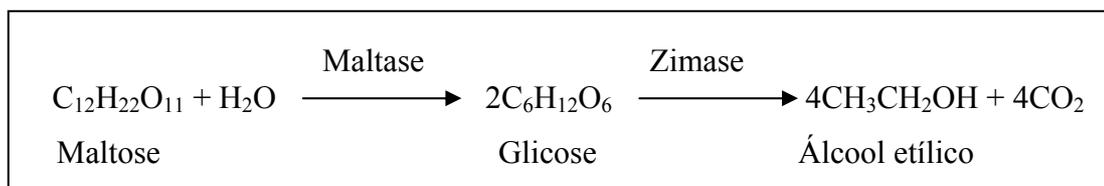


Figura 2. Reação biológica para a obtenção de álcool etílico e CO₂

Leveduras se multiplicam em massas de pão se a concentração inicial de levedura for baixa e se for concedido tempo suficiente durante o período de fermentação. Isto significa que é possível propagar a levedura indefinidamente inoculando uma massa fresca com um pouco de massa anteriormente fermentada (REED E PEPPLER, 1973). A melhor faixa de temperatura para a fermentação é de 27-29 °C, já que temperaturas superiores a 35 °C retardam este processo e as células das leveduras são destruídas em temperaturas mais elevadas (GRISWOLD, 1972).

Quando leveduras são adicionadas à massa, são oferecidas condições para que saiam de seu estado de latência e se tornem ativas. A levedura é um organismo versátil, que pode produzir CO₂ em condições aeróbicas e anaeróbicas. No início, o oxigênio da massa é consumido rapidamente pelas leveduras, produzindo CO₂. Depois o processo de fermentação torna-se anaeróbico, levando ao baixo crescimento das leveduras (DE BONA, 2002).

O CO₂ é retido na massa em duas fases: em forma de gás (dentro das células gasosas) e dissolvido na fase aquosa. A quantidade de CO₂ na massa completamente madura é somente 45 % do total produzido pela fermentação. Durante a mistura, a modelagem e o descanso, a vaporização do etanol e de certa quantidade de água contribuem para a expansão da massa, devido ao seu aquecimento (HOSENEY, 1994).

O fermento mais utilizado pelas padarias é do tipo fresco ou seco instantâneo, originado da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que, industrialmente, é produzido a partir do melão, usando-se culturas de leveduras adequadas para a reprodução (DE BONA, 2002). Métodos que determinem a quantidade de CO₂ formado podem avaliar a atividade da levedura, seja por medição do seu volume (à pressão constante) ou sua pressão (a volume constante) (REED E PEPPLER, 1973).

Aparentemente, muitos fatores estão envolvidos nas propriedades reológicas da massa, como a simples hidratação do amido e do glúten, que não são dependentes das leveduras. Outros são imediatamente associados com a fermentação de leveduras: redução do pH, devido em parte ao CO₂ dissolvido na água da massa; efeito do álcool formado pela levedura na

tensão interfacial de várias fases da massa; processo físico da massa devido à expansão do CO₂; enfraquecimento de reações catalisadas por enzimas de leveduras envolvendo ligações sulfidríla e dissulfeto de proteínas da farinha (REED E PEPPLER, 1973).

O estabelecimento de uma estrutura de glúten coesiva, elástica e impermeável nas massas é extremamente importante. A extensão na qual o CO₂ “escapa” da massa é um determinante da efetividade do sistema de fermentação da levedura (REED E PEPPLER, 1973).

O enfraquecimento da massa é freqüentemente referido como um efeito proteolítico, mais propriamente devido à ação completa de redutases da levedura ou da glutathiona contida na mesma. Estes compostos redutores clivam as ligações dissulfeto internas das proteínas da farinha e enfraquecem as massas (REED E PEPPLER, 1973), sendo que GSH tem efeito substancial e GSSG tem um efeito similar, mas mais fraco.

A glutathiona tem um importante papel como antioxidante celular. Muitas condições patológicas causam um decréscimo na concentração de glutathiona intracelular e seu papel antioxidante pode ser mantido pela célula quando GSSG é reduzida a GSH através da atividade da glutathiona redutase (PACKER, 1995 apud ZIELIŃSKI et al, 1999) (Figura 3).

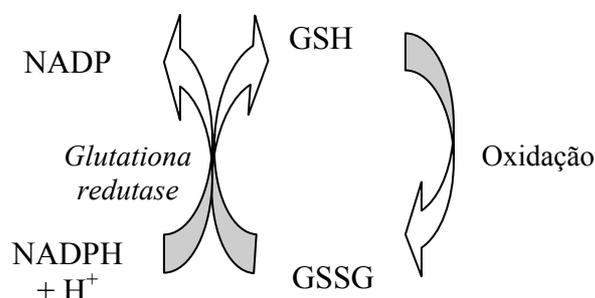


Figura 3. Ilustração esquemática da interconversão das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) da glutathiona

A levedura contém GSH e, com levedura ativa seca, o extravasamento de GSH dentro da massa é de importância considerável. A baixas temperaturas de reidratação, mais GSH é lixiviada das células e, nestas condições, a massa pode se tornar grudenta e muito mais difícil para manusear em equipamentos mecânicos. Este efeito de GSH pode ser contrabalançado pelo aumento da oxidação (REED E PEPPLER, 1973).

2.3 Massas fermentadas de trigo

Tradicionalmente, a elaboração de pães tem sido um processo demorado, sendo sua maior parte realizada à noite. Além disso, os produtos panificáveis são altamente perecíveis e a sua atratividade declina rapidamente dentro de poucas horas após saírem do forno. Esses produtos estão sujeitos à contaminação e crescimento microbiano durante a estocagem, pois apresentam alta atividade de água, superior a 0,9. O uso de conservantes retarda esse crescimento na superfície, porém por no máximo 7 a 10 dias (FRANCISCHI; ORMENESE E PIZZINATTO, 1998).

A procura por produtos de panificação tem crescido muito, devido à conveniência como produto pronto para consumo, custo competitivo, disponibilidade de produtos variados com diferentes sabores e texturas, benefícios nutricionais e vida útil longa. Os pães são predominantes entre todos os produtos de padaria disponíveis no mercado do mundo todo (AZIZI; RAJABZADEH E RIAHI, 2003).

No Brasil, o segmento da panificação representa um faturamento anual de cerca de US\$ 25 bilhões, sendo que a mão-de-obra direta empregada pelo setor é de 580 mil. Está entre os seis maiores segmentos industriais no país e participa com 36,2% das indústrias de produtos alimentares e 7% da indústria de transformação. O consumo de pão no país é de 27 kg/capita/ano, correspondendo aproximadamente à metade da porção recomendada por organismos mundiais de alimentação: 60 kg/capita/ano pela OMS – Organização Mundial da Saúde e 50 kg/capita/ano pela FAO – *Food Agricultural Organization*. Dentre as tendências neste setor, destaca-se a utilização do congelamento nas padarias industriais (ABIP, 2004; PROPAN, 2006).

2.3.1 Massas de pão frescas

O pão fresco apresenta crosta crocante e com atraente cor parda, agradável aroma de assado, finas características de fatiamento, textura macia e elástica e sensação úmida na boca. Tem curta vida-de-prateleira e ocorrem alterações físicas e químicas durante sua armazenagem, conhecidas como envelhecimento do pão. O pão perde qualidade gradualmente: reduz frescor e crocância, aumenta a firmeza e a rigidez do miolo, surge o “gosto de pão amanhecido” e desaparece o aroma agradável (GIANNOU, KESSOGLOU E TZIA, 2003).

A fórmula mínima para a produção de pão é: farinha, levedura, sal e água (HOSENEY, 1994) e seu processamento pode ser dividido em três operações básicas: formação da massa, fermentação e cozimento. O procedimento mais simples de se elaborar pão é misturar todos os ingredientes da receita e amassar até o desenvolvimento desejado.

O glúten é o responsável por formar a estrutura do pão e, por isso, sua quantidade e qualidade são de grande importância. Geralmente é preferível uma farinha altamente protéica, obtida de trigo duro, porque produz pães de maior volume e de boa qualidade (GRISWOLD, 1972). O conteúdo protéico recomendado é de 10,5 e 12,0% para a produção de pão francês convencional (AUTRAN, 1989).

A grande absorção de água pela farinha de trigo duro (proteína = 11,5 a 13,5 %) significa um elevado rendimento do pão. Esta farinha tem a vantagem de tolerar a alta fermentação, o que produzirá um bom pão dentro de um período mais amplo de fermentação em relação à farinha de trigo mole ou de classificação inferior (GRISWOLD, 1972; HOSENEY, 1994).

O desenvolvimento da massa pode ser explicado pela formação de um sistema contínuo com ligações dissulfeto covalentes de moléculas protéicas distintas, através de ligações tiol-dissulfeto. A continuidade do sistema depende das ligações não-covalentes, como ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e ligações entre cadeias (BLOKSMA, 1990b).

A ligação entre as proteínas do glúten tem influência nas propriedades da massa e, conseqüentemente, nos produtos panificáveis. Tradicionalmente, as ligações dissulfeto são o único tipo de ligação considerado entre as proteínas em massas de pão (KAUFMAN, HOSENEY E FENNEMA, 1986) entretanto, ligações não-dissulfeto, especificamente introduzidas pela enzima transglutaminase, também podem influenciar as propriedades da massa (GERRARD et al, 2001). O uso de transglutaminase microbiana é recomendado para farinhas com glúten fraco e pobre performance de panificação e sua adição à farinha reduz a extensibilidade do glúten e aumenta a resistência à extensão (BAUER et al, 2003).

Na produção da massa de pão, os grupos sulfidril livres do glúten tendem a se oxidar durante a mistura da massa, transformando-se em ligações dissulfeto. Efeito semelhante obtém-se adicionando agentes oxidantes (bromato de potássio) à farinha, assim como acontece com o envelhecimento da farinha, melhorando as propriedades reológicas do glúten – aumenta a dureza e elasticidade da massa (CHEFTEL, CUQ E LORIENT, 1989; SGARBIERI, 1996).

De acordo com Jackel (1991), os melhores resultados são obtidos quando a massa é preparada pelo método direto, adicionando o sal no final da mistura e mantendo a temperatura

em torno de 17 a 18° C durante o processo, até o completo desenvolvimento da massa. A temperatura da massa fresca após a mistura é geralmente de 24-26° C e na produção de massas congeladas, esta temperatura cai para 19-22° C, o que minimiza a atividade da levedura antes do congelamento (KENNY, GRAU E ARENDT, 2001).

A mistura da massa tem três funções: homogeneização dos ingredientes, desenvolvimento da massa e oclusão de gás. A homogeneização consiste na mistura de todos os ingredientes para formar a massa (HOSENEY, 1994). No desenvolvimento, a massa retém o CO₂ produzido pelas leveduras durante a fermentação e, durante o primeiro estágio de cozimento, a massa expande, através da evaporação de CO₂, água e etanol com a elevação da temperatura. Em temperaturas superiores a 60°C ocorre a gelatinização do amido, que aumenta a viscosidade da massa (BLOKSMA, 1990a). Grânulos de amido gelatinizado são utilizados em indústrias de panificação para produzir pães do tipo macio (NAITO et al, 2004).

Durante a homogeneização, o tempo de mistura tem efeito sobre a massa e seu aumento provoca elevação da temperatura da massa e afeta a rede de glúten. Temperaturas mais baixas formam uma massa mais dura e um bastão mais curto e o tempo de mistura comprime a rede de glúten (ROUILLÉ, LE BAIL E COURCOUX, 2000).

A aparência e a textura final do pão dependem das bolhas formadas na massa, criadas durante os processos de descanso e cozimento. Controlando a distribuição do tamanho das bolhas antes da fase de descanso, é possível controlar a textura final do miolo do pão (MARTIN, 2004).

Na reologia, a qualidade das massas de glúten pode ser determinada pelos parâmetros G' (módulo de armazenamento), G'' (módulo de perda) e $\tan \delta$ (G''/G'), que dependem da cultivar de trigo. Glúten de farinhas de baixa qualidade são menos elásticos e mais viscosos que os daquelas de boa qualidade (HE E HOSENEY, 1991; JANSSEN et al, 1996).

Em pães produzidos com farinha de trigo integral, o farelo e o germe são responsáveis, pelo menos em parte, pelo menor volume do pão. O germe contém glutatona, um tripeptídeo redutor que contém um grupo sulfidril (-SH) (GRISWOLD, 1972) e que tem um efeito negativo na reologia da massa (WOLT e D'APPOLONIA, 1984a).

2.3.2 Massas de pão congeladas

O maior desafio da indústria de panificação é o armazenamento da massa por um considerável período sem comprometer a sua qualidade final (ESSELINK et al, 2003). Durante a década de 80, a produção de alimentos congelados ocupou espaço proeminente nas

indústrias alimentícias. Segundo Berglund, Shelton e Freeman (1991) mais de 50% das padarias instaladas nas redes de supermercados, nos Estados Unidos, fazem uso de massa congelada. Na panificação, esta tendência ajuda a agregar valor a produtos de trigo, entretanto as massas congeladas originam produtos mais pobres em qualidade do que frescas (BHATTACHARYA; LANGSTAFF E BERZONSKY, 2003; NICOLAS et al, 2003). No Brasil, o congelamento de produtos de panificação é uma tecnologia pouco estudada até o presente momento (FRANCISCHI; ORMENESE E PIZZINATTO, 1998; DE BONA, 2002).

Massas congeladas têm sido vistas como um produto que “resolve problemas”. Como padeiros especialistas estão se tornando escassos, padarias e restaurantes precisam de produtos que exijam menor conhecimento e instrução para a produção. Com massas congeladas, as padarias conseguem produzir pães frescos e de alta qualidade, a custos inferiores (PALMER, 1994). A redução no trabalho e no custo de produção é possível, porque o congelamento da massa permite a fabricação descontínua (SEGUCHI, NIKAIIDOO E MORIMOTO, 2003) e os pães podem ser preparados dentro de um horário normal de trabalho.

A qualidade dos pães congelados é influenciada pela formulação da massa e pelos parâmetros do processo: tempo de mistura, velocidade de congelamento, tempo de estocagem e velocidade de degelo. Estes fatores podem agir independente ou sinergicamente para reduzir a atividade da levedura, o que diminui a produção de CO₂, o dano na rede de glúten, a gradual perda da força da massa, o declínio na retenção de CO₂ e o pobre desempenho de panificação (GIANNOU; KESSOGLOU E TZIA, 2003). A estabilidade da massa congelada depende da qualidade da levedura, dos compostos sulfidríla (SH) liberados destas, da fermentação antes do congelamento e dos ciclos de gelo-degelo (EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996). A produção de massas congeladas aplica um método rápido, “sem-tempo”, para minimizar a fermentação pelas leveduras durante a preparação da massa (INOUE E BUSHUK, 1991).

O congelamento é baseado no princípio físico de separação da água da massa, como resultado da formação de cristais de gelo abaixo de 0 °C (LAAKSONEN E ROOS, 2000). Acredita-se que o dano sobre a massa associado aos processos de gelo-degelo seja induzido pela formação de cristais de gelo (VARRIANO-MARSTON; HSU E MAHDI, 1980).

A qualidade geral do pão assado obtido a partir de massas congeladas diminui gradualmente com o tempo de congelamento (INOUE E BUSHUK, 1991; INOUE; SAPIERSTEIN E BUSHUK, 1995; EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996; HAVET, MANKAI E LE BAIL, 2000; ESSELINK et al, 2003). Duas são as possíveis razões para a perda da qualidade dos pães congelados: o decréscimo no poder de aeração da massa (HSU,

HOSENEY E SEIB, 1979b), devido ao declínio da viabilidade das leveduras; a perda gradual da força da massa ou enfraquecimento da estrutura das proteínas do glúten (VARRIANO-MARSTON, HSU E MAHDI, 1980; BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991; INOUE E BUSHUK, 1991; AUTIO E SINDA, 1992), verificada por microscopia eletrônica e métodos reológicos. Ambos fatores são mais pronunciados com o aumento do tempo de estocagem sob congelamento (EL-HADY, EL-SAMAHY E BRÜMMER, 1999). Havet, Mankai e Le Bail (2000) verificaram que há um sinergismo de efeito da ação velocidade de congelamento na atividade da levedura e na reologia da massa e, portanto, no volume final do pão. Outros fatores podem influenciar as propriedades da massa após o congelamento, como a liberação de componentes com a morte das leveduras (enzimas, agentes químicos como glutatona) (INOUE e BUSHUK, 1991; INOUE et al, 1994).

Massas congeladas são produzidas com os mesmos ingredientes de fabricação de massas frescas, mas é necessário incrementar fermento (4,5 a 6,0%), gordura (4,0 a 6,0%), diminuir água (58,5 a 60,5 %) e a farinha utilizada deve conter maior teor de proteínas (de 12,5 a 13,0%) ou adição suplementar de glúten vital (JACKEL, 1991). Há indicações do uso de leveduras tolerantes ao congelamento na proporção de 6-7 % (KENNEDY, 2000). O conteúdo de proteínas em farinhas para produção de massas congeladas de pão francês deve ser entre 11 e 13 % (NEYRENEUF E VAN DER PLAAT, 1991).

Segundo Rouillé, Le Bail e Courcoux (2000), o tempo de mistura parece ser o maior fator influente no condicionamento da qualidade do pão, em relação ao volume da massa, volume de CO₂ e volume específico do pão. Os melhores resultados são obtidos com o tempo de mistura mais longo (massa completamente desenvolvida). O uso de ingredientes refrigerados (4 °C) aumenta o tempo de mistura e melhora a qualidade dos pães. Após 7 dias de estocagem a – 20° C, sem flutuações de temperatura, a qualidade do sistema de glúten não deteriora (efeito positivo na reologia da massa: redução da elasticidade e aumento da extensibilidade), mas a levedura parece ser sensível à estocagem.

A altura e o peso específico dos pães reduz marcadamente após estocagem da massa por 1 dia a – 20°C em relação à massa não-congelada e não-estocada, mas nenhuma deterioração foi detectada após 3 a 6 dias a – 20 °C em relação ao primeiro dia (SEGUCHI, NIKAIIDOO E MORIMOTO, 2003).

2.3.2.1 Influência do congelamento na rede de glúten

A perda da força da massa pode ser explicada pela mudança na estrutura do glúten, que é a rede de proteínas capaz de reter CO₂ durante a fermentação (NICOLAS et al., 2003). Com o congelamento, dois processos podem ocorrer simultaneamente e mudar a reologia do glúten (BERGLUND; SHELTON E FREEMAN, 1991): 1) crescimento de cristais de gelo podem romper a rede de glúten, provocando danos físicos; 2) desidratação do glúten, devido ao crescimento de cristais de gelo. Ambos fatores podem influenciar a capacidade de retenção de CO₂ (INOUE E BUSHUK, 1991; BOT, 2003).

Os cristais de gelo formados durante a estocagem sob congelamento e os repetidos ciclos de gelo-degelo causam danos físicos na estrutura da proteína do glúten (VARRIANO-MARSTON, HSU, MAHDI, 1980), que enfraquecem as ligações hidrofóbicas, redistribuem a água no sistema de glúten da massa (BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991; RÄSÄNEN et al, 1998), perdem a retenção de gás (AUTIO E SINDA, 1992; BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991) e causam pobre volume final do pão (INOUE E BUSHUK, 1991, 1992). A desuniformidade observada na matriz de glúten poderia reter menos gás, contribuindo para estender o período de repouso e reduzir o volume dos pães de massas congeladas (BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991). A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) sugere a ruptura da massa de pão sem levedura, provocada provavelmente pela recristalização do gelo (RIBOTTA et al, 2004).

Para a formulação de massa congelada, é necessário usar farinha com proteínas de boa qualidade e teor protéico superior ao usado na produção convencional de pão (NEYRENEUF e VAN DER PLAAT, 1991; INOUE E BUSHUK, 1991, 1992; GÉLINAS, DEAUDELIN E GRENIER, 1995; EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996; FRANCISCHI; ORMENESE E PIZZINATTO, 1998; LU E GRANT, 1999b). A qualidade da proteína (força do glúten) é mais importante que a quantidade (INOUE e BUSHUK, 1992). Usa-se também agentes oxidantes (ácido ascórbico), que reagem com o glúten para melhorar a capacidade de retenção de gás na massa e produzir pães com maior volume e melhor textura (WANG E PONTES JÚNIOR, 1994). Durante a mistura, estes agentes convertem os grupos SH das proteínas às ligações SS entre moléculas adjacentes, desenvolvendo a rede de glúten e formando uma massa mais forte (DEMIRALP, CELIK E KÖKSEL, 2000). Assim, o ácido ascórbico reduz a extensibilidade e aumenta a elasticidade da massa (ROUILLÉ, LE BAIL E COURCOUX, 2000).

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de massa de pão congelada (24 semanas), tem se observado que a matriz de glúten fica menos contínua, mais rompida e separada dos grânulos de amido; as fibras do glúten ficam mais finas. Isso poderia explicar a baixa retenção de gás e o decréscimo no volume nos pães resultantes (BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991). Outro estudo mostrou, que após armazenar a massa por 60 dias a -18°C (massas com e sem goma guar e DATEM - ésteres de ácido diacetiltartárico com mono e diglicerídeos), a matriz de glúten foi muito danificada, com fibras mais porosas e finas e menos uniformes. A massa congelada tende à fragmentação, talvez devido à ruptura das fibras de glúten (RIBOTTA et al, 2004). O amido gelatinizado pode compensar essa fragmentação na matriz de glúten danificada (NAITO et al, 2004).

Nemeth, Paulley e Preston (1996) verificaram que a remoção do oxidante (ácido ascórbico) da massa resultou em significativas reduções no volume e escore do pão (características externas/aparência, textura, cor da miolo e escore geral) durante o congelamento. A remoção dos condicionadores (esteroil lactilato sódico - SSL e DATEM) e ácido ascórbico teve um efeito muito maior do que a remoção do oxidante sozinho. Ambos condicionadores têm um efeito de melhoradores de massa congelada (WOLT E D'APPOLONIA, 1984b; INOUE, SAPIRSTEIN E BUSHUK, 1995), provavelmente por agirem como agentes reforçadores, aumentando a estabilidade das massas (WOLT E D'APPOLONIA, 1984b).

Assim, os efeitos adversos em massas congeladas podem ser reduzidos usando farinhas fortes (INOUE E BUSHUK, 1992), adicionando glúten (WANG E PONTES JÚNIOR, 1994) ou agentes fortalecedores (SSL ou DATEM) (WOLT E D'APPOLONIA, 1984b; INOUE, SAPIRSTEIN E BUSHUK, 1995; NEMETH, PAULLEY E PRESTON, 1996). Apesar da recomendação de trigos com glúten forte para a produção de massas congeladas, cultivares com glúten excessivamente forte podem não ter um bom desempenho durante a panificação (LU E GRANT, 1999a). Farinhas com moderada força de glúten e alta capacidade de gelatinização do amido são ideais para manter a integridade da estrutura da massa durante o congelamento e desejável maciez no miolo do pão após assado (BHATTACHARYA, LANGSTAFF E BERZONSKY, 2003).

Parece que a proteína do glúten responsável pelo controle da expansão do volume do pão é a glutenina, que pode ter papel predominante na melhoria da qualidade dos pães de massa congelada (LU E GRANT, 1999b). As gluteninas podem ser alteradas pelos repetidos ciclos de gelo-degelo e despolimerizadas em oligômeros de baixo massa molar, o que seria consistente com o enfraquecimento da massa (INOUE et al., 1994).

Foi verificado que com o aumento do tempo de armazenamento (30 dias a -18°C) há decréscimo na extensibilidade e aumento na resistência máxima (máxima altura da curva obtida no extensógrafo) da massa, o que é atribuído à deterioração geral do sistema de glúten (VARRIANO-MARSTON, HSU E MAHDI, 1980; WOLT E D'APPOLONIA, 1984a). No entanto, Inoue e Bushuk (1991) não observaram mudanças significativas nas propriedades reológicas durante a estocagem por curto tempo, apesar dos repetidos ciclos de gelo-degelo produzirem significativa redução na resistência e aumento na extensibilidade da massa, concordando com os resultados de Lu e Grant (1999a), que armazenaram as massas sob congelamento durante 16 semanas, sem ciclos de gelo-degelo. Inoue e Bushuk (1991) concluíram que as massas feitas com farinhas fortes são geralmente resistentes ao dano do congelamento, mas os repetidos ciclos de gelo-degelo as enfraquecem.

Massas congeladas e estocadas durante 1, 7 e 70 dias e com 3 ciclos de gelo-degelo durante 7 dias mostraram redução na resistência máxima. A extensibilidade permaneceu relativamente constante nesses períodos, exceto para a estocagem de 70 dias, na qual houve aumento significativo (INOUE et al, 1994). Conforme o estudo de Bhattacharya, Langstaff e Berzonsky (2003), a extensibilidade das massas descongeladas não mudou significativamente com o aumento do tempo de estocagem de 0 dia a 4 semanas (36 mm), tendo um pequeno aumento após 12 semanas (37 mm), seguido de um aumento maior na presença de dois ciclos de gelo-degelo (40 mm), o que sugere o enfraquecimento da massa.

O tempo de estocagem sob congelamento (89, 95 e 110 g para 0, 4 e 12 semanas respectivamente) na ausência de ciclos de gelo-degelo aumentou constantemente a resistência máxima das massas (BHATTACHARYA, LANGSTAFF E BERZONSKY, 2003), provavelmente devido ao seu endurecimento (VARRIANO-MARSTON, HSU E MAHDI, 1980; WOLT e D'APPOLONIA, 1984a). Na presença de dois ciclos de gelo-degelo em 12 semanas, as massas tiveram um significativo declínio na resistência máxima (95 g), possivelmente em função da cristalização do gelo (INOUE e BUSHUK, 1992).

O aumento da velocidade de congelamento provoca redução na elasticidade da massa, devido à ruptura de certas ligações do sistema de glúten pela ação mecânica dos cristais de gelo. A maior velocidade de congelamento (3 m/s) produz o maior dano (HAVET, MANKAI E LE BAIL, 2000). O congelamento da massa e sua estocagem sob congelamento provocam redução na firmeza e na elasticidade da massa (LU E GRANT, 1999a; RIBOTTA et al, 2004). Nem DATEM nem goma guar conseguem evitar os efeitos do congelamento da massa nos parâmetros reológicos (G' e G^* - módulo complexo), nem o dano na ultraestrutura (RIBOTTA et al., 2004). O congelamento e a estocagem reduzem G' e G^* , o que evidencia

redução na firmeza e na elasticidade da massa e indica o enfraquecimento da rede de glúten, que poderia resultar da liberação de substâncias redutoras a partir das leveduras. Massas não-fermentadas antes do congelamento são mais elásticas do que as fermentadas, que ficam ainda mais viscosas com o aumento do tempo de fermentação (RÄSÄNEN, HÄRKÖNEN E AUTIO, 1995).

O glúten vital supera o efeito desestabilizador do congelamento, aumentando a força de uma farinha relativamente fraca, especialmente com adição de 2 %. Isto apenas reduz o tempo de fermentação em relação à massa sem adição de glúten, mas não impede a perda de atividade da levedura com o congelamento, que provoca redução gradual da produção de gás e aumento do tempo de fermentação (WANG E PONTES JÚNIOR, 1995).

2.3.2.2 Influência do congelamento na ação da levedura

O ingrediente mais estudado na produção de massas congeladas tem sido a levedura, por ser responsável pela produção de gás necessário para o desenvolvimento da massa e características de sabor e aroma pão. A formulação da massa, a concentração, a estabilidade, a linhagem, a perda de atividade da levedura e os ciclos gelo-degelo da massa têm se destacado nos estudos. A escolha da linhagem das leveduras e a otimização do processo são pontos críticos para a produção de massas congeladas com aceitável vida-de-prateleira (FRANCISCHI, ORMENESE E PIZZINATTO, 1998).

A viabilidade da levedura é fortemente afetada pela velocidade de congelamento (NEYRENEUF E DELPUECH, 1993; HAVET, MANKAI E LE BAIL, 2000), tempo de estocagem (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979b; BERGLUND E SHELTON, 1993; INOUE et al., 1994) e ciclos de gelo-degelo (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979b; INOUE et al., 1994). Para minimizar estes efeitos utiliza-se maior quantidade de levedura nas massas congeladas, processo “sem-tempo”, baixas temperaturas de fabricação e congelamento rápido (NEMETH, PAULLEY E PRESTON, 1996).

O congelamento da levedura na massa resulta numa redução mais significativa na sua atividade do que o congelamento direto da levedura prensada (HAVET, MANKAI E LE BAIL, 2000). O congelamento à velocidade mais baixa é melhor para preservar a atividade da levedura (NEYRENEUF E DELPUECH, 1993), que é sempre maior na superfície do que no centro da massa. As diferenças na atividade da levedura no interior da massa podem ocorrer devido à variação na velocidade de congelamento e à cristalização do gelo (HAVET, MANKAI E LE BAIL, 2000). Contrariamente, observou-se que a maior produção de CO₂

pela levedura foi obtida da massa congelada a alta velocidade de ar (3 m/s) a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ após 3 horas, mas o congelamento por 7 dias aumentou a depressão na produção de gás, indicando redução na atividade da levedura. A aplicação de ciclos de gelo-degelo (1-3) por 4 semanas reduziu ainda mais a produção de gás (EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996).

O congelamento provoca a perda da viabilidade das células de levedura, que tem sido atribuída ao congelamento intracelular e ao aumento da concentração interna de solutos, o que causa efeitos como: baixo pH, desidratação, toxicidade iônica, danos nos processos essenciais de membrana e nos elementos do citoesqueleto e redução da atividade de enzimas glicolíticas (MYERS E ATTFIELD, 1999). É preferível evitar que a levedura seja ativada antes do congelamento, pois os maiores danos à levedura seriam provocados pelos produtos da própria fermentação (WATANABE E BENASSI, 2000). Isso também reduz espaço na estocagem e no transporte das massas congeladas (DE BONA, 2002).

Recomenda-se o rápido manuseio da massa a baixas temperaturas para minimizar a atividade da levedura antes do congelamento. Os principais problemas dependentes da levedura e que devem ser solucionados são: manutenção da viabilidade (sobrevivência) e da atividade fermentativa (poder de formação de gás) das células durante o congelamento. O congelamento e o armazenamento de massas congeladas sem pré-fermentação não afetam a viabilidade, mas reduzem bastante a produção de gás (MERIC et al, 1995).

Segundo Räsänen, Härkönen e Autio (1995), o tempo de pré-fermentação afeta a estabilidade da massa nos ciclos de gelo-degelo, sendo que menores tempos de fermentação favorecem maiores volumes finais dos pães. Nas massas congeladas, a fermentação completa (40 min.) reduziu o seu volume em 15 %, na média, em relação ao volume dos pães de massa fresca, enquanto a fermentação interrompida (25 min.) reteve ou aumentou de 3 a 13 % este volume. O volume foi mais afetado pelo tempo de fermentação do que pela qualidade da farinha. Mesmo após 2 semanas de estocagem a -20°C , pães de fermentação interrompida tiveram melhor forma que os de fermentação completa e estocados por 1 dia.

A pré-fermentação é prejudicial à produção de gás pelas leveduras, pois a maior estabilidade das massas congeladas neste caso decorre do estado de latência das leveduras. Massas congeladas após fermentação formam pães de qualidade inferior e mais suscetíveis aos danos do congelamento (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979a).

O enfraquecimento da massa, após ciclos de gelo-degelo, pode ocorrer devido ao aumento da concentração de substâncias redutoras lixiviadas das leveduras, que provocam a redução das proteínas do glúten ou a redistribuição da água, causada pela mudança da capacidade de absorção de água pela farinha (INOUE E BUSHUK, 1991; INOUE et al, 1994;

EL-HADY, EL-SAMAHY E BRÜMMER, 1999). Autio e Sinda (1992) defendem que as mudanças estruturais nas massas submetidas a ciclos de gelo-degelo podem não estar associadas à liberação de substâncias redutoras pelas leveduras, mas ao enfraquecimento da rede de glúten (WOLT E D'APPOLONIA, 1984a).

O armazenamento prévio da levedura a 4°C, por três semanas, não afeta sua tolerância aos ciclos de gelo-degelo da massa (GÉLINAS, LAGIMONIERE E RODRIGUE, 1994). Por outro lado, este armazenamento pode proteger as células dos danos causados pelo congelamento, melhorando a tolerância aos ciclos de gelo-degelo quando a massa é fermentada antes de ser congelada (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979a).

Mudanças na textura da massa do pão a baixas temperaturas geram água livre, que permite a formação e aumento dos cristais de gelo durante o congelamento e possível rompimento dos sistemas de membrana das leveduras, reduzindo sua viabilidade (VARRIANO-MARSTON et al., 1980; BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991; TAKANO et al, 2002a). Reduzido conteúdo de água na massa limita a água livre durante o congelamento, restringindo a formação de cristais de gelo e seus efeitos negativos na qualidade da massa congelada. A cristalização do gelo afeta particularmente as proteínas, diminuindo as propriedades de retenção de gás da massa (GÉLINAS, DEAUDELIN E GRENIER, 1995). O volume total da massa é maior com menor adição de água, pois reduz a quantidade de água congelável e causa menor efeito dos cristais de gelo no sistema de glúten e nas células de levedura (EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996).

O líquido centrifugado da massa descongelada aumenta com os ciclos de gelo-degelo. A quantidade de água livre nas massas descongeladas aumentou significativamente após 1 dia e levemente após 3 dias e reduziu após 6 dias de estocagem a - 20 °C. Foi observado também que há uma forte correlação entre o aumento do líquido centrifugado das massas congeladas e descongeladas e a redução na altura e no volume específico do pão. Há evidências de que a quantidade deste líquido está altamente relacionada ao sal na formulação e aos produtos da fermentação na massa (SEGUCHI, NIKAIIDOO E MORIMOTO, 2003).

Após o descongelamento da massa, os volumes dos pães submetidos à fermentação a temperaturas inferiores a 32°C foram superiores aos fermentados a 43°C, mesmo que o tempo de fermentação reduza com o aumento da temperatura (HOLMES E HOSENEY, 1987).

Nemeth, Paulley e Preston (1996) verificaram que o volume final e o escore do pão reduziram rapidamente após 8 semanas de congelamento, quando a massa foi fermentada à temperatura de 20-22 °C, 2-3 horas antes do congelamento. Em tempos mais curtos de fermentação (0-1 hora) estes resultados foram muito menos evidentes. Longos tempos de

fermentação afetam a qualidade dos pães de massa congelada devido às perdas do poder de aeração, causados pela redução na viabilidade das leveduras (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979a; HINO, TAKANO E TANAKA, 1987).

A perda de qualidade do pão de massa congelada geralmente é atribuída à redução de volume em relação à massa fresca (INOUE E BUSHUK, 1991, 1992; LU E GRANT, 1999a), o que pode estar relacionado à morte das leveduras durante o congelamento e conseqüente redução na produção de CO₂ e aumento do tempo de repouso da massa (INOUE E BUSHUK, 1992).

Leveduras de interesse tecnológico possuem alta resistência a períodos prolongados de congelamento, atividade fermentativa elevada e baixa sensibilidade a ciclos de gelo-degelo (FRANCISCHI, ORMENESE E PIZZINATTO, 1998). O uso de leveduras tolerantes ao congelamento alivia os danos nas massas congeladas (TAKANO et al, 2002b). Observou-se que um conteúdo de 5-6 % de trealose é o nível máximo a ser usado para melhorar a crioresistência da levedura (MERIC et al., 1995). Trealose é um edulcorante natural (diglicosídeo) encontrado no fermento biológico e usado como crioprotetor (HIGASHIYAMA, 2002).

A crioresistência da levedura é fortemente influenciada pelo tempo de fermentação antes do congelamento, pelas velocidades de gelo e degelo, pelo tempo de permanência sob congelamento e pelas flutuações de temperatura. Para superar a esperada perda de atividade durante o congelamento utiliza-se maior teor de levedura em relação à massa fresca (GIANNOU, KESSOGLOU E TZIA, 2003). Quantidades de leveduras de 3,75 % e 5,00 % nas massas apresentaram resultados semelhantes e menor extensibilidade em relação a quantidades menores (1,25 e 2,5 %), sugerindo que no primeiro caso o açúcar fermentável disponível pode ter sido o fator limitante da produção de gás (INOUE et al, 1994).

Tanto a levedura seca instantânea quanto a prensada apresentam boa funcionalidade em massas congeladas (GÉLINAS, DEAUDELIN E GRENIER, 1995). A primeira produz pães com volumes inferiores aos obtidos com levedura prensada (NEYRENEUF E VAN DER PLAAT, 1991). Contrariamente, observou-se que há menor redução na produção de gás ao utilizar-se 1,8 % de levedura seca instantânea ativa em relação à 4 % de levedura prensada na massa após 12 semanas de estocagem sob congelamento (EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996). Leveduras cremosas (líquidas) e prensadas têm similar poder de aeração, propriedades de manutenção a 4 °C e tolerância aos ciclos de gelo-degelo na massa de pão (GÉLINAS, LAGIMONIERE E RODRIGUE, 1994).

2.3.2.3 Influência do congelamento nos grânulos de amido

Calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma ferramenta útil para estudar as transições de primeira ordem, como a gelatinização e a retrogradação do amido durante o processo de cozimento e armazenamento de produtos de padaria, respectivamente (GIASHI, HOSENEY E VARRIANO-MARSTON, 1983; LEÓN, DURÁN E BARBER, 1997). Segundo estes últimos autores, o congelamento não afeta significativamente a gelatinização do amido, mas aumenta sua velocidade de retrogradação com o armazenamento prolongado para 30 dias (LEÓN, DURÁN E BARBER, 1997).

Utilizando DSC, verificou-se que o congelamento e a estocagem da massa a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ modificaram as propriedades do amido, com leves alterações na sua gelatinização, mas com importante influência na velocidade de retrogradação e na quantidade de amilopectina retrogradada. Em massas congeladas e não-congeladas, a extensão da retrogradação da amilopectina aumentou com a redução da temperatura de armazenamento, sendo esta diferença mais evidente em massas congeladas (RIBOTTA, LEÓN E AÑÓN, 2003). O aumento da entalpia dos amidos após estocagem da massa por 16 semanas sob congelamento, embora pequeno, pode indicar que ocorreu alguma retrogradação dentro dos grânulos de amido durante a estocagem ou descongelamento das massas (LU E GRANT, 1999a).

A entalpia de retrogradação nos géis de amido (50 % de umidade) e pães (30-40 % de umidade) é dependente do conteúdo de água nas amostras durante o armazenamento. A magnitude do pico da fusão da amilopectina é controlada pela disponibilidade de água durante a retrogradação, enquanto que o conteúdo de água durante a gelatinização tem pequeno efeito (ZELEZNAK e HOSENEY, 1986). Lu e Grant (1999a) mostraram que a quantidade de água congelável na massa aumenta com o tempo de estocagem (até a 8ª semana). Coincidentemente, há uma redistribuição da água total presente no sistema durante o armazenamento sob congelamento, no qual há recristalização dos cristais de gelo, que favorece a formação de um número menor de cristais de maior tamanho. Ambos processos (migração da água e recristalização do gelo) poderiam provocar mudanças na estrutura e no arranjo das moléculas de amilose e amilopectina (BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991). Tais mudanças refletiriam na gelatinização e retrogradação do amido (RIBOTTA, LEÓN E AÑÓN, 2003).

2.3.2.4 Processo de congelamento e descongelamento da massa

A massa congelada deve resistir às condições adversas antes de ser forneada, devendo no descongelamento fermentar em um período de tempo aceitável para produzir pão com volume normal e características sensoriais desejáveis (WANG E PONTES JÚNIOR, 1994).

O tipo de congelamento é importante para as massas de pão e a velocidade de congelamento afeta mais suas propriedades do que o tempo de estocagem (EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996). Esta velocidade pode ter dois efeitos opostos: a baixa velocidade previne a morte das leveduras, mas acelera o crescimento de cristais de gelo, que podem danificar a rede de glúten (NICOLAS et al, 2003).

Como a velocidade de congelamento interfere na viabilidade da levedura, o congelamento lento é mais adequado do que o congelamento rápido, porque este último não permite que a água saia da célula, formando cristais de gelo intracelulares que lesionam a parede celular e causam a morte da levedura (HSU; HOSENEY E SEIB, 1979a; PIZZINATTO, 1979).

O congelamento pode ser mecânico (transferência do frio feita por corrente de ar em câmara frigorífica a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou por sistema criogênico (utiliza-se N_2 líquido, atingindo-se temperaturas inferiores a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) (FRANCISCHI, ORMENESE E PIZZINATTO, 1998). Neste último processo o resfriamento é muito rápido e, provavelmente, prejudica a sobrevivência das leveduras, aumentando o tempo de fermentação e reduzindo o volume dos pães após o descongelamento.

As massas congeladas são menos estáveis quando a temperatura de armazenamento é menor que a de congelamento (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979a), sendo recomendadas as temperaturas de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. As células de levedura congelam por volta de $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e temperaturas inferiores devem ser evitadas, pois resultam em massa congelada de baixa qualidade (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979b). Para produção de pão francês indica-se $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o congelamento, com taxa de congelamento de $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (NEYRENEUF E VAN DER PLAAT, 1991). Massas para pão francês produzidas com levedura, congeladas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e estocadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ mantêm as melhores características do pão durante 20 dias, mas são estáveis por três meses, no mínimo (DE BONA, 2002).

O descongelamento deve ser feito antes do descanso da massa, para reidratar as leveduras desidratadas no congelamento. Para tanto, utilizar $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 90-95 %, pois a temperatura elevada danifica menos a levedura que a própria reidratação

(HOLMES E HOSENEY, 1987). O descongelamento de pão francês é feito em câmara a 30 °C e umidade relativa de 85 % (DE BONA, 2002).

Durante a manipulação comercial, as massas podem estar sujeitas a ciclos parciais de gelo-degelo. Assim, quando as massas são descongeladas por 1 hora à temperatura ambiente antes do recongelamento, ocorre um significativo decréscimo nos volumes finais dos pães. Quanto mais ciclos, maior é a perda de volume (HSU, HOSENEY E SEIB, 1979b). Contrariamente, pode não ocorrer diferença significativa no escore do pão durante os tratamentos de gelo-degelo, sendo que Nemeth, Paulley e Preston (1996) mostram que os volumes dos pães foram levemente maiores com 2 ou 3 ciclos parciais em relação a 0 ou 1 ciclo. Houve significativa redução no escore dos pães, mas não no volume, durante a estocagem sob congelamento e sem ciclos gelo-degelo. A razão para as diferenças entre estes dois estudos pode ser a formulação da massa, já que o segundo estudo utilizou condicionadores de força (SSL e DATEM) e o primeiro estudo não, o que pode ter reduzido a estabilidade da massa.

Ocorre redução no volume dos pães com o aumento do tempo de estocagem sob congelamento (465 para 385 mL, massa não congelada e congelada por 4 semanas respectivamente) e com a aplicação de ciclos de gelo-degelo (370 e 320 mL para 1 ciclo e 3 ciclos durante 4 semanas de congelamento, respectivamente) (EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996).

Usando DSC, foi determinada a quantidade de água congelável em pedaços de massa (160 g) congelados a diferentes períodos de tempo e temperatura. O teor de água congelável aumentou substancialmente após 4 (84 J/g) e 12 (86 J/g) semanas e com dois ciclos parciais de gelo-degelo dentro de 12 semanas (89 J/g) em relação à massa fresca (76 J/g) (BHATTACHARYA, LANGSTAFF E BERZONSKY, 2003). Isto pode ser atribuído ao derretimento e recristalização do gelo durante os ciclos de gelo-degelo, com subsequente dano na matriz de glúten e separação das moléculas de água (AUTIO E SINDA, 1992).

Inoue et al. (1994) verificaram que o conteúdo de açúcar reduzido foi significativamente menor quando a massa foi estocada sob congelamento por 7 dias e com 3 ciclos de gelo-degelo, sugerindo que ocorre fermentação nas massas durante o período de descongelamento e recongelamento, nos quais as temperaturas se elevam para - 5 e - 2 °C durante 12 horas por ciclo.

A pré-fermentação interrompida não afeta a estabilidade de estocagem da massa sob congelamento tão drasticamente quanto os ciclos de gelo-degelo (RÄSÄNEN, HÄRKÖNEN E AUTIO, 1995). Em um típico ciclo de gelo-degelo (congelamento rápido e

descongelamento à temperatura ambiente), aproximadamente 24 horas são adicionadas à idade do pão. Após este ciclo, as medidas de firmeza são comparadas com aquelas de pães frescos estocados em temperatura ambiente por 24 horas. A maior parte do envelhecimento do pão vem do período gasto entre 0 °C e + 5 °C e seu grau pode ser reduzido ao aplicar um ciclo de rápido congelamento e rápido descongelamento (KENNEDY, 2000).

2.3.2.5 Tempo de descanso e volume dos pães

Geralmente o aumento do tempo de armazenamento sob congelamento também aumenta o tempo de descanso da massa e diminui o volume final do pão (WOLT e D'APPOLONIA, 1984a e b; INOUE e BUSHUK, 1991, 1992; EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996; LU E GRANT, 1999a,b). Räsänen, Härkönen e Autio (1995) mostraram que a maior redução no volume dos pães ocorreu durante a primeira semana de estocagem a -20 ± 2 °C e aumentou após 2 semanas.

No estudo de Bhattacharya, Langstaff e Berzonsky (2003), o armazenamento da massa sob congelamento (12 semanas) provocou um aumento maior no tempo de descanso, provavelmente devido a uma redução adicional na viabilidade das células de levedura. Ocorreu também redução significativa no volume do pão após este período quando comparado a 4 semanas.

O tempo de descanso da massa aumentou em média de 58,2 min., após 2 dias de estocagem sob congelamento, para 100,2 min., após 26 semanas (NEMETH, PAULLEY E PRESTON, 1996), o que pode ser atribuído ao decréscimo na viabilidade das leveduras (WOLT E D'APPOLONIA, 1984b; HINO, TAKANO E TANAKA, 1987).

O aumento da velocidade de congelamento também provoca redução constante no volume específico dos pães (HAVET, MANKAI E LE BAIL, 2000), não por causa da diminuição na retenção de gás, mas pela menor produção de gás pelas leveduras (EL-HADY, EL-SAMAHY E SEIBEL, 1996).

Segundo Bhattacharya, Langstaff e Berzonsky (2003), as características da qualidade geral visual das massas congeladas são minimamente afetadas pela estocagem prolongada sob congelamento e pelos ciclos de gelo-degelo, o que concorda com os dados de Nemeth, Paulley e Preston (1996). Contrariamente, Wolt e D'Appolonia (1984b) observaram uma estrutura aberta e gomosa e uma textura esmigalhada, o que reduziu significativamente o score do pão com o armazenamento prolongado.

Há um decréscimo significativo no volume final e no escore do pão quando o tempo de mistura antes do congelamento é menor do que o necessário para desenvolver a massa, sendo este efeito pronunciado com o aumento do tempo de estocagem sob congelamento (NEMETH, PAULLEY E PRESTON, 1996). A redução no escore do pão pode ser devido ao enfraquecimento da massa associado à ruptura da matriz protéica de glúten (VARRIANO-MARSTON, HSU E MAHDI., 1980; BERGLUND, SHELTON E FREEMAN, 1991).

Durante o cozimento dos pães, o tipo, o formato, o tamanho, a temperatura e o tempo de cozimento dependem do tipo de forno (convencional ou turbo) e da carga a ser trabalhada no mesmo (WATANABE E BENASSI, 2000). Para pão francês de 350 g (tipo “baguete”) recomenda-se usar 225 °C por 25 minutos (NEYRENEUF E VAN DER PLAAT, 1991). Para produtos de massa congelada, o cozimento geralmente não difere muito do convencional, especialmente quando eles são descongelados de forma adequada (GIANNOU, KESSOGLOU E TZIA, 2003).

2.4 Glutathiona

Glutathiona (λ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo muito importante que protege a integridade das células contra o estresse oxidativo. Existe na forma reduzida (glutathiona, GSH) e na forma oxidada (glutathiona dissulfeto, GSSG) - Figura 4 (HERRERO-MARTÍNEZ et al, 2000; SERRU et al, 2001).

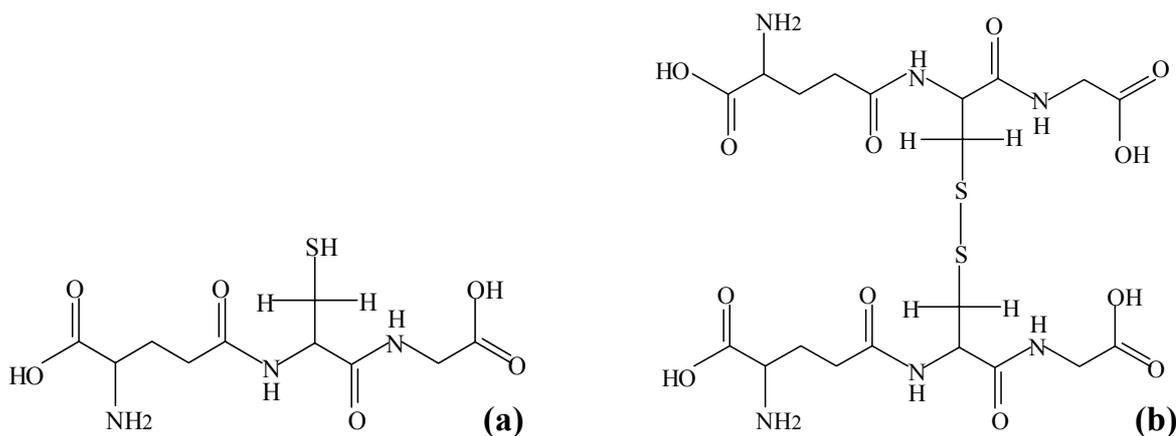


Figura 4. Estruturas químicas da glutathiona – GSH (a) e glutathiona dissulfeto – GSSG (b)

A glutationa tem uma ligação gama entre os dois primeiros aminoácidos (invés de uma típica ligação alfa), a qual resiste à degradação pelas peptidases intracelulares (DICKINSON, LU E FORMAN, 2002).

Glutationa está presente em altas concentrações na maioria das células vivas de microrganismos a humanos. Sua significância é principalmente relacionada com a metade dos grupos sulfidril livres do resíduo de cisteína, os quais conferem redox único ($E'_0 = -0,24$ V para mudança de tiol-dissulfeto) e propriedades nucleofílicas (PENNINCKX, 2000).

GSH corresponde aproximadamente de 0,5-1% do peso seco da levedura *S. cerevisiae*, dependendo das condições de crescimento. As quantidades de GSH podem ser mais que 95% da quantidade de tióis não-protéicos nas cepas silvestres de *S. cerevisiae* (PENNINCKX, 2000). A glutationa pode servir como uma fonte endógena de enxofre para a levedura citada e seu ciclo representa um papel principal na regulação dos fluxos de enxofre, intimamente integrado no metabolismo interno da levedura. A maior parte do enxofre em excesso é incorporada dentro da GSH como um nutriente na presença de sulfato.

A Figura 5 mostra o processo de biossíntese de glutationa no interior das células de levedura (*S. cerevisiae*). A síntese enzimática ocorre a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, via ação seqüencial de 2 enzimas citosólicas ATP-dependentes. A primeira enzima é chamada glutamato-cisteína ligase (GCL, E.C. 6.3.2.2) de acordo com a IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular), anteriormente referida como γ -glutamylcisteína sintetase (GCS). A segunda enzima é nomeada, glutationa sintetase (GS, E.C. 6.3.2.3), de acordo com a IUBMB, também chamada de glutationa sintetase. De maneira ATP-dependente, GS adiciona glicina à γ -glutamylcisteína formando GSH (DICKINSON, LU E FORMAN, 2002).

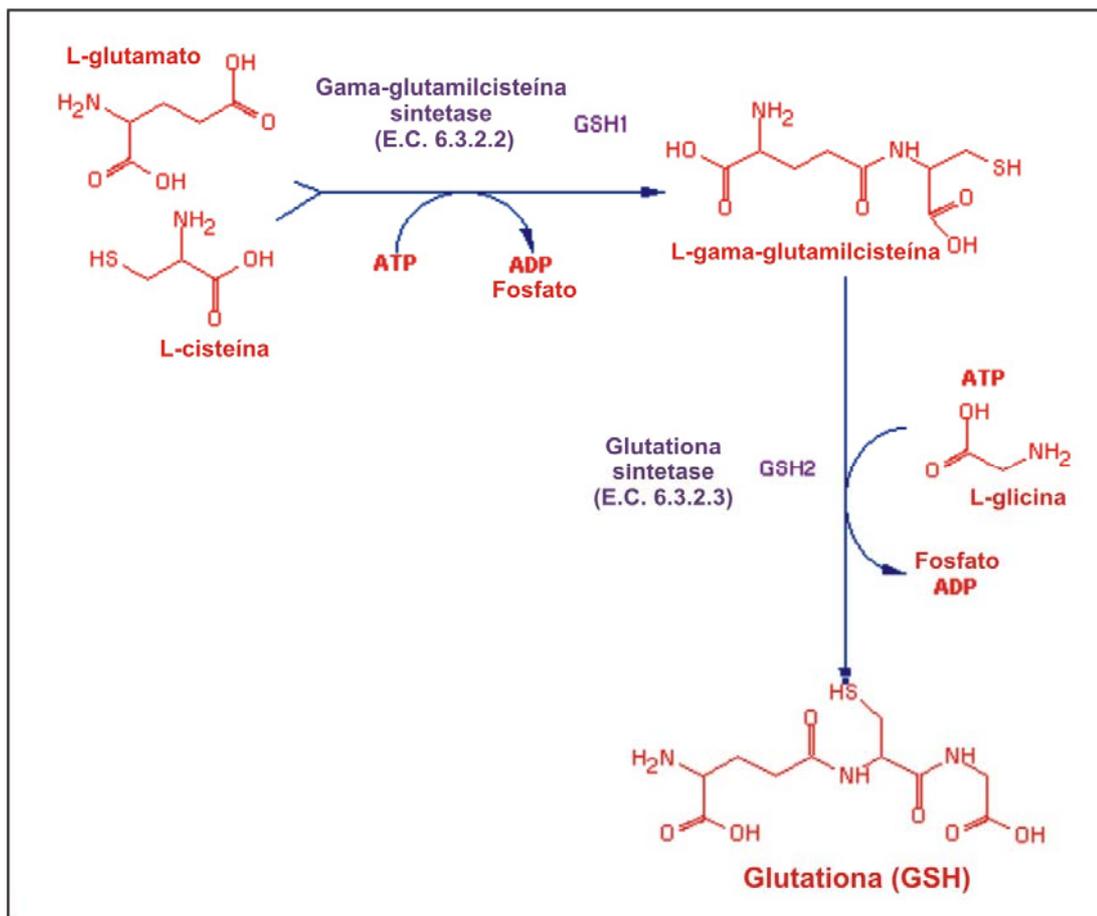


Figura 5. Biossíntese de glutatona em *S. cerevisiae*. Equação da reação em cadeia:
 $L\text{-cisteína} + L\text{-glutamato} + \text{glicina} + 2 \text{ ATP} = \text{glutaciona} + 2 \text{ Pi} + 2 \text{ ADP}$

Embora numerosos métodos, tais como enzimo-colorimétrico (TIETZE, 1969), cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (REED et al., 1980) ou eletroforese capilar (SERRU et al, 2001, CARRU et al, 2003), são descritos para determinar GSH e GSSG, poucos têm sido apropriados para uma análise direta principalmente em alimentos.

Alguns autores têm reportado a separação de GSH e GSSG por eletroforese capilar de zona (CZE) em:

- animais: mitocôndrias e tecidos cardíaco e hepático de ratos Wistar (MUSCARI et al, 1998), eritrócitos de coelhos (PICCOLI et al, 1994).
- humanos: sangue (SERRU et al, 2001), eritrócitos (CARRU et al, 2002, 2003) e plasma (HAVEL, PRITTS E WIELGOS, 1999; ZHANG, HU E CHEN, 2005).
- vegetais: extratos de espinafre, melancia, batata e tomate (HERRERO-MARTÍNEZ et al, 2000), extratos de tecido foliar de *Arabidopsis* e *Nicotiana* (DAVEY, BAUW E MONTAGU, 1997), extratos de folhas de tabaco (ZHANG, HU E CHEN, 2005).

Os métodos que têm sido utilizados para determinar GSH e GSSG em trigo e farinha de trigo são:

- Método espectro-fluorométrico (HISSIN E HILF,1976): baseado na reação do *o*-ftaldialdeído (OPA), como um reagente fluorescente, com GSH a pH 8,0 e GSSG a pH 12,0.
- Método HPLC (SCHOFIELD E CHEN, 1995): envolve vários passos, incluindo a extração com ácido perclórico (PCA) 5% (p/v) para prevenir as reações de troca sulfidril-dissulfeto (SH/SS) e para separar os peptídios extraídos com PCA das proteínas, sendo estas insolúveis em PCA. Após S-carboximetilação de grupos sulfidril livres por alquilação com ácido iodoacético (IAA) e dinitrofenilação de grupos amino livre com 1-fluro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB), os derivados são analisados por HPLC ou em coluna de sílica com fase amino-ligada.

Para prevenir a oxidação de GSH durante a preparação da amostra, pode ser utilizado agentes antioxidantes, como N-etilmaleimida (NEM), que bloqueia os grupos tióis livres (TIETZE, 1969). Algumas determinações também utilizam agentes precipitantes de proteínas (ácido perclórico, ácido metafosfórico, ácido tricloroacético), geralmente para minimizar as mudanças oxidativas de GSH para GSSG (MUSCARI et al, 1998; SERRU et al, 2001). Recentemente, tem-se substituído estes agentes por membranas filtrantes, como as Microcon (Amicon, Beverly, MA, USA), permitindo a filtração das soluções e direta análise em EC (CARRU et al, 2003).

O isolamento de GSH do germe do grão de trigo foi reportado na década de 1940, embora sua presença em farinha foi relatada anteriormente, em 1936 (ZIELIŃSKI et al, 1999). Chen e Schofield (1996) determinaram os teores de glutathiona em farinha de trigo e na cv. *Mercia* verificaram que o conteúdo de GSH caiu para 57 % do valor inicial de farinha fresca durante os primeiros 10 dias de estocagem a 20 °C (de 149 para 89 nmol/g) e permaneceu até 40 dias. O conteúdo de GSSG também diminui 28 % para a farinha armazenada nas mesmas condições (de 61 para 17 nmol/g) e também permaneceu por 40 dias. O desempenho da farinha na panificação melhorou substancialmente nos primeiros 10 dias de estocagem a 20 °C e permaneceu essencialmente constante após este período.

2.5 Eletroforese Capilar (EC)

A técnica eletroforética baseia-se no fenômeno de migração diferenciada de uma molécula com carga elétrica não nula num solvente e sob ação de um campo elétrico aplicado. Cada soluto migra à velocidade distinta de outro, devido à mobilidade eletroforética, específica para cada tipo de molécula. A velocidade é proporcional ao campo elétrico e depende principalmente da carga média das moléculas, do seu volume hidrodinâmico e da viscosidade do meio. Na EC, uma amostra, geralmente contendo espécies carregadas, é introduzida no interior de uma das extremidades do capilar, o qual é preenchido com uma solução tampão (ou eletrólito). Sob a influência de um campo elétrico, os analitos migram do local da injeção no capilar em direção à extremidade do detector, onde serão detectados (KIST et al 1992; WESTON E BROWN, 1997).

Os equipamentos comerciais de EC apareceram apenas em 1989 e seu uso tem crescido muito em diversas áreas: química, farmacêutica, biomédica e bioquímica. Esta técnica tem sido aplicada em análises de biopolímeros, íons inorgânicos e medicamentos (TAGLIARO, 1998).

Peptídeos podem ser separados por EC. Dependendo do número, da composição e da seqüência de aminoácidos, as moléculas de peptídeo diferem em suas cargas elétricas, tamanho (massa molar relativa), forma (conformação), hidrofobicidade e capacidade específica de ligação. Estas propriedades permitem sua separação por métodos de eletromigração baseados nas diferentes mobilidades eletroforéticas, tamanho, carga, hidrofobicidade e interações específicas com outras biomoléculas (KASICKA, 2002).

A EC tem demonstrado seu grande potencial no âmbito da análise de alimentos, por ser um método com alto poder de resolução, curto período de análise, fácil preparação da amostra, baixo custo operacional, grande versatilidade e flexibilidade, baixo gasto de solvente e que utiliza mínimas quantidades de amostras (DONG, 1999; WATANABE E TERABE, 2000; ESTEVES et al, 2004).

EC é uma poderosa ferramenta de separação e quantificação, que oferece poder de resolução mais alto, tempo de análise mais curto e menor custo operacional que HPLC ou eletroforese convencional em gel (XU, 1995). É uma técnica independente, confiável e extremamente versátil (TAGLIARO, 1998).

A eficiência e a versatilidade da eletroforese capilar torna-a um método promissor para o monitoramento da qualidade e da adulteração de alimentos, como exemplificado pela avaliação da qualidade de produtos lácteos (GARCÍA-RUIZ; TORRE E MARINA, 1999) e

determinação de histamina em amostras de pescado (LIAO et al, 1999). A EC também é reportada como método para determinar carboidratos em alimentos e bebidas (SOGA E SERWE, 2000), ácidos orgânicos (tartárico, málico, láctico) em vinhos (ESTEVES et al, 2004) e em café (GALLI E BARBAS, 2004) e *trans*-resveratrol em vinhos (GAO, CHU E YE, 2002), daidzeína e genisteína em produtos de soja (PENG et al, 2004), estimativa do dano por aquecimento em trigo (MOHAMED et al, 2004). Cataldi et al (2003) utilizaram com sucesso o método de eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida a laser para determinar os conteúdos de riboflavina e flavina em leveduras de pão e farinhas de trigo mole e duro, entre outros alimentos.

Outros caminhos para tornar EC mais amplamente aceitável incluem o desenvolvimento de instrumentos em miniaturas para possibilitar análises em pequenas escala e com custo mais acessível (CAPILLARY, 2004).

2.5.1 Classificação

Os tipos de EC podem ser classificados em: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocínica micelar capilar (MECC ou MEKC), eletroforese capilar em gel (CGE), focalização isoeletrica capilar (CIEF), isotacoforese (CITP) e eletrocromatografia capilar (CEC) (WATANABE E TERABE, 2000). O que muda basicamente entre uma variante e outra é o preenchimento da coluna e a solução tampão empregada. Em todas se aplica uma diferença de potencial da ordem de 10 a 30 kV entre os extremos do tubo capilar que possui de 10 a 200 μm de diâmetro interno (KIST, 1993).

Os tipos de EC podem ser divididos de acordo com o sistema eletrolítico: contínuo ou descontínuo (Figura 6). Quando o sistema é contínuo, o campo elétrico e a mobilidade efetiva dos componentes da amostra permanecem constantes e os analitos migrarão com velocidades diferentes, mas constantes, resultando num processo cinético como a eletroforese de zona. No sistema descontínuo, o campo elétrico e a mobilidade efetiva dos componentes da amostra variam ao longo do curso de migração. Assim, a migração do analito pode não existir em alguns pontos do curso de separação, resultando em analitos diferentes com velocidades similares (WESTON E BROWN, 1997).

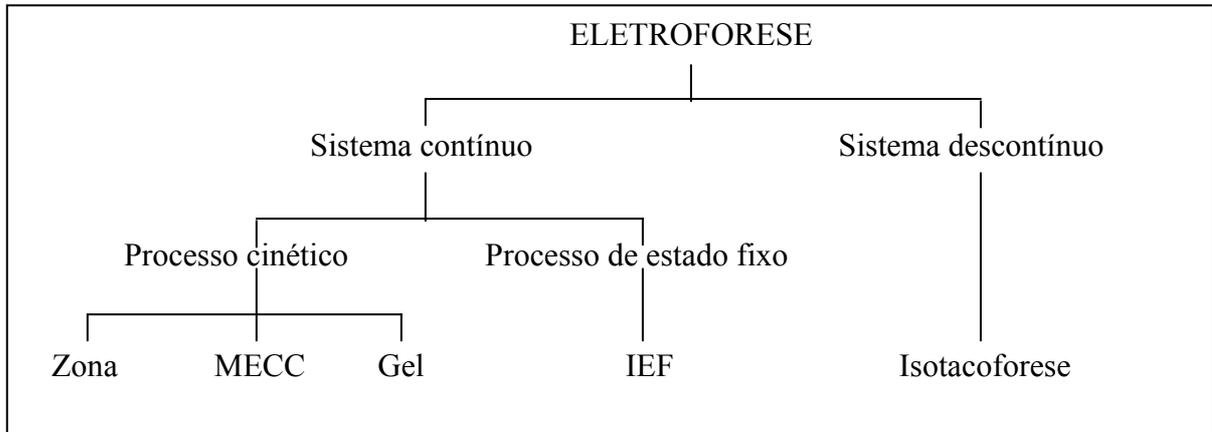


Figura 6. Classificação dos tipos de eletroforese conforme a natureza do sistema eletrólito

Na eletroforese há duas contribuições principais para o movimento dos íons: primeiro, a mobilidade eletroforética própria do íon e, segundo, a velocidade e direção do fluxo eletrosmótico (EOF). O EOF pode ser induzido a migrar na mesma direção dos íons analitos ou em direção oposta, ou pode ser suprimido, tornando-o negligenciável. A Figura 7 mostra a classificação da EC de acordo com a contribuição do EOF (WESTON E BROWN, 1997).

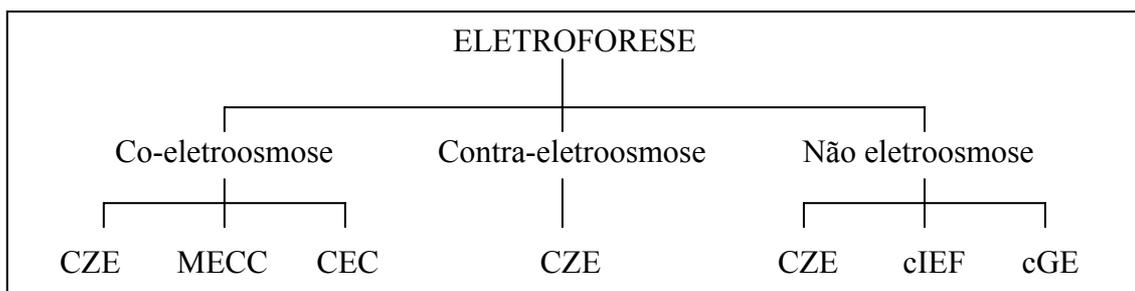


Figura 7. Classificação da eletroforese conforme a contribuição do fluxo eletrosmótico (EOF)

2.5.2 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

A eletroforese capilar de zona também é chamada de eletroforese capilar de zona livre (FZCE) (DONG, 1999). É essencialmente uma eletroforese de alta voltagem em solução livre (TAGLIARO, 1998).

Este é o tipo de eletroforese capilar mais simples e mais amplamente utilizado, baseado nas diferenças de mobilidade dos analitos no campo elétrico. Simplesmente é aplicada uma solução tampão aquosa no preenchimento da coluna, ou seja, por pressão, enche-se a coluna de líquido e imerge-se as extremidades nos reservatórios. Quando se aplica uma diferença de potencial entre estes, se estabelece um campo elétrico ao longo da coluna, que promove simultaneamente a eletrosmose do líquido e a eletroforese das moléculas. As diferenças de velocidades eletroforéticas são dependentes do tamanho e da razão carga/massa dos íons analitos. Estes íons são separados dentro de zonas distintas quando a mobilidade de um analito difere suficientemente da mobilidade do próximo. A velocidade dos analitos é modificada controlando o pH, a viscosidade ou a concentração da solução tampão, ou por mudanças na voltagem de separação. O EOF é freqüentemente usado na CZE para melhorar a resolução ou reduzir o tempo de análise (KIST, 1993; WESTON E BROWN, 1997).

Juntamente com a migração eletroforética, outro fator fundamental da CZE é a eletrosmose, que origina-se na parede do capilar e ao aumentar, chama-se EOF. A própria superfície do capilar de sílica expõe os grupos silanol os quais, ionizados a SiO^- a pHs maiores que 2, interagem eletrostaticamente com os cátions do tampão, atraídos (alguns firme e outros frouxamente) pelas cargas das paredes do capilar. A aplicação de um alto potencial causa a perda destas ligações dos cátions, que migram ao cátodo, o qual está geralmente na direção do detector e esta migração arrasta a água osmoticamente na mesma direção, criando um considerável fluxo de líquido, conhecido como EOF (TAGLIARO, 1998).

A velocidade eletrosmótica, que é muito maior em módulo do que a velocidade eletroforética para a maioria das moléculas, faz com que as zonas, separadas entre si, passem pela região de detecção, obtendo-se assim um eletroferograma. A abcissa (eixo x) contém o tempo necessário para um grupo de moléculas de mesma natureza (pico) migrar de uma extremidade até o ponto de detecção que se situa próximo a outra extremidade da coluna. A ordenada (eixo y) é um sinal proporcional ao número de moléculas presentes em um campo, geralmente minúsculo, da coluna (KIST, 1993).

A CZE permite análises simultâneas de uma gama de espécies químicas que vai de analitos micromoleculares (cátions, componentes neutros e ânions) até proteínas, peptídeos e nucleotídeos (BRUNE E ALFENAS, 1998).

2.5.2.1 Mecanismo de separação

Na CZE, a composição do eletrólito é constante no tubo capilar e, nos reservatórios, circunda os dois eletrodos (ânodo e cátodo). O eletrólito provê uma condução elétrica e um meio tamponado (sistema contínuo). Na introdução da amostra, cada espécie de íon analito migra no tampão numa zona distinta e à velocidade diferente de outras espécies. Moléculas neutras são transportadas ao longo do EOF como um pico singular, não determinado (WESTON E BROWN, 1997). O mecanismo está ilustrado na figura que segue:

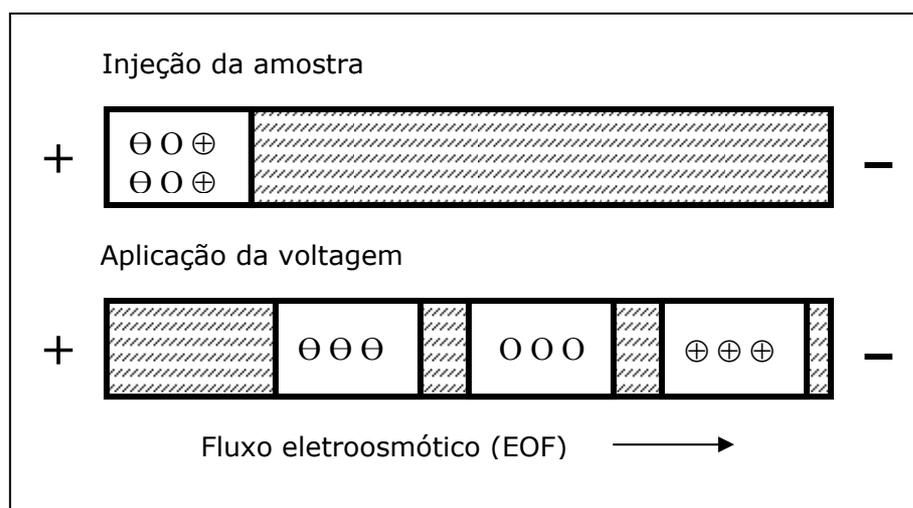


Figura 8. Separação esquemática em CZE com EOF

Por causa do EOF, que geralmente é mais forte que a velocidade eletroforética dos peptídeos e proteínas no tubo capilar, é possível a análise de substâncias aniônicas e catiônicas na mesma corrida. Analitos neutros migram na velocidade do EOF e não são separados por CZE (SCHWARTZ, GUTTMAN E VINTHER, 1998).

2.5.2.2 Sistema tampão

A solução tampão é composta normalmente por água e mais um par ácido-base, que possui a propriedade de manter o pH fixo em um determinado valor (KIST, 1993). O tampão

é vital na separação por eletroforese capilar e afeta tanto o EOF como os analitos, com fatores como pH e concentração. Um tampão utilizado na EC deve possuir as seguintes propriedades (CAPPILARY, 2004):

- boa capacidade tamponante na faixa de pH escolhida;
- baixa absorvância no comprimento de onda da detecção;
- baixa mobilidade, para minimizar a geração de corrente.

As soluções tampão são geralmente escolhidas com base no pH requerido. O tampão fosfato ($pK_{a1} = 2,12$), por exemplo, é usado para separação de proteínas de baixo pI (WESTON E BROWN, 1997). Na análise de peptídeos e proteínas, o pH é o parâmetro mais importante da separação eletroforética (SCHWARTZ, GUTTMAN E VINTHER, 1998).

2.5.2.3 Condições de análise por EC

Para otimizar as diferenças de mobilidade numa determinada separação, pode-se controlar a voltagem, a composição do eletrólito, o pH, a força iônica, os aditivos e o revestimento da parede do tubo capilar. Por exemplo, quando a força iônica é aumentada até um limite, o número de pratos teóricos aumenta, melhorando a resolução e a forma do pico. O aumento da força iônica provoca aquecimento, sendo necessário o controle da temperatura no capilar (WESTON E BROWN, 1997).

Quanto mais alta a voltagem de separação, menor é o tempo de migração. A voltagem excessiva deve ser evitada, porque pode causar aquecimento, redução do número de pratos teóricos e diminuição da resolução. Voltagem de separação muito baixa aumentará o tempo de análise consideravelmente, o que torna o pico alargado (PENG et al, 2004).

O comprimento do capilar tem um grande impacto na resolução, porque o número de pratos teóricos aumenta com o comprimento do capilar. Embora a resolução aumente com a raiz quadrada do comprimento do capilar, o aumento deste pode ser suficiente para se obter a resolução desejada (WESTON E BROWN, 1997). O tamanho do capilar varia, geralmente, de 20 a 100 μm de diâmetro interno e de 20 a 100 cm de comprimento (TAGLIARO, 1998).

Capilares de sílica fundida são os mais utilizados, devido às dimensões precisas, alta condutividade térmica, boa resistência mecânica, maleabilidade, resistência ao ataque químico, alta transmitância óptica (190 a 900 nm) e conveniente processo de transporte de massa (EOF), estabelecido sob campo elétrico em ampla faixa de pH (PALGROSSI, 2002). O EOF nestes capilares é geralmente direcionado para o cátodo, sendo que a polaridade usual é com o ânodo (eletrodo positivo) na extremidade do capilar onde é feita a injeção da amostra e

o cátodo (eletrodo negativo) no lado oposto, poucos centímetros após o detector. É importante também o controle da temperatura no interior do capilar, porque o seu aumento poderia mudar a viscosidade do tampão e, conseqüentemente, a velocidade de migração dos analitos (TAGLIARO, 1998).

A relação superfície para volume do tubo é em torno de centenas de vezes maior em capilares do que em géis em planos, o que causa uma dissipação muito eficiente do calor emanado pela corrida eletroforética, permitindo assim a aplicação do potencial elétrico alto e, em conseqüência, tempo de corrida baixo. É comum trabalhar-se com 20 a 30 kV (BRUNE E ALFENAS, 1998).

Existem dois modos de injeção das soluções em EC: hidrodinâmica e eletrocínética. Na primeira, usa-se pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução nos extremos do capilar e não é seletiva (o conteúdo injetado tem a mesma composição da amostra), enquanto que a segunda é induzida pela aplicação de um potencial e é seletiva (o que é injetado depende da mobilidade e do sinal da carga) (TAGLIARO, 1998).

2.5.2.4 Preparação da amostra

Geralmente a amostra é preparada antes da aplicação da EC, porque os equipamentos comerciais não permitem a preparação no seu interior. Esta preparação inclui a pesagem, a filtração, a diluição ou derivatização da amostra, antes da introdução no sistema de EC. Bons resultados dependem, freqüentemente, do uso de técnicas apropriadas de manipulação de amostras, o que requer conhecimento da natureza de analitos e seus comportamentos em condições distintas. As amostras também devem estar livres de contaminantes (WESTON E BROWN, 1997).

Pré-concentração e pré-separação da amostra são necessárias quando a sensibilidade de detecção e a separação dos analitos no sistema de EC são insuficientes para a análise direta de peptídeos, que estão presentes em baixas concentrações e/ou em misturas complexas de diferentes biomatrizes (fluidos corporais, extratos de tecidos) (KASICKA, 2002).

2.5.2.5 Cuidados especiais

Manutenções preventivas do equipamento devem ser sempre realizadas e as soluções tampão e amostras devem ser filtradas antes da injeção no capilar. O condicionamento do capilar é um passo importante, que garante a reprodutibilidade do método. Para tubos

capilares de sílica fundida não tratada é aconselhável um pré-condicionamento do capilar, lavando-o com uma solução básica, como hidróxido de sódio (NaOH 1 M), antes da primeira corrida. Isto vai limpar a parede interna do capilar e reduzirá as mudanças no EOF durante o período de adaptação. Para amostras que interagem com a parede do capilar, é necessário lavar o capilar entre as corridas, para prevenir mudanças na velocidade do EOF (WESTON E BROWN, 1997).

2.5.2.6 Instrumentação

Os componentes básicos da EC (Figura 9) incluem a fonte de alta voltagem (0-30 kV) necessária para a separação dos componentes; o capilar no qual ocorre a separação; o detector que determina a sensibilidade da separação; e um sistema de aquisição de dados que registra o eletroferograma (WESTON E BROWN, 1997; DONG, 1999).

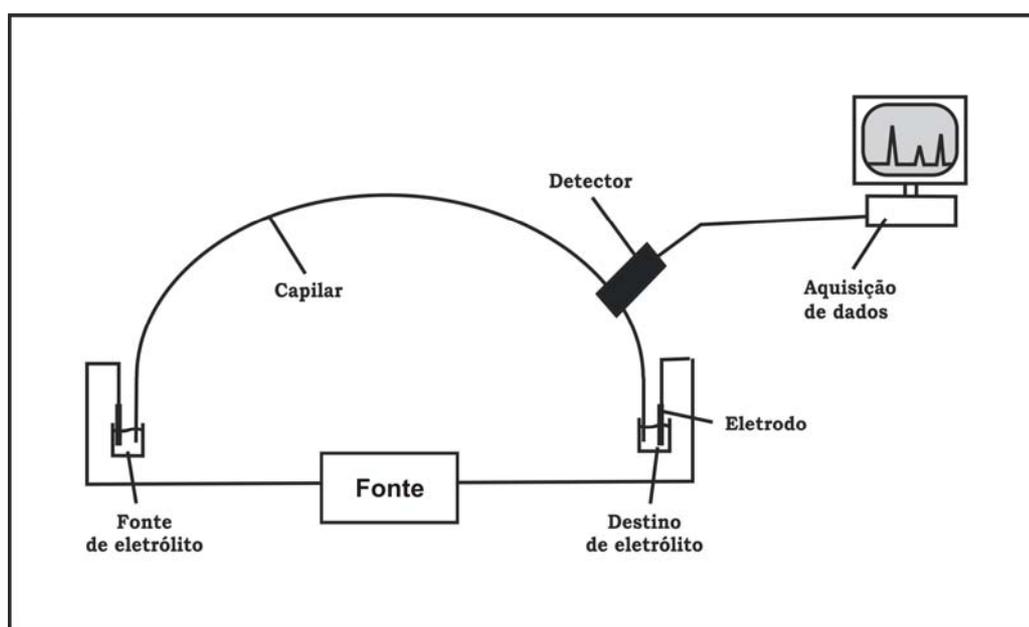


Figura 9. Diagrama esquemático de um instrumento de eletroforese capilar

Para injetar a amostra, o frasco da fonte do eletrólito é removido e um frasco da amostra é colocado no seu lugar. Uma pequena quantidade da amostra é introduzida dentro da extremidade do capilar através de eletromigração ou injeção hidrodinâmica (por gravidade, pressão ou vácuo) e então o frasco com eletrólito retorna a sua posição original. A amostra é injetada na extremidade do ânodo do capilar, aplica-se uma alta voltagem entre as suas

extremidades e os analitos migram de acordo com suas mobilidades eletroforéticas. O EOF arrasta consigo todo o volume da solução através do capilar em direção ao cátodo e os analitos migram até o detector, onde são detectados e um sinal é registrado no plano de aquisição de dados. A EC utiliza geralmente detecção por absorção ultravioleta (UV) ou fluorescência (WESTON E BROWN, 1997; WATANABE E TERABE, 2000).

Após a detecção do pico de interesse, a cavidade do capilar é rapidamente enxaguada com tampão fresco e está pronta para a próxima injeção de amostra. Assim, a EC é uma ferramenta analítica para a análise de alimentos e bebidas (SOGA E SERWE, 2000).

Em EC é mais comum utilizar voltagem constante, o que mantém boa reprodutibilidade no tempo de migração. Os tubos capilares revestidos com sílica fundida são os mais populares e comercialmente disponíveis, com diâmetros internos variando de 10 a 200 μm , embora utiliza-se geralmente dimensões de 25, 50 e 75 μm e em torno de 50 cm de comprimento. Tubos capilares de sílica fundida não tratada são utilizados na análise de espécies inorgânicas ou orgânicas de baixa massa molar como ânions, cátions e ácidos orgânicos, tanto quanto pequenas moléculas de interesse biológico, como aminoácidos, peptídeos e algumas proteínas. Os capilares não tratados são mais fáceis de usar e a separação pode ser razoavelmente predita. As desvantagens incluem a possibilidade de interação entre o soluto e a parede do capilar, porque a sílica possui grupos hidroxil na superfície interna do capilar, que tendem a adsorver solutos maiores e menos rígidos, como proteínas e grandes peptídeos. Isto pode ser contornado de dois modos: 1) alterar o pH do tampão para o ponto isoelétrico da proteína, variando a carga sobre a mesma; 2) mudar as características da parede, adicionando um componente ao tampão que tenha preferência na adsorção à parede (WESTON E BROWN, 1997; BRUNE E ALFENAS, 1998).

O detector ideal para EC deve ter versatilidade, alta sensibilidade, monitoração contínua do efluente no capilar, baixo nível de ruído, ampla linearidade de resposta, suporte estável, insensibilidade às mudanças de fluxo e de temperatura e resposta a todos os tipos de compostos. Deve ser também, preciso e de baixo custo (WESTON E BROWN, 1997).

Detectores de absorbância são não-destrutíveis e respondem apenas para substâncias que absorvem luz a comprimento de onda da fonte de luz. Detectores que medem apenas na faixa de 190-350 nm são detectores de absorção UV, já aqueles que medem na região de 350-700 nm são detectores no visível (Vis). Detectores que compreendem a faixa de 190 a 700 nm são os detectores UV/Vis, amplamente usados em EC (WESTON E BROWN, 1997). Devido à intensa força de absorção da ligação peptídica na região UV de curto comprimento de onda

(200-220 nm), esta é a detecção mais frequentemente utilizada para peptídeos em EC (KASICKA, 2002).

2.5.2.7 Quantificação dos analitos

A área do pico obtida é diretamente relacionada à concentração do soluto (altura do pico) e ao tempo de permanência (largura do pico) no detector. Assim, a direta comparação da área ou da altura do pico do analito obtida por EC com as dos padrões de calibração é suficiente para quantificar as análises em EC. A reprodutibilidade da área do pico (representada pelo coeficiente de variação das análises em replicata) na separação por EC é normalmente de 1-2 % (XU, 1995).

A normalização da área do pico (área do pico/tempo de migração) é essencial para garantir a correta quantificação dos analitos. A direta comparação da área do pico dos componentes determinados no mesmo eletroferograma sem a normalização da área do pico pode resultar em más interpretações dos níveis de impurezas (RICHARDS, 1994).

O limite de detecção é geralmente dependente do tipo de detector usado, dos cromóforos dos analitos e das condições de análise. Para substâncias de baixa massa molar (M_r) e monitoramento por absorção UV sem pré-concentração da amostra, o limite de detecção é em níveis de $\mu\text{mol/L}$ ($\mu\text{g/mL}$) (LI et al, 1993). Para amostras pré-concentradas, este limite cai para nível de nmol/L (ng/mL) (TELLEZ et al, 1992). O uso de detecção por fluorescência pode reduzir ainda mais este limite para o nível de picomolar (ALTRIA, GOODALL E ROGAN, 1994). Concentrações micromolares de peptídeos são geralmente detectáveis utilizando absorção UV na detecção em EC (KASICKA, 2002).

2.6 Análise estatística

2.6.1 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. É obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2003).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é: $y = ax + b$, onde y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.); x = concentração; a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade; b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2003).

O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, sendo requerido, geralmente, um valor maior que 0,90 (INMETRO, 2003). Geralmente utiliza-se um nível de confiança de 95%.

2.6.2 Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e pode ser expressa por meio da repetitividade e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo (INMETRO, 2003).

2.6.2.1 Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, a seguir (INMETRO, 2003):

- mesmo procedimento de medição;
- mesmo observador;
- mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- mesmo local, e
- repetições em curto espaço de tempo.

Pode ser determinada por meio da análise de padrões ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Calcula-se o desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetitividade. O limite de repetitividade “ r ” capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicatas de uma amostra, determinada sob condições de repetitividade, é significativa. Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetitividade

(r) é avaliado por: $r = 2,8.s_r$, sendo s_r o desvio-padrão de repetitividade associada aos resultados considerados ($s_r = s.t$, onde s é o desvio padrão e t é o valor t de Student) (INMETRO, 2003).

2.6.2.2 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório, e refere-se sobre a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, variando-se os analistas, os equipamentos e os tempos da análise (INMETRO, 2003).

O limite de reprodutibilidade “ R ” permite ao analista decidir se a diferença entre os valores em duplicata da amostra analisada sob condições de reprodutibilidade é significativa. Para um nível de confiança de 95%, esse limite é dado por $R = 2,8.s_R$, sendo s_R o desvio-padrão de reprodutibilidade associado aos resultados considerados ($s_R = s.t$, onde s é o desvio padrão e t é o valor t de Student) (INMETRO, 2003).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIP - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA. **Conheça o mercado: os números da panificação no Brasil e no mundo**. Disponível em: <<http://www.abip.org.br>>. Acesso em: 24 agosto 2004.
2. ACNielsen. **Os produtos mais quentes do mundo: informações sobre o crescimento de alimentos e bebidas**. Relatório executivo de notícias, ACNielsen Global Services, 2002.
3. ALTRIA, K. D.; GOODALL, D. M.; ROGAN, M. M. Quantitative determination of drug counter-ion stoichiometry by capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v.38, p.637-662, 1994.
4. AUTIO, K.; SINDA, E. Frozen doughs: rheological changes and yeast viability. **Cereal Chemistry**, v.69, p.409-413, 1992.
5. AUTRAN, J. C. Soft wheat: view from France. **Cereal Foods World**, v.34, p.667-676, 1989.
6. AZIZI, M. H.; RAJABZADEH, N.; RIAHI, E. Effect of mono-diglyceride and lecithin on dough rheological characteristics and quality of flat bread. **Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie**, v.36, p.189-193, 2003.
7. BAUER, N. et al. Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. II. Rheological properties. **Cereal Chemistry**, v. 80, p. 787-790, 2003.
8. BHATTACHARYA, M.; LANGSTAFF, T. M.; BERZONSKY, W. A. Effect of frozen storage and freeze-thaw cycles on the rheological and baking properties of frozen doughs. **Food Research International**, v.36; p.365-372, 2003.
9. BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997. p.537-575.
10. BERGLUND, P. T.; SHELTON, D. R. Effect of frozen storage duration on firming properties of breads baked from frozen doughs. **Cereal Foods World**, v.38, p.89-93, 1993.
11. BERGLUND, P. T.; SHELTON, D. R.; FREEMAN, T. Frozen bread dough ultrastructure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycles. **Cereal Chemistry**, v.68, p.105-107, 1991.
12. BLOKSMA, A. H. Rheology of the breadmaking process. **Cereal Foods World**, v.35, p.228-236, 1990a.
13. BLOKSMA, A. H. Dough structure, dough rheology, and baking quality. **Cereal Foods World**, v.35, p.237-244, 1990b.

14. BOT, A. Differential scanning calorimetric study on the effects of frozen storage on gluten and dough. **Cereal Chemistry**, v.80, p.366-370, 2003.
15. BRUNE, W.; ALFENAS, A. C. Modalidades de eletroforese. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p.70-75.
16. CAPILLARY ELECTROPHORESIS. Disponível em: <http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/2000/altria_nov00.htm>. Acesso em: 19 junho 2004.
17. CARRU, C. et al. Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. **Electrophoresis**, v.23, p.1716-1721, 2002.
18. CARRU, C. et al. Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.1017, p.233-238, 2003.
19. CATALDI, T. R. I. et al. Assessment of riboflavin and flavin content in common Food simples by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Food Chemistry**, v.82, p.309-314, 2003.
20. CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentares**. Zaragoza: Acribia, 1989. pp. 235-253.
21. DAVEY, M. W.; BAUW, G.; MONTAGU, M. V. Simultaneous high-performance capillary electrophoresis analysis of the reduced and oxidized forms of ascorbate and glutathione. **Journal of Chromatography B**, v.697, p.269-276, 1997.
22. DE BONA, S. **Estudos da viabilidade da produção de pão francês a partir de massa congelada**. 2002. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
23. DEMIRALP, H.; CELIK, S.; KÖKSEL, H. Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. **European Food Research Technology**, v.211, p.322-325, 2000.
24. DICKINSON, D. A.; LU, S. C.; FORMAN, H. J. Glutathione – synthesis. **The Virtual Free Radical School**. Oxygen Society Education Program. 2002.
25. DONG, Y. Capillary electrophoresis in food analysis. **Trends Food Science and Technology**, v.10, p.87-93, 1999.
26. EL-HADY, E. A.; EL-SAMAHY, S. K.; SEIBEL, W. Changes in gas production and retention in non-fermented frozen wheat doughs. **Cereal Chemistry**, v.73, p.472-477, 1996.
27. EL-HADY, E.A.; EL-SAMAHY, S. K.; BRÜMMER, J.-M. Effect of oxidants, sodium-stearoyl-2-lactylate and their mixtures on rheological and baking properties of

- nonprefermented frozen doughs. **Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie**, v.32, p.446-454, 1999.
28. ESSELINK, E. F. J. et al. Long-term storage effect in frozen dough by spectroscopy and microscopy. **Cereal Chemistry**, v.80, p.396-403, 2003.
 29. ESTEVES, V. I. et al. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. **Analytical and Chimica Acta**, v.513, p.163-167, 2004.
 30. FRANCISCHI, M. L. P.; ORMENESE, R. C. S. C.; PIZZINATTO, A. Tecnologia de produção de pães a partir de massas congeladas. **Boletim da SBCTA**, v.32, p.209-214, 1998.
 31. GALLI, V.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee. **Journal of Chromatography A**, v.1032, p.299-304, 2004.
 32. GARCÍA-RUIZ, C; TORRE, M.; MARINA, M. L. Analysis of bovine whey proteins in soybean dairy-like products by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.859, p.77-86, 1999.
 33. GAO, L; CHU, Q.; YE, J. Determination of *trans*-Resveratrol in wines, herbs and health food by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, v.78, p.255-260, 2002.
 34. GÉLINAS, P.; DEAUDELIN, I.; GRENIER, M. Frozen dough: effects of dough shape, water content, and sheeting-molding conditions. **Cereal Foods World**, v.40, p.124-126, 1995.
 35. GÉLINAS, P.; LAGIMONIÈRE, M.; DUBORD, C. Baker's yeast sampling and frozen dough stability. **Cereal Chemistry**, v.70, p.219-225, 1993.
 36. GÉLINAS, P.; LAGIMONIÈRE, M.; RODRIGUE, N. Performance of cream or compressed yeast in frozen and nonfrozen doughs. **Cereal Chemistry**, v.71, p.183-186, 1994.
 37. GERRARD, J. A. et al. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. **Journal of Food Science**, v.66, p.782-786, 2001.
 38. GIANNOU, V.; KESSOGLOU, V.; TZIA, C. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. **Trends in Food Science Technology**, v.14 p.99-108, 2003.
 39. GIASHI, K.; HOSENEY, R.; VARRIANO-MARSTON, E. Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. **Cereal Chemistry**, v.60, p.58-61, 1983.
 40. GRISWOLD, R. M. **Estudo experimental dos alimentos**. São Paulo: Edgar Blücher, 1972. pp.292-293.
 41. GUTKOSKI, L. C.; ANTUNES, E.; ROMAN, T. I. Avaliação do grau de extração de farinhas de trigo e de milho em moinho tipo colonial. **Boletim do CEPPA**, v.17, n.2, p. 153-166, 1999.

42. GUTKOSKI, L. C. et al. Efeitos de ingredientes na qualidade da massa de pão de fôrma congelada não fermentada durante o armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.3, p.460-467, 2005.
43. HAVEL, K.; PRITTS, K.; WIELGOS, T. Quantification of oxidized and reduced glutathione in plasma by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.853, p.215-223, 1999.
44. HAVET, M.; MANKAI, M.; LE BAIL, A. Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough. **Journal of Food Engineering**, v.45, p.139-145, 2000.
45. HE, H.; HOSENEY, R. C. Differences in gas retention, protein solubility and rheological properties between flours of different baking quality. **Cereal Chemistry**, v.68, p.526-530, 1991.
46. HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. et al. Simultaneous determination of L-ascorbic acid, glutathione and their oxidized forms in ozone-exposed vascular plants by capillary electrophoresis. **Environmental Science and Technology**, v.34, p.1331-1336, 2000.
47. HIGASHIYAMA, T. Novel functions and applications of trehalose. **Pure Applied Chemistry**, v.74, n.7, p.1263-1269, 2002.
48. HINO, A.; TAKANO, H.; TANAKA, Y. New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations. **Cereal Chemistry**, v.64, p.269-275, 1987.
49. HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v.74, n.1, p.214-226, 1976.
50. HOLMES, J. T.; HOSENEY, R. C. Frozen doughs: freezing and thawing rates and the potential using a combination of yeast and chemical leavening. **Cereal Chemistry**, v.64, p.348-351, 1987.
51. HOSENEY, R. C. **Principles of cereal science and technology**. 2. ed. St. Paul: AACC, 1994. 378p.
52. HSU, K. H.; HOSENEY, R. C.; SEIB, P. A. Frozen dough. I. Factors affecting stability of yeasted doughs. **Cereal Chemistry**, v.56, p.419-423, 1979a.
53. HSU, K. H.; HOSENEY, R. C.; SEIB, P. A. Frozen dough. II. Effect of freezing and storing conditions on the stability of yeasted doughs. **Cereal Chemistry**, v.56, p.424-426, 1979b.
54. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01, mar. 2003.

55. INOUE, Y.; BUSHUK, W. Studies on frozen dough. I. Effects of frozen storage and freeze-thaw cycles on baking and rheological properties. **Cereal Chemistry**, v.68, p.627-631, 1991.
56. INOUE, Y.; BUSHUK, W. Studies on frozen dough. II. Flour quality requirements for bread production from frozen dough. **Cereal Chemistry**, v.69, p.423-428, 1992.
57. INOUE, Y. et al. Studies on frozen dough. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. **Cereal Chemistry**, v.71, p.118-121, 1994.
58. INOUE, Y.; SAPIRSTEIN, H. D.; BUSHUK, W. Studies on frozen doughs. IV. Effect of shortening systems on baking and rheological properties. **Cereal Chemistry**, v.72, p.221-224, 1995.
59. JACKEL, S. S. Frozen dough opportunities keep heating up. **Cereal Foods World**, v.36, p.529, 1991.
60. JANSSEN, A. M.; VAN VLIET, T.; VEREIJKEN, J. M. Rheological behaviour of wheat glutens at small and large deformations. Comparison of two glutens differing in bread making potential. **Journal of Cereal Science**, v.23, p.19-31, 1996.
61. KASICKA, V. Recent advances in capillary electrophoresis of peptides. In: EL RASSI, Z. **CE and CEC Reviews 2002: advances in the practice and application of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography**. Germany: Wiley-VCH, 2002. p.327-350.
62. KAUFMAN, S. P.; HOSENEY, R. C.; FENNEMA, O. Dough rheology – a review of structural models and the role of disulfide interchange reactions. **Cereal Foods World**, v.31, p.820-824, 1986.
63. KENNEDY, C. J. Freezing processed foods. In: KENNEDY, C. J. (Ed.) **Managing frozen foods**. Cambridge: CRC Press, 2000.
64. KENNY, S.; GRAU, H.; ARENDT, E. K. Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on frozen dough quality and stability. **European Food Research and Technology**, v.213, p.323-328, 2001.
65. KIST, T. B. L. **Eletroforese Capilar de Zona**. 1993. 69 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa do Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.
66. KIST, T. B. L. et al. O minilaser N₂ e sua aplicação em eletroforese capilar. In: V SIMPÓSIO ESTADUAL DE LASERS E APLICAÇÕES, 1992, São Paulo. **Anais**. São Paulo: IPEN, 1992. p.5-8.
67. KNIGHTLY, W. H. Surfactants in baked foods: current practice and future trends. **Cereal Foods World**, v. 33, n.5, p 405-412, 1988.

68. KUSUNOSE, C.; FUJII, T.; MATSUMOTO, H. Role of starch granules in controlling expansion of dough during baking. **Cereal Chemistry**, v.76, n.6, p.920-924, 1999.
69. LAAKSONEN, T.; ROOS, Y. H. Thermal, dynamic-mechanical, and dielectric analysis of phase and state transitions of frozen wheat doughs. **Journal of Cereal Science**, v.32, p.281-292, 2000.
70. LÉON, A.; DURÁN, E.; BARBER, C. A new approach to study starch changes occurring in dough baking process and during bread storage. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung**, v.204, p.120-124, 1997.
71. LI, S. et al. Determination of dextromethorphan and dextrophan in urine by capillary zone electrophoresis: Application to the determination of debrisoquin-oxidation metabolic phenotype. **Chromatographia**, v.35, p.216-222, 1993.
72. LIAO, W. et al. Use of capillary electrophoresis with UV detection as a screening method to determinate histamine in fish samples. **Journal of Chromatography A**, v.853, p.541-544, 1999.
73. LU, W.; GRANT, L. Effects of prolonged storage at freezing temperatures on starch and baking quality of frozen doughs. **Cereal Chemistry**, v.76, p.656-662, 1999a.
74. LU, W.; GRANT, L. Role of flour fractions in breadmaking quality of frozen dough. **Cereal Chemistry**, v.76, p.663-667, 1999b.
75. MARTIN, P. Controlling the breadmaking process: the role of bubbles in bread. **Cereal Foods World**, v.49, p.72-75, 2004.
76. MERIC, L. et al. Cryoresistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in frozen dough: contribution of cellular trehalose. **Cereal Chemistry**, v.72, p.609-615, 1995.
77. MOHAMED, A. et al. Estimation of HRW wheat heat damage by DSC, capillary zone electrophoresis, photoacoustic spectroscopy and rheometry. **Food Chemistry**, v.87, p.195-203, 2004.
78. MUSCARI, C. et al. Simultaneous detection of reduced and oxidized glutathione in tissues and mitochondria by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v.707, p.301-307, 1998.
79. MYERS, D. K.; ATTFIELD, P. V. Intracellular concentration of exogenous glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* provides for improved leavening of frozen sweet doughs. **Food Microbiology**, v.16, p. 45-51, 1999.
80. NAITO, S. et al. Effect of freeze-thaw cycles on the gluten fibrils and crumb grain structure of breads made from frozen doughs. **Cereal Chemistry**, v.81, p.80-86, 2004.
81. NEMETH, L. J.; PAULLEY, F. G.; PRESTON, K. R. Effects of ingredients and processing conditions on the frozen dough bread quality of Canada Western Red Spring wheat flour during prolonged storage. **Food Research International**, v.29, p.609-616, 1996.

82. NEYRENEUF, O.; DELPUECH, B. Freezing experiments on yeasted dough slabs. Effects of cryogenic temperatures on the baking performance. **Cereal Chemistry**, v.70, p.109-111, 1993.
83. NEYRENEUF, O.; VAN DER PLAAT, J. B. Preparation of frozen French bread dough with improved stability. **Cereal Chemistry**, v.68, p.60-66, 1991.
84. NICOLAS, Y. et al. Effect of storage time and temperature on rheological and microstructural properties of gluten. **Cereal Chemistry**, v.80, p.371-377, 2003.
85. PALGROSSI, F. S. **Desenvolvimento e avaliação de sistema envolvendo interface de análise por injeção em fluxo com eletroforese capilar**. 2002. 60f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
86. PALMER, E. Food companies are buying into frozen dough. **Milling & Baking News**, v.73, p.28-30, 1994.
87. PENG, Y. et al. Determination of isoflavones in soy products by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, v.87, p.135-139, 2004.
88. PENNINCKX, M. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.737-742, 2000.
89. PICCOLI, G. et al. Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. **Journal of Chromatography A**, v.676, p.239-246, 1994.
90. PIZZINATTO, A. Fatores que afetam a estabilidade e o desempenho de massas congeladas de pão. **Boletim do ITAL**, v.16, p.215-226, 1979.
91. PROPAN – PROGRAMA DE APOIO À PANIFICAÇÃO. **Perfil do setor de panificação no Brasil**. Disponível em: <<http://www.propan.com.br/perfilpanificacao.asp>>. Acesso em: 25 outubro 2004 e 06 janeiro 2006.
92. QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnología de la panificación**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 485p.
93. RÄSÄNEN, J. et al. Properties of frozen wheat doughs at subzero temperatures. **Journal of Cereal Science**, v.28, p.1-14, 1998.
94. RÄSÄNEN, J.; HÄRKÖNEN, H.; AUTIO, K. Freeze-thaw stability of prefermented frozen lean wheat doughs: effect of flour quality and fermentation time. **Cereal Chemistry**, v.72, p.637-642, 1995.

95. REED, G.; PEPLER, H. J. **Yeast Technology**. Westport: The AVI Publishing Company, 1973. 378p.
96. REED, D.J. et al. High-Performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p.55-62, 1980.
97. RIBOTTA, P. D.; LEÓN, A. E.; AÑÓN, M. C. Effect of freezing and frozen storage on the gelatinization and retrogradation of amylopectin in dough baked in a differential scanning calorimeter. **Food Research International**, v.36, p.357-363, 2003.
98. RIBOTTA, P. D. et al. Effect of emulsifier and guar gum on micro structural, rheological and baking performance of frozen bread dough. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.305-313, 2004.
99. RICHARDS, M. P. Application of a polyamine-coated capillary to the separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v.657, n.2, p.345-355, 1994.
100. ROUILLÉ, J.; LE BAIL, A.; COURCOUX, P. Influence of formulation and mixing conditions on breadmaking qualities of French frozen dough. **Journal of Food Engineering**, v.43, p.197-203, 2000.
101. SCHOFIELD, J. D.; CHEN, X. Analysis of free reduced and free oxidized glutathione in wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v.21, p.127-136, 1995.
102. SCHWARTZ, H. E.; GUTTMAN, A.; VINTHER, A. Separation of peptides and proteins. In: CAMILLERI, P. **Capillary electrophoresis: theory and practice**. Cambridge: CRC Press, 1998. 2 ed., p.363-374.
103. SEGUCHI, M.; NIKAIDOO, S.; MORIMOTO, N. Centrifuged liquid and breadmaking properties of frozen-and-thawed bread dough. **Cereal Chemistry**, v.80, p.264-268, 2003.
104. SERRU, V. et al. Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. **Clinical Chemistry**, v.47, n.7, p.1321-1324, 2001.
105. SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos**. São Paulo: Varela, 1996. pp.184-193.
106. SOGA, T.; SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, v.69, p.339-344, 2000.
107. TAGLIARO, F. et al. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v.92, p.75-88, 1998.
108. TAKANO, H. et al. Imaging of the fermentation process of bread dough and the grain structure of baked breads by magnetic resonance imaging. **Journal of Food Science**, v.67, p.244-250, 2002a.

109. TAKANO, H. et al. Fermentation process and grain structure of baked breads from frozen dough using freeze-tolerant yeast. **Journal of Food Science**, v.67, p. 2725-2733, 2002b.
110. TELLEZ et al. Coupling of microdialysis with capillary electrophoresis: a new approach to the study of drug transfer between two compartments of the body in freely moving rats. **Journal of Chromatography B**, v.581, n.2, p.257-266, 1992.
111. TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v.27, p.502-522, 1969.
112. VAN DAM, H. W.; HILLE, J. D. R. Yeast and enzymes in breadmaking. **Cereal Foods World**, v.55, n.4, p.6-8, 1981.
113. VARRIANO-MARSTON, E.; HSU, K. H.; MAHDI, J. Rheological and structural changes in frozen doughs. **Baker's Digests**, v.54, p.32-41, 1980.
114. WANG, Z. J.; PONTES JÚNIOR, J. G. Improving frozen dough qualities with the addition of vital wheat glúten. **Cereal Foods World**, v.39, n.7, p.500-503, 1994.
115. WANG, Z. J. Storage stability of gluten-fortified frozen dough. **Cereal Foods World**, v.40, n.11, p.827-831, 1995.
116. WATANABE, E.; BENASSI, V. T. O uso de massa congelada na produção de pão. **Boletim do CEPPA**, v.18, p.71-84, 2000.
117. WATANABE, T.; TERABE, S. Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.880, p.311-322, 2000.
118. WESTON, A.; BROWN, P. R. **HPLC and CE: principles and practice**. San Diego: Academic Press, 1997. 280p.
119. WOLT, M. J.; D'APPOLONIA, B. L. Factors involved in the stability of frozen dough. I. The influence of yeast reducing compounds on frozen-dough stability. **Cereal Chemistry**, v.61, p.209-212, 1984a.
120. WOLT, M. J.; D'APPOLONIA, B. L. Factors involved in the stability of frozen dough. II. The effects of yeast type, flour type, and dough additives on frozen-dough stability. **Cereal Chemistry**, v.61, p.213-221, 1984b.
121. WONG, D. W. S. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. p.102-109.
122. XU, Y. Capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v.67, n.12, p.463R-473R, 1995.
123. ZELEZNAK, K.; HOSENEY, R. The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. **Cereal Chemistry**, v.63, p.407-411, 1986.

124. ZIELIŃSKI, H. et al. Reduced-oxidized glutathione status as a potential index of oxidative stress in mature cereal grain. **Cereal Chemistry**, v.76, n.6, p.944-948, 1999.
125. ZHANG, J.; HU, Z.; CHEN, X. Quantification of glutathione and glutathione disulfide in human plasma and tobacco leaves by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Talanta**, v.65, p.986-990, 2005.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA E GLUTATIONA DISSULFETO EM FARINHA DE TRIGO BRS 208 (safra 2003) POR ELETROFORESE CAPILAR COM ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA

¹ Trabalho a ser submetido para a revista *Journal of Food and Agriculture* ou *Food Chemistry*

RESUMO

Um novo método de eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção por absorção ultravioleta (UV) foi desenvolvido para separação rápida e sensível de glutathiona (GSH) e glutathiona dissulfeto (GSSG) em farinha de trigo BRS 208 (safra 2003) indicada para panificação. Os extratos foram preparados após diluição da farinha em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6), centrifugação, ultrafiltração do sobrenadante (filtro Microcon, $M_r = 3000$ kDa) e liofilização. Os extratos foram reconstituídos com tampão bicarbonato 20 mM (pH 6) e analisados por eletroforese capilar (P/ACE MDQ, Beckman Coulter) com detector de absorção UV a 200 nm. Os limites mínimos de quantificação foram de 5 μ M para GSSG e 15 μ M para GSH. As concentrações de glutathiona e glutathiona dissulfeto nos extratos foram 19,13 e 23,53 μ M, respectivamente e na amostra de farinha foram 21,86 e 26,90 nmol/g de farinha para GSH e GSSG, respectivamente. Os resultados foram semelhantes aos encontrados em outros métodos analíticos, como HPLC. O método desenvolvido apresentou simples preparação dos extratos, curto tempo de migração (2-3 min.), alta performance analítica (especificidade na detecção, linearidade, repetitividade e reprodutibilidade na concentração dos analitos).

Palavras-chave: farinha de trigo, glutathiona, glutathiona dissulfeto, eletroforese capilar, absorção ultravioleta.

ABSTRACT

Determination of glutathione and glutathione disulfide in wheat flour cv. BRS 208 (crop 2003) by capillary electrophoresis with ultraviolet detection

A new capillary zone electrophoresis (CZE) method with ultraviolet (UV) detection was developed for the rapid separation and sensitive detection of glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) in wheat flour for bread making. The flour extracts were diluted in 20 mM bicarbonate buffer (pH 6.0), centrifuged, ultrafiltrated (Microcon, cut-off 3000 kDa) and freeze dried. These extracts were reconstituted in 20 mM bicarbonate buffer (pH 6.0) and analyzed with a Beckman P/ACE MDQ system equipped with UV detector at 200 nm. The minimum quantification limits were 5 and 15 μM for GSSG and GSH respectively. Glutathione and glutathione disulfide concentrations in flour extracts were 19,13 and 23,53 μM respectively, while in the samples these were 21,86 and 26,90 nmol/g flour respectively. These values are in accordance with some HPLC values found in the literature. The new method showed easy preparation of extracts of sample, short migration time (2-3 min.), high analytical performance (it's specified to detect GSH and GSSG and has good linearity, repeatability and reproducibility).

Key words: wheat flour, glutathione, glutathione disulfide, capillary electrophoresis, ultraviolet detection.

1 INTRODUÇÃO

No germe dos grãos, 11,3 a 15,3% do nitrogênio total estão presentes em muitos compostos contendo nitrogênio não-protéico. Estes compostos incluem: glutatona, alantoína, betaina, colina e lecitina (MARQUAT, SLAVIN E FULCHER, 2002). Particular atenção tem sido dada ao possível papel da glutatona, que ocorre endogenamente na farinha em ambas formas livres: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

A eletroforese capilar (EC) é uma ferramenta altamente adequada da rotina analítica de laboratórios de controle de qualidade, devido a sua capacidade de automação, baixo custo dos reagentes e curtos períodos de análise (SCHWARTZ, GUTTMAN E VINTHER, 1998). Existem outros métodos para a determinação de GSH e GSSG em farinha de trigo, como o método HPLC (REED et al, 1980; SCHOFIELD E CHEN, 1995), mas estes necessitam um tempo mais longo para a preparação da amostra e para a análise instrumental em relação à EC.

O objetivo do presente trabalho foi otimizar a separação simultânea de GSH e GSSG em farinha de trigo por eletroforese capilar e absorção ultravioleta, obtendo curto tempo de análise, boa eficiência na detecção e alta performance analítica (especificidade, linearidade).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

A amostra de farinha analisada foi obtida a partir da cultivar de trigo BRS 208, safra 2003 (Figura 1), desenvolvida pela Embrapa Soja em parceria com a Embrapa Trigo e indicada para cultivo em todo o Estado do Paraná em 2001. Foi fornecida para esta pesquisa pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Trigo) de Passo Fundo, RS. Uma das principais características da cultivar foi sua força de glúten (W), equivalente a 282×10^{-4} J (DOTTO et al, 2001), que a classifica como trigo para panificação (BRASIL, 2001).



Figura 1. Grão e farinha de trigo da cultivar BRS 208, safra 2003

A força de glúten (alveógrafo Chopin, modelo MA-95, equipado com acessório Alveolink, Villeneuve-la-Garenne, França) e a extração de farinha dos grãos da cultivar BRS 208, safra 2003, lote 166/03 foram determinadas pelos métodos 54-30 e 26-10A (AACC, 2000), respectivamente, pelos pesquisadores da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

A moagem úmida (grãos a 14% de umidade por 16-24h) para extração de farinha branca do grão foi feita na Embrapa – Trigo, Passo Fundo, RS, usando moinho de rolos (Brabender, modelo Quadrumat Sênior, Duisburg, Alemanha). A amostra de farinha foi embalada em sacos de polietileno e armazenada à temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) por 2 meses antes das análises por eletroforese capilar e físico-químicas.

Neste trabalho, as análises foram realizadas nos extratos preparados a partir da farinha e na própria amostra (farinha).

2.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com os métodos oficiais da *American Association of Cereal Chemists* (AACC, 1995):

- Umidade: n° 44-15a;
- Cinzas (resíduo mineral fixo): n° 08-01;
- Extrato etéreo (lipídios): n° 30-10;
- Proteína total (N x 6,25): n° 46-12;
- Fibras alimentares total, solúvel e insolúvel: n° 32-07;

- Carboidratos: calculados pela diferença.

Todas as análises foram feitas em triplicata e os dados foram expressos em % em base seca (m/m).

2.3 Equipamento

Foi utilizado o equipamento P/ACETM MDQ (Beckman Coulter, San Ramon, CA) equipado com um detector de ultravioleta (UV), injetor e amostrador automáticos e conectado ao software 32 Karat[®] (Beckman Coulter, San Ramon, CA) para coleta dos dados – eletroferogramas (Figura 2). As análises foram realizadas no laboratório de Química de Cereais localizado em *Food and Agricultural Products Research Center*, Oklahoma State University, Stillwater, OK, Estados Unidos.



Figura 2. Equipamento Beckman Coulter P/ACE MDQ (San Ramon, CA) acoplado a software 32 Karat[®] (Beckman Coulter)

2.4 Otimização do método de eletroforese capilar (EC) para determinar glutathiona

2.4.1 Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração

Os padrões de glutathiona (SigmaUltra, 98-100%) e glutathiona dissulfeto (BioChemika, \geq 99%) foram utilizados para determinar a curva de calibração e realizar os testes de repetitividade e reprodutibilidade do método.

Para determinar a curva de calibração utilizaram-se as seguintes concentrações, partindo de uma solução-estoque de 5 mM em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0): 15, 30, 50, 100, 200, 300 e 500 μ M para GSH e 5, 15, 50, 100, 200, 300 e 500 μ M para GSSG. Cada uma das concentrações foi preparada imediatamente antes da injeção no equipamento. Os testes foram feitos em triplicata e após obtenção da média foi determinada a curva de calibração.

Para determinar a repetitividade do método foram preparadas 6 soluções distintas de GSH e de GSSG 100 μ M no mesmo dia, pelo mesmo analista, e injetadas em triplicata. Para calcular a repetitividade, utilizou-se a média destes valores em triplicata e o desvio padrão.

A reprodutibilidade do método foi determinada pela preparação de 6 soluções de GSH e de GSSG 100 μ M em dias distintos (uma solução a cada dia), pelo mesmo analista e injetadas em triplicata. Para o cálculo, utilizou-se a média destes valores em triplicata e o desvio padrão.

2.4.2 Preparação dos extratos

Os extratos de farinha de trigo foram preparados de acordo com a Figura 3. A concentração final do extrato foi de: 0,175 g de farinha / 100 μ L de tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).

Conforme o fluxograma, descreve-se a preparação do extrato: pesou-se 0,7 g de farinha de trigo em cada um dos 5 tubos distintos e adicionou-se 1 mL de tampão bicarbonato 20 mM (pH 6) a cada tubo. A diluição foi feita com agitação em vortex por 30 min. O conteúdo foi transferido para tubos *ependorf* (1,5 mL) e centrifugado (5000 g, 4°C, 30 min). Os sobrenadantes (250 μ L de cada tubo) foram ultrafiltrados (filtro Microcon, $< M_r$ 3000 kDa,

Amicon, Beverly, MA, Estados Unidos) a 13900 g, 4°C por 50 min. e os filtrados foram recolhidos num único tubo *ependorf* e centrifugados (5000g , 4°C, 3 min.). O extrato foi liofilizado por aproximadamente 15 horas. Alguns extratos foram congelados a – 20°C para posterior reconstituição e análise por EC. Na reconstituição utilizou-se 100 µL de tampão bicarbonato 20 mM (pH 6) e agitação em vortex por 15 min., logo antes da análise por eletroforese capilar.

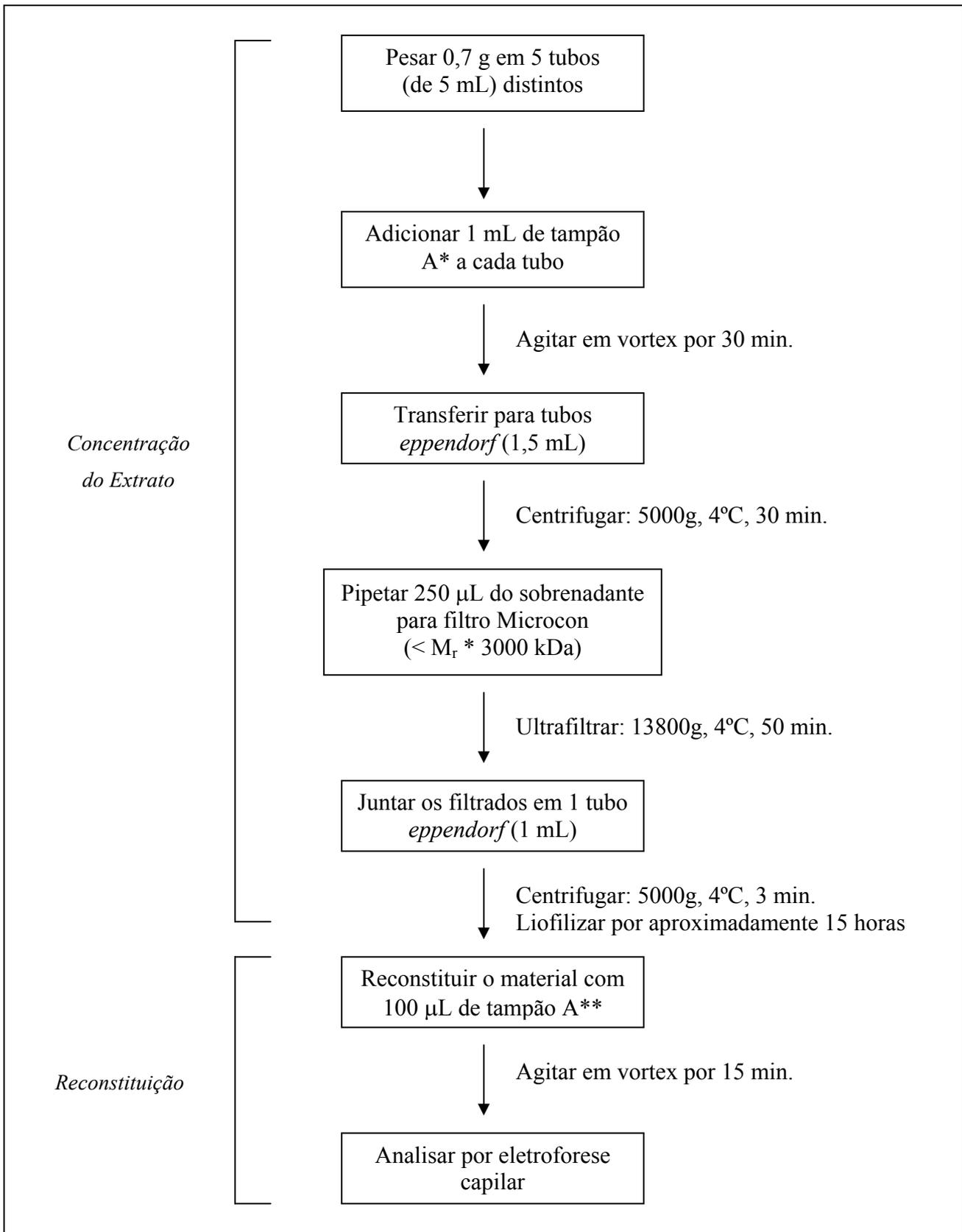


Figura 3. Fluxograma de preparação de extratos de farinha de trigo

* M_r: Massa Molar; ** Tampão A: tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).

2.4.3 Definição das condições de análise

Nas análises das soluções padrão (glutaciona e glutaciona dissulfeto) e dos extratos os seguintes parâmetros foram utilizados:

- voltagem de operação: 15 kV
- pressão e tempo de injeção da amostra no capilar: 0,5 psi, 5 s.
- temperatura do termostato para o capilar: 25 °C.
- corrente elétrica: 6 μ A
- comprimento de onda (λ) de detecção: 200 nm.
- duração: 10 min.
- tampão de corrida: tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2).

Vários tampões de corrida foram testados injetando-se em EC soluções de concentração conhecida dos padrões (5 mM GSH e 5 mM GSSG), entre eles: tampão fosfato + HPMC (pH 2,5), tampão bicarbonato 20 mM + HPMC (pH 6,0), tampão borato 100 mM + Tris + HPMC (pH 8,2), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2). Apenas o último tampão foi adequado às análises por EC, por conferir ao sistema uma corrente elétrica estável, apesar de baixa (6 μ A), e picos estreitos e bem definidos para os analitos.

Utilizou-se injeção por pressão (5 s., 0,5 psi), porque um tempo maior de injeção (10 s.) gerou picos muito largos e menos definidos. O comprimento de onda de absorção foi 200 nm em detector de ultravioleta (UV), devido à indicação na literatura (SERRU et al., 2001; CARRU et al., 2002). A voltagem constante de 15 kV foi a mais indicada para o equipamento utilizado.

Sabe-se que quanto maior a temperatura do capilar mais rápida é a corrida, ou seja, mais rapidamente as substâncias são percebidas pelo detector, revelando os picos em menor tempo. No entanto, temperaturas muito elevadas, às vezes, podem impedir a verificação do pico se as substâncias tiverem uma massa molar muito pequena. Temperaturas muito baixas usadas para separar moléculas muito pesadas podem prolongar muito a detecção das mesmas, o que tende a elevar muito o tempo de corrida. Para GSH e GSSG, peptídeos de baixa massa molar (307,33 e 612,64 g/mol respectivamente) utilizou-se 25 °C no termostato para o capilar, porque os picos apareceram em curto tempo (2 a 3 min.).

A corrente elétrica em torno de 6 μ A foi baixa, mas estável, o que permitiu a obtenção de bons picos (estreitos). Uma corrente elétrica instável indicaria o entupimento do capilar ou alguma falha na corrida (passagem das substâncias e do tampão não satisfatórias).

Utilizou-se capilar de sílica fundida não recoberto (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) de 30 cm de comprimento (10 cm para o detector) e 50 µm de diâmetro interno (DI).

Para acondicionar o capilar antes das injeções, este foi lavado com tampão de corrida durante 20 minutos e injetou-se (0,5 psi, 5 s.) um branco (tampão bicarbonato 20 mM, pH 6,0) 2 vezes dentro do capilar por 10 min. cada. Entre as injeções, o capilar foi enxaguado com solução de NaOH 0,1 N e água ultra-pura (MilliQ) por 2 min. cada.

Todas as soluções foram preparadas com água ultra pura (MilliQ). Antes da injeção no capilar, as soluções foram filtradas (filtro de 0,45 µm), o tampão foi sonificado por 10 min. e a solução de NaOH e a água MilliQ por 1 min. apenas.

2.5 Eletroferogramas das soluções padrão e dos extratos de farinha

Os eletroferogramas foram obtidos e armazenados em software 32 Karat® (Beckman Coulter), acoplado ao equipamento de eletroforese capilar. As áreas dos picos e os tempos de migração dos analitos foram verificados neste software.

2.6 Concentrações de GSH e GSSG nos extratos e na amostra

Foi aplicada a equação de regressão linear (equação da reta) para encontrar as concentrações de GSH e GSSG nos extratos de farinha. Estas concentrações dos extratos foram aplicadas na seguinte equação para determinar as concentrações de GSH e GSSG por grama de farinha de trigo:

$$\text{Concentração de glutatona na farinha (nmol/g)} = \frac{C \times 10^3 \times 10^{-4}}{5 \times 0,7 \times 0,25} \quad \text{Eq. 1}$$

onde, C é a concentração de GSH ou GSSG no extrato (µmol/L) encontrada por eletroforese capilar, 10^3 é o fator para conversão em nmol, 10^{-4} corresponde ao volume de reconstituição final ($100 \mu\text{L} \times 10^{-6} \text{ L}/\mu\text{L}$), 5 é o número de vezes que pesou-se 0,7 g nos tubos (que posteriormente foram unidos num único tubo *ependorf*, correspondendo assim a uma só amostra), 0,7 g é a massa de farinha usada e 0,25 refere-se à alíquota de 250 µL recuperada após a filtração.

2.7 Análise estatística

Foram realizadas análises de média (medida de tendência central), desvio padrão, desvio padrão relativo e coeficiente de variação (medidas de dispersão) e estabelecidos gráficos de dispersão linear (curvas de calibração) e suas respectivas equações da reta, utilizando o software Statistica[®], versão 6.0 (2001). Os limites de repetitividade (r) e de reprodutibilidade (R) foram calculados pela equação: $r = 2,8.s_r$ e $R = 2,8.s_R$, respectivamente, sendo s_r o desvio-padrão de repetitividade (ou de reprodutibilidade) associado aos resultados considerados (s_r ou $s_R = s.t$, onde s é o desvio padrão e t é o valor t de Student).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Escolha da amostra

A cultivar BRS 208 foi escolhida por ter uma força de glúten (296×10^{-4} J) indicada para a fabricação de pão tipo francês e de fôrma, considerando que foi realizado um trabalho subsequente envolvendo a elaboração de massas de pão fresca e congelada. A extração da farinha correspondeu a 47,72 %, considerada uma boa extração.

3.2 Análises físico-químicas

Os teores de umidade, carboidratos, proteínas, extrato etéreo, fibra alimentar e cinzas estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal da farinha de trigo da cultivar BRS 208, safra 2003, lote 166/03

Análise	Quantidade (g/100g de farinha)	
Umidade	14,34	
Carboidratos	84,95	
Proteínas	12,75	
Extrato etéreo (lipídios)	0,36	
Fibra alimentar	Total	1,39
	Solúvel	0,50
	Insolúvel	0,89
Cinzas		0,55

O teor protéico foi elevado e classifica a farinha para panificação, já que o conteúdo indicado é de 10,5 a 12,0% de proteínas (AUTRAN, 1989). Os demais valores (carboidratos, lipídios, fibras alimentares e cinzas) são semelhantes à composição de outras farinhas de trigo.

3.3 Otimização do método de eletroforese capilar (EC) para determinar glutathiona

3.3.1 Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração

As figuras 4 e 5 mostram os eletroferogramas obtidos pelas análises de soluções dos padrões GSH e GSSG a diferentes concentrações: 100 μM e 500 μM , respectivamente.

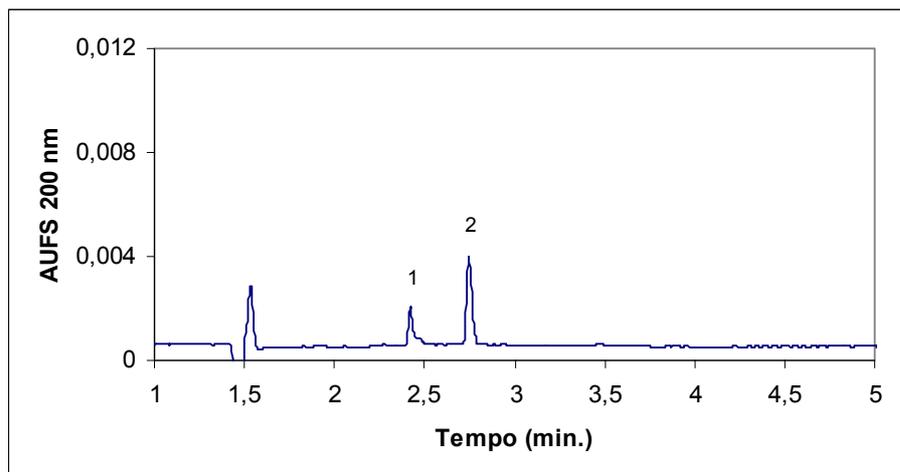


Figura 4. Eletroferograma das soluções de GSH 100 μM (1) e GSSG 100 μM (2) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 μm), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 μA , 25 $^{\circ}\text{C}$, detecção a 200 nm.

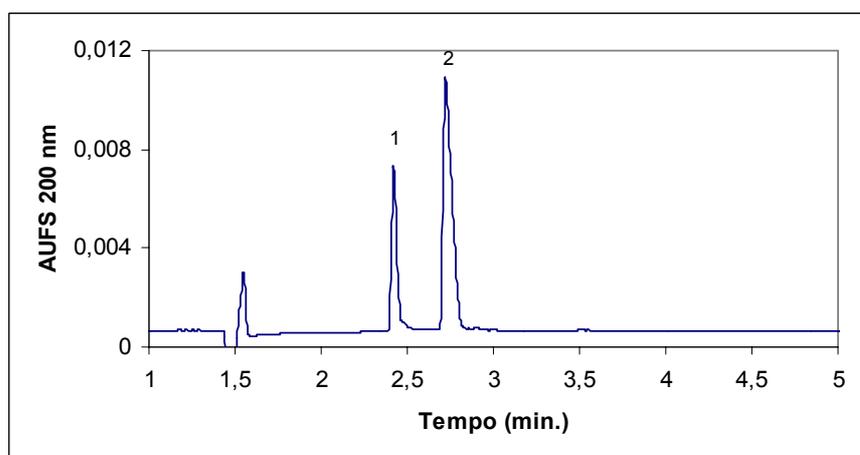


Figura 5. Eletroferograma das soluções de GSH 500 μM (1) e GSSG 500 μM (2) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 μm), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 μA , 25 $^{\circ}\text{C}$, detecção a 200 nm.

O pico de GSH é o que aparece primeiro (Figuras 4 e 5), porque a sua massa molar e a sua carga são menores em relação à GSSG, o que permite à GSH uma velocidade maior de escoamento no interior do capilar até o detector.

Nas condições experimentais usadas, GSH e GSSG possuem carga negativa em tampão de corrida a pH 8,2. Num sistema normal de polaridade estes analitos migram através do cátodo e são separados com base nas suas diferentes densidades de carga empurradas pelo fluxo eletrosmótico (EOF). Na faixa de pH 8,2 a 9,5, GSH e GSSG tendem a se mover contra o EOF, que é ainda suficientemente forte para carregar os analitos ao detector (DAVEY, BAUW E MONTAGU, 1997). A alta força iônica do tampão (ácido bórico 100 mM) causa boa resolução e elevada reprodutibilidade dos picos e o capilar longo (30 cm) não recoberto permite um curto tempo de separação (entre 2 e 3 min.).

As figuras 6 e 7 correspondem às curvas de calibração para GSH e GSSG e as respectivas equações de reta foram $y = 4,5588 + 0,0758x$ para GSH e $y = -4,577 + 0,0383x$ para GSSG, onde y representa a concentração (μM) do padrão e x corresponde à área do pico corrigida (área do pico / tempo de migração). Os coeficientes de correlação (r) para a regressão foram 0,9977 e 0,9994 para GSH e GSSG, respectivamente, mostrando que houve muito boa correlação entre as quantidade de GSH e GSSG injetadas e a detecção por EC, mesmo a baixas concentrações (5 a 500 μM).

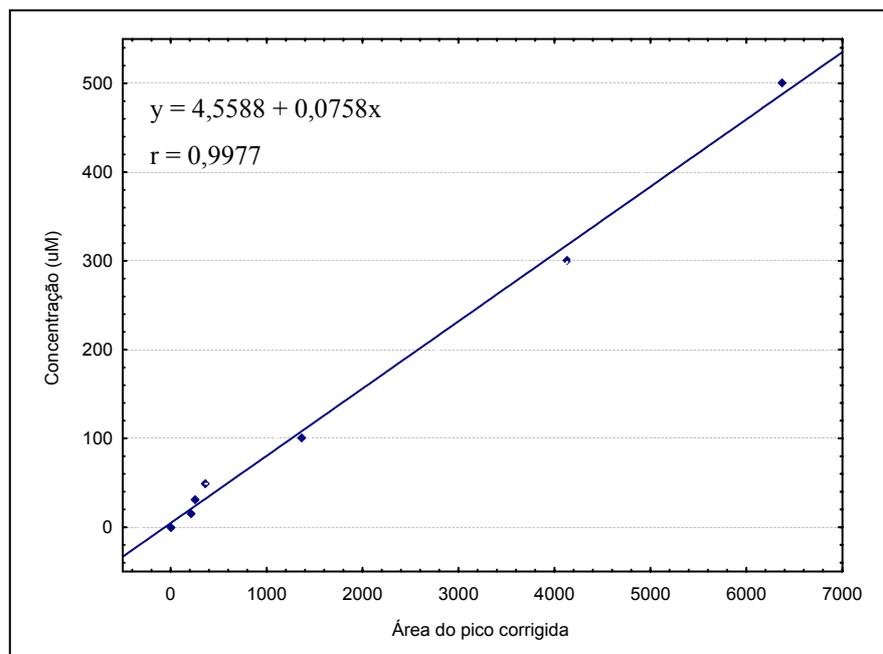


Figura 6. Curva de calibração de glutathione (GSH) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 µm), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 µA, 25°C, detecção a 200 nm.

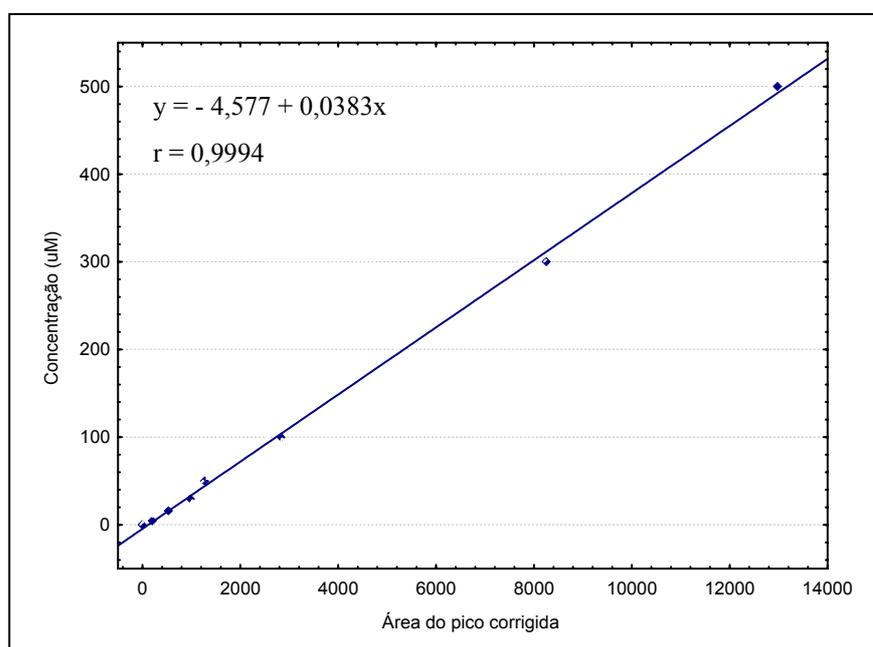


Figura 7. Curva de calibração de glutathione dissulfeto (GSSG) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 µm); tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 µA, 25°C, detecção a 200 nm.

Os limites mínimos de quantificação foram de 5 e 15 μM para GSSG e GSH respectivamente, observados durante as análises de diferentes concentrações das soluções padrão de glutatona e glutatona dissulfeto usadas para a elaboração das curvas de calibração.

Os valores de repetitividade e reprodutibilidade estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Repetitividade do método

Padrão	GSH	GSSG
Concentração adicionada (μM)	100	100
Média da concentração (μM) (n = 4)	130,77	151,89
Desvio padrão	$1,71 \times 10^{-6}$	$11,03 \times 10^{-6}$
Desvio padrão relativo	$1,80 \times 10^{-6}$	$9,55 \times 10^{-6}$
CV%*	$1,30 \times 10^{-6}$	$7,26 \times 10^{-6}$
Limite de repetitividade	$1,23 \times 10^{-5}$	$9,83 \times 10^{-4}$

Nota: * CV% = coeficiente de variação.

O limite de repetitividade (Tabela 2) revela que ao serem feitas duas medições de concentração dos analitos na mesma amostra, no mesmo dia, pelo mesmo analista, a diferença entre estas não poderá ser maior que $1,23 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ para GSH e $9,83 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ para GSSG para serem aceitas na média.

De acordo com Carru et al. (2002), os coeficientes de variação (CV%) na repetitividade do método para área do pico foram 1,53 e 1,66 para GSH e GSSG respectivamente. No trabalho aqui descrito, foi verificado coeficiente de variação (CV%) de $1,30 \times 10^{-6}$ para GSH e $7,26 \times 10^{-6}$ para GSSG (Tabela 2), cujos valores podem ser considerados ótimos em relação à referência recém citada.

Tabela 3. Reprodutibilidade do método

Padrão	GSH	GSSG
Concentração adicionada (μM)	100	100
Média da concentração (μM) (n = 4)	130,77	133,99
Desvio padrão	$1,56 \times 10^{-6}$	$4,64 \times 10^{-6}$
Desvio padrão relativo	$1,54 \times 10^{-6}$	$4,15 \times 10^{-6}$
CV%*	$1,19 \times 10^{-6}$	$3,46 \times 10^{-6}$
Limite de reprodutibilidade	$1,07 \times 10^{-5}$	$3,61 \times 10^{-4}$

Nota: * CV% = coeficiente de variação.

O limite de reprodutibilidade (Tabela 3) indica que ao serem realizadas duas medições de concentração dos analitos na mesma amostra, em dias distintos, pelo mesmo analista, a diferença não deverá ser maior que $1,07 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ para GSH e $3,61 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ para GSSG entre as concentrações para serem aceitas na média. Os baixos valores de CV% demonstram que o método é reprodutível para GSH e GSSG.

Os resultados indicam que o método pode ser aplicado para análises sensíveis de GSH e GSSG com boa repetitividade e reprodutibilidade.

3.3.2 Preparação dos extratos

Foram realizados testes com ácido metafosfórico 50 g/L, desproteinizante e descrito como um dos mais confiáveis agentes de estocagem de glutathiona (SERRU et al., 2001), para preparação dos extratos. Os resultados não foram favoráveis para análise de glutathiona e glutathiona dissulfeto, porque houve grande variação na corrente elétrica durante a corrida em EC e não foi possível identificar os picos dos analitos nos eletroferogramas.

O tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0) foi escolhido para preparar os extratos de farinha de trigo, já que gerou picos dos padrões (GSH e GSSG) mais estreitos e definidos.

Os extratos precisaram ser concentrados por liofilização e reconstituídos em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0) para serem visualizados nos eletroferogramas. Isto foi necessário porque as concentrações de GSH e GSSG na farinha de trigo são pequenas e a detecção por

absorção ultravioleta (UV) é sensível apenas em nível de μM , não sendo possível detectar concentrações mais baixas, como nM , por exemplo.

Utilizou-se uma membrana filtrante Microcon YM-3 (3 kDa NMWL - Limite Nominal de Peso Molecular) e centrifugação para obter uma certa purificação do extrato e melhor visualização dos picos dos analitos (peptídeos) no eletroferograma. Com a ultrafiltração, as enzimas, proteínas e outras moléculas (lipídios, amido) com massa molar maior que 3000 kDa são removidas. O uso deste tipo de filtro não requer a adição de agentes precipitantes de proteínas (ácido perclórico, metafosfórico, tricloroacético) e, geralmente, minimiza as mudanças oxidativas de glutathione à glutathione dissulfeto (PICCOLI et al, 1994). Este procedimento também é mais rápido e mais eficiente em manter a formação de GSSG tão baixa quanto possível durante a preparação da amostra (CARRU et al, 2002).

3.4 Eletroferogramas dos extratos

A Figura 8 mostra os eletroferogramas das análises dos extratos de farinha (1,75 g/mL), sendo fácil a visualização de GSH e GSSG nos extratos de farinha de trigo (Figura 8A, picos 1 e 2), mais evidente ainda na Figura 8B, com adição das soluções padrão.

De acordo com os eletroferogramas, 2-3 min. são suficientes para identificar GSH e GSSG. Isso permite a análise de maior número de amostras em pequeno espaço de tempo, comprovando que a EC se caracteriza pela facilidade e rapidez da análise. O tempo para a análise completa por EC foi reduzido a 14 min., incluindo o enxágüe do capilar entre as corridas, em relação aos métodos tradicionais de HPLC, que necessitam de 20 a 40 min. de análise (REED et al., 1980; LI, BOLLECKER E SCHOFIELD, 2004).

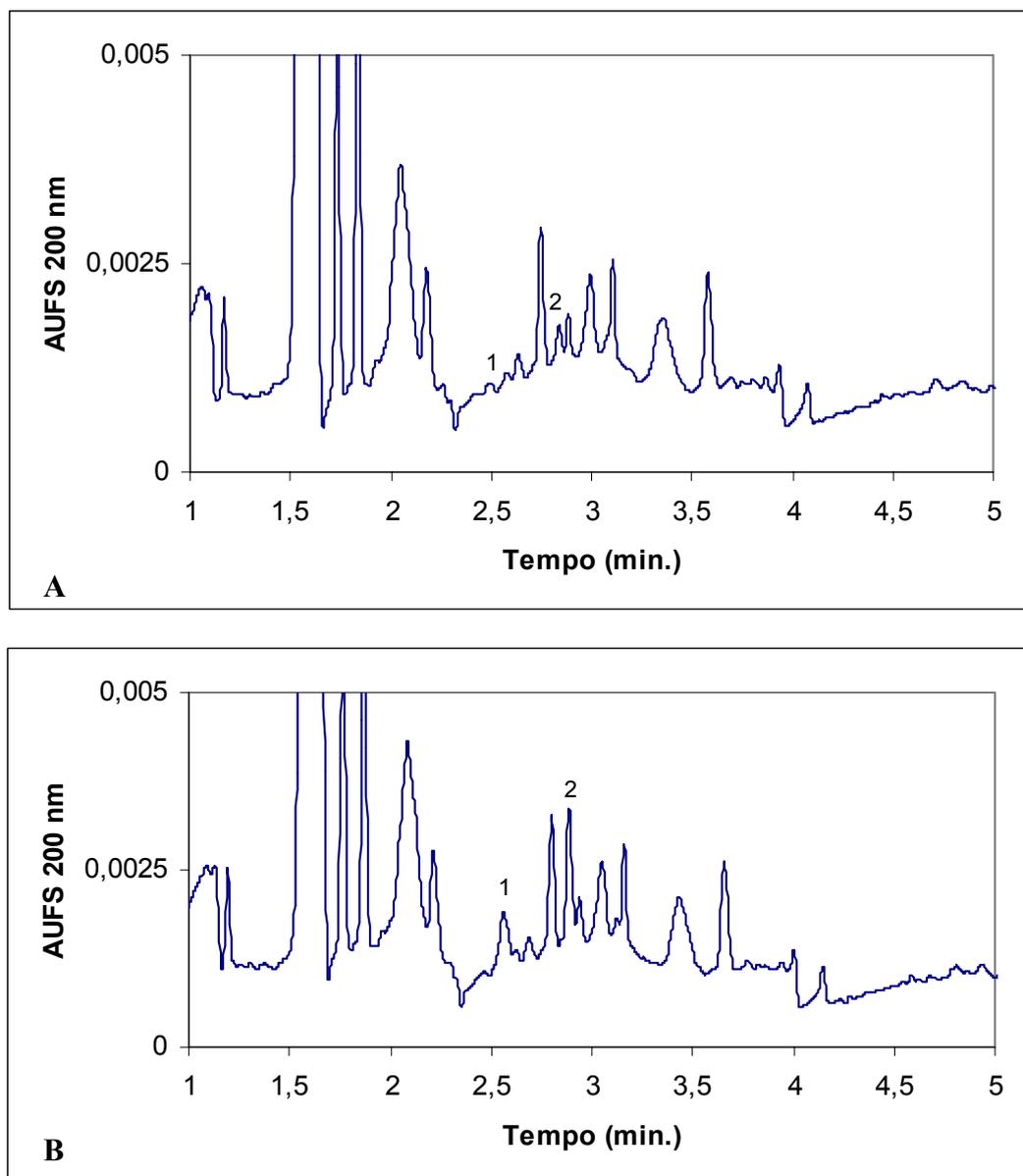


Figura 8. Eletroferogramas do extrato de farinha de trigo em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). A: extrato (1,75 g/mL); B: extrato (1,63 g/mL) + solução padrão GSH (41,67 μ M) e GSSG (20,83 μ M). Pico 1: GSH; Pico 2: GSSG. Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 μ m), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 μ A, 25 $^{\circ}$ C, detecção a 200 nm.

3.5 Concentrações de GSH e GSSG presentes nos extratos e na amostra

A Tabela 4 apresenta as médias das concentrações de GSH e GSSG no extrato de farinha de trigo e os respectivos desvios padrão das análises. O número de repetições (n) está especificado na tabela.

Tabela 4. Concentrações de GSH e GSSG no extrato de farinha de trigo BRS 208 (2003)

Extrato (n = 8)	GSH	GSSG
Concentração (μM)	19,13	23,54
Desvio padrão	4,54	3,53
Desvio padrão relativo	4,25	3,30

As médias das concentrações de GSH e GSSG na amostra de farinha e os respectivos desvios padrão estão descritos na Tabela 5. Os valores revelam baixos desvios padrão entre as medições o que demonstra que o método é reprodutível.

Tabela 5. Concentrações de GSH e GSSG na amostra de farinha de trigo BRS 208 (2003)

Amostra (n = 8)	GSH	GSSG
Concentração (nmol/g farinha)	2,19	2,69
Desvio padrão	0,52	0,40
Desvio padrão relativo	0,48	0,38

Verificou-se que as concentrações de GSH e GSSG na amostra de farinha de trigo se aproximam das quantidades encontradas em outros artigos científicos (Tabela 6), como por exemplo com os valores encontrados por Chen e Schofield (1996).

De acordo com alguns estudos (SCHOFIELD E CHEN, 1995; CHEN E SCHOFIELD, 1996), a estocagem da farinha branca de trigo a 4 °C por 90 dias e a 20 °C por 10 dias, respectivamente, resultaram em valores substancialmente reduzidos de GSH e GSSG, fato ainda inexplicável. Chen e Schofield (1996) verificaram redução de 57% e 28% nos teores de

GSH e GSSG, respectivamente, em 10 dias de estocagem a 20 °C. Este pode ter sido o motivo principal para os valores reduzidos de GSH e GSSG encontrados neste trabalho em relação aos estudos que analisaram os grãos recém-moídos. Assim, verifica-se a necessidade de padronizar o tempo entre a moagem e a análise da farinha.

De acordo com Li, Bollecker e Schofield (2004), o nível de compostos de glutatona devem ser tomados como um controle da qualidade padrão de farinhas, fato totalmente explicável através da Tabela 6.

Tabela 6. Comparação dos valores de GSH e GSSG em farinha de trigo branca encontrados por diferentes autores

Referências	Método de análise e amostra	Concentrações (nmol/g farinha)	
		GSH	GSSG
Funck e De Francisco (2006)*	Eletroforese capilar e absorção UV (cultivar BRS 208, Brasil, colheita 2003; 2 meses de armazenagem a 22 °C)	2,19	2,69
Li, Bollecker e Schofield (2004)	HPLC (36 variedades de trigo de UK, colheita 1998; grãos recém moídos)	62 - 144	36 - 100
Schofield e Chen (1995)	HPLC (11 cultivares de trigo de UK, colheita 1989; grãos recém moídos)	18 - 81	12 - 27
Schofield e Chen (1995)	HPLC (cultivar <i>Galahad</i> , UK, colheita 1989; 90 dias de armazenagem a 4 °C)	10,8	8,5
Chen e Schofield (1996)	HPLC 1) cultivar <i>Haven</i> ; várias semanas a 4 °C	5,1	8,9
	2) cultivar <i>Mercia</i> , 10 dias a 20 °C	89	17

Nota: * Valores obtidos nesta dissertação.

4 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que:

- Foi desenvolvido um método simples, rápido e eficaz para separar e quantificar simultaneamente glutathiona (GSH) e glutathiona dissulfeto (GSSG) em extratos de farinha de trigo por eletroforese capilar de zona com detecção por absorção ultravioleta.
- A performance analítica foi muito boa na especificidade, linearidade, repetitividade e reprodutibilidade.
- O tempo de preparação dos extratos da amostra ainda é um pouco longo, o que pode ser aperfeiçoado com outras técnicas de concentração da amostra nos extratos.
- O tempo de análise por eletroforese capilar (14 min.) mostrou-se mais curto em relação aos obtidos por métodos de HPLC (20-40 min.).
- Foi possível separar GSH e GSSG nos extratos sem aplicar precipitação ácida ou agentes antioxidantes (N-etilmaleimida), usando apenas com a filtração por membranas (Microcon, < M_r 3000 kDa).
- As concentrações de GSH e GSSG foram 2,19 e 2,69 nmol/g de farinha, respectivamente, e são comparáveis aos teores encontrados por procedimentos de HPLC descritos na literatura científica, considerando o tempo de estocagem da amostra analisada.
- Este método permite estudos futuros para a determinação de níveis de glutathiona e glutathiona dissulfeto em demais farinhas de trigo de diferentes cultivares brasileiros, classificando as melhores farinhas para a utilização na panificação em relação às concentrações de GSH e GSSG associadas ao teor e à qualidade das proteínas gliadina e glutenina.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**. 10 ed. Saint Paul: AACC, 1995.
- 2 AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**. 10 ed. Saint Paul: AACC, 2000. (CD-ROM).
- 3 AUTRAN, J. C. Soft wheat: view from France. **Cereal Foods World**, v. 34, p. 667-676, 1989.
- 4 BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprovar o regulamento técnico de identidade e de qualidade do trigo. Instrução Normativa nº 7, de 15 de agosto de 2001. D.O.U., 21 de agosto de 2001.
- 5 CARRU, C. et al. Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. **Electrophoresis**, v.23, p.1716-1721, 2002.
- 6 CHEN, X.; SCHOFIELD, J. D. Changes in the glutathione content and breadmaking performance of white wheat flour during short-term storage. **Cereal Chemistry**, v.73, n.1, p.1-4, 1996.
- 7 DAVEY, M. W.; BAUW, G.; MONTAGU, M. V. Simultaneous high-performance capillary electrophoresis analysis of the reduced and oxidized forms of ascorbate and glutathione. **Journal of Chromatography B**, v.697, p.269-276, 1997.
- 8 DOTTO, S. R. et al. **Cultivar de trigo BRS 208: produtividade, rusticidade e qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.
- 9 MARQUAT, L.; SLAVIN, J. L.; FULCHER, R. G. **Whole-grain foods in health and disease**. Minnesota: AACC, 2002. p.128-134.
- 10 LI, W.; BOLLECKER, S. S.; SCHOFIELD, J. D. Glutathione and related thiol compounds. I. Glutathione and related thiol compounds in flour. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.205-212, 2004.
- 11 PICCOLI, G. et al. Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. **Journal of Chromatography A**, v.676, p.239-246, 1994.
- 12 REED, D. J. et al. High performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. **Analytical Biochemistry**, n. 106, p. 55-62, 1908.
- 13 SCHOFIELD, J. D.; CHEN, X. Analysis of free reduced and free oxidized glutathione in wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v.21, p.127-136, 1995.

- 14 SCHWARTZ, H. E.; GUTTMAN, A.; VINTHER, A. Separation of peptides and proteins. In: CAMILLERI, P. **Capillary electrophoresis: theory and practice**. CRC Press, 1998. 2 ed., p.363-374.
- 15 SERRU, V. et al. Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. **Clinical Chemistry**, v.47, n.7, p.1321-1324, 2001.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA E GLUTATIONA DISSULFETO EM MASSAS DE PÃO FRESCA E CONGELADA POR ELETROFORESE CAPILAR COM ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA

¹ Trabalho a ser submetido para a revista *Cereal Chemistry*.

RESUMO

Concentrações de glutatona (GSH) e glutatona dissulfeto (GSSG) foram determinadas em massas de pão fresca e congelada por um novo método de eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção por absorção ultravioleta (UV). Os extratos foram preparados após diluição da massa em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6), centrifugação, ultrafiltração do sobrenadante (filtro Microcon, $M_r = 3000$ kDa), liofilização e reconstituição com tampão bicarbonato 20 mM (pH 6). Utilizou-se o equipamento P/ACE MDQ (Beckman Coulter, San Ramon, CA) com detector de absorção UV a 200 nm. Os limites mínimos de quantificação foram de 5 e 15 μM para GSSG e GSH respectivamente. O método apresentou boa correlação linear, com coeficientes de correlação (r) de 0,9977 para GSH e 0,9994 para GSSG ($p < 0,005$). Verificou-se apenas a presença de GSSG, equivalente a 106,02 e 90,90 μM nos extratos de massa fresca e congelada, respectivamente, e 10,60 e 9,09 nmol/g de massa fresca e congelada (amostras), respectivamente. Não houve diferença significativa nos teores de GSSG entre as massas fresca e congelada nos extratos e nas amostras. O método apresentou simples preparação dos extratos, curto tempo de migração (2-3 min.), especificidade para os analitos e boa repetitividade e reprodutibilidade.

Palavras-chave: massa de pão, glutatona, glutatona dissulfeto, eletroforese capilar, absorção ultravioleta.

ABSTRACT

Determination of glutathione and glutathione disulfide in fresh and frozen dough by capillary electrophoresis with ultraviolet detection

Glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) concentrations were determined in fresh and frozen dough using a new capillary zone electrophoresis method with ultraviolet (UV) detection. The extracts were diluted in 20 mM bicarbonate buffer (pH 6.0), centrifuged, ultrafiltrated (Microcon, cut-off 3000 kDa), freeze dried and reconstituted in 20 mM bicarbonate buffer (pH 6.0). The analyses were done in Beckman P/ACE MDQ system (Coulter, San Ramon, CA) equipped with UV detector at 200 nm. The minimum quantification limits were 5 μM and 15 μM for GSSG and GSH respectively. The method showed good linear correlation and the correlation coefficients (r) were 0,9977 for GSH and 0,9994 for GSSG ($p < 0,005$). Only GSSG was verified, equivalent to 106,02 and 90,90 μM in fresh and frozen dough respectively, while in the samples these were 10,60 e 9,09 nmol/g fresh and frozen dough, respectively. There wasn't significant difference in GSSG levels between fresh and frozen dough in extracts and samples. The method has simple extract preparation, short migration time (2-3 min.), specificity for analytes and good repetitivity and reproducibility.

Key words: dough, glutathione, glutathione disulfide, capillary electrophoresis, ultraviolet detection.

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento do pão aliado à necessidade de reduzir os custos operacionais e expandir o mercado, têm levado panificadores a exigirem novas tecnologias e o desenvolvimento de novos métodos de produção de massas (BÁGUENA et al., 1991). O congelamento é um dos melhores métodos de preservação conhecido, empregado para retardar as alterações na qualidade dos alimentos. O mercado para produtos de panificação congelados tem crescido rapidamente e, no Brasil, ainda trata-se de uma tecnologia recente e pouco estudada (GUTKOSKI et al, 2005). Com massas congeladas, as padarias conseguem produzir pães frescos e de alta qualidade, a custos inferiores (PALMER, 1994).

Na América do Norte observa-se necessidades dos consumidores similares as percebidas globalmente: produtos práticos, saudáveis e inovadores, com destaque para ingredientes congelados para assar/cozinhar, como as massas de pão congeladas. Na América Latina a categoria “Refeições congeladas” cresceu 25% em 2001 (ACNielsen, 2002).

Glutathione existe naturalmente nas formas glutathione (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e glutathione ligada a proteínas (PSSG) em farinha de trigo (CHEN E SCHOFIELD, 1995; SCHOFIELD E CHEN, 1995). O grupo sulfidril (SH) da GSH pode ser facilmente oxidado à forma dissulfeto (SS), formando GSSG e PSSG sob condições anaeróbicas ou catalisadas pela enzima glutathione desidrogenase (LI, BOLLECKER E SCHOFIELD, 2004). Apesar da baixa concentração de glutathione na farinha, seu importante papel nas reações redox tem sido relacionado com as propriedades reológicas dos pães (KUNINORI E MATSUMOTO, 1964; ARCHER, 1972). Há estudos mostrando nenhuma relação bem definida entre a quantidade de glutathione em níveis normais nas formas livres ou ligada a proteínas com os atributos de qualidade da farinha para panificação (LI, BOLLECKER E SCHOFIELD, 2004; SCHOFIELD E CHEN, 1995; CHEN E SCHOFIELD, 1995), provavelmente devido aos níveis muito baixos destes tióis livres.

A alta concentração de compostos sulfidril de baixa massa molar (M_r) na farinha pode causar uma rede redutora das ligações dissulfeto das proteínas através de duas reações sulfidril/dissulfeto (SH/SS) em cadeia e os compostos SH oxidam a SS (Figura 1). A baixas concentrações, uma simples reação SH/SS em cadeia pode clivar uma ligação protéica SS, mas, neste caso, os produtos são um dissulfeto misto (P-S-S-R), a partir da proteína (P-S-S-P) e do composto sulfidril de baixo M_r (R-SH), e um grupo sulfidril protéico (P-SH) - Figura 1a. Tais reações SH/SS, a baixas concentrações de compostos sulfidril de baixa M_r , podem também facilitar o rearranjo dissulfeto nas proteínas, porque o dissulfeto misto pode reagir

com um novo grupo sulfidril protéico para formar uma nova ligação protéica dissulfeto, sendo o composto sulfidril de baixo M_r o agente redutor. Estas reações podem fornecer um mecanismo para relaxamento do estresse na massa de pão durante a mistura e o descanso (EWART, 1968).

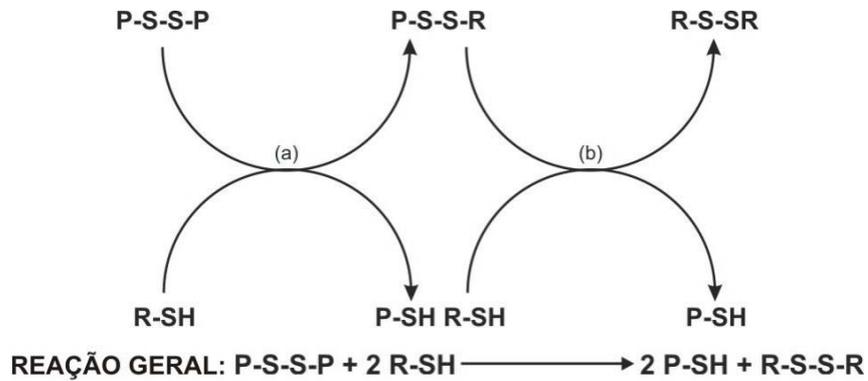


Figura 1. Representação esquemática da clivagem da ligação protéica dissulfeto por duas reações consecutivas SH/SS entre as cadeias (P = proteína; S-S = ligação dissulfeto; R-SH = composto sulfidril de baixo M_r)

Jones e Carnegie (1969) verificaram que dentre os peptídeos dissulfeto presentes na farinha, apenas GSSG influenciou a reologia das massas de pão quando adicionado a esta, mostrando que há alguma especificidade na sua reatividade com as proteínas da farinha durante a mistura da massa. Chen e Schofield (1995) observaram que a reação de GSSG com as proteínas da farinha é uma das principais reações envolvendo glutathione durante a etapa de mistura da massa.

Quanto à estrutura polimérica da glutenina e às reações redox que podem afetá-la, tem sido reportado o papel da glutathione (SCHOFIELD E CHEN, 1995). A enzima glutathione desidrogenase oxida a glutathione durante os processos de panificação. A GSH reage rapidamente e promove ligações dissulfeto com as proteínas da farinha. Se gluteninas de alta massa molar forem despolimerizadas, a viscosidade da massa diminui (BELITZ E GROSH, 1999). A adição de GSH tem sido relatada por seu grande efeito nas propriedades reológicas das massas de pão (INOUE E BUSHUK, 1991; INOUE et al., 1994). GSSG também tem um efeito enfraquecedor na massa (REED E PEPPLER, 1973), já que participa das reações consecutivas SH/SS com grupos sulfidril das proteínas, assim, a GSH liberada reagirá com as ligações dissulfeto das proteínas (JONES E CARNEGIE, 1971).

Grosh e Sarwin (1994) fizeram testes de extensão em massas de pão adicionadas de GSH em níveis similares aos encontrados em farinhas e as massas ficaram enfraquecidas. A remoção de GSH durante a estocagem poderia, portanto, aumentar a força da massa e a performance da panificação (CHEN E SCHOFIELD, 1996).

Oxidantes (bromato de potássio, ácido ascórbico) têm efeitos melhoradores nos pães, devido à oxidação de GSH a GSSG, ocorrendo rápida queda nos níveis de GSH e aumento nos de GSSG durante os estágios iniciais de mistura da massa (CHEN E SCHOFIELD, 1995; SARWIN, LASKAWY E GROSCHE, 1993). A formação de PSSG, possivelmente envolvendo grupos SH ou SS das proteínas, é uma reação significativa durante a mistura, embora isto fique em segundo plano em relação à oxidação de GSH a GSSG (CHEN E SCHOFIELD, 1996).

A massa pode enfraquecer após ciclos de gelo-degelo, devido ao aumento da concentração de substâncias redutoras (enzimas, glutatona) liberadas das leveduras mortas e que provocam a redução das proteínas do glúten ou a redistribuição da água (INOUE E BUSHUK, 1991; INOUE et al., 1994; EL-HADY, EL-SAMAHY E BRÜMMER, 1999).

Levando em consideração a influência que GSH e GSSG podem ter na performance de panificação, principalmente em massas de pão congeladas, este trabalho teve como objetivos: a) otimizar um método quantitativo de eletroforese capilar para determinar GSH e GSSG, simultaneamente e por detecção com absorção ultravioleta (UV), em massas de pão fresca e congelada, b) determinar as concentrações de GSH e GSSG nas massas fresca e congelada, c) verificar se houve diferenças significativas entre estas concentrações nas amostras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

2.1.1 Farinha de trigo

A amostra de farinha de trigo BRS 208, safra 2003 (Figura 2) foi fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Trigo) de Passo Fundo, RS. Uma das características desta cultivar é sua força de glúten (W), equivalente a 282×10^{-4} J (DOTTO et al., 2001), que a classifica em trigo para panificação (BRASIL, 2001), motivo pelo qual foi escolhida para a realização deste trabalho.



Figura 2. Grão de trigo da cultivar BRS 208, safra 2003, lote 166/03

A força de glúten (alveógrafo Chopin, modelo MA-95, equipado com Alveolink, Villeneuve-la-Garenne, França) e o número de queda - *falling number* (Perten Instruments, modelo 3100, com peneira de 8 mm de abertura, Huddinge, Suíça) dos grãos da cultivar foram determinados pelos métodos 54-30 e 56-81B (AACC, 2000), respectivamente, pelos pesquisadores da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

A amostra de farinha foi embalada em sacos de polietileno e armazenada à temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) por 60 dias antes de ser utilizada na elaboração das massas de pão.

2.1.2 Massas de pão

As massas de pão fresca e congelada foram elaboradas no laboratório de Química de Cereais localizado em *Food and Agricultural Products Research Center*, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos.

Para elaboração da massa de pão, determinou-se a umidade da farinha usando infravermelho (IR). A absorção de água foi medida em farinógrafo (Branbender, Modelo OHG, Duisburg, Alemanha), de acordo com o método 54-21 (AACC, 1995), resultando em 64,4 %. A quantidade de água adicionada na massa foi 27,37 mL, calculada usando a equação: $V_a = A_a - (V_d + 5 \text{ mL de ácido ascórbico} + 10 \text{ mL de malte})$, onde V_a = volume de água, A_a = absorção de água e V_d = volume deslocado pela solução açúcar-sal.

A fórmula da massa de pão incluiu: 100% de farinha, 2,1 % de fermento instantâneo (Fermipan, American Yeast Sales Corp., Derry, lote 03661R1G1), 1,5 % de sal, 4,5 % de gordura (Crisco, The J.N. Smucken Company, Orrville, OH, lote 44667), 4 % de açúcar, 50

ppm de ácido ascórbico e 0,25 % de malte (Malt Products Corp., Saddle Brook, NJ 07663) em base de farinha (URIYAPONGSON, 2002). A massa foi preparada em misturador (National MTG Co., Lincoln, NE) durante 5 minutos (método 10-10B, AACC, 1995), moldada na forma de uma bola única e colocada numa fôrma esmaltada e untada e fermentada a 30 °C e umidade relativa de 85 % durante 55 min. (Fermentation Cabinet model 505-11. National Manuf., Lincoln, NE) (URIYAPONGSON, 2002). A massa fresca foi imediatamente usada para preparação dos extratos. Para preparar a massa congelada, a massa fresca foi transferida da fôrma para um saco plástico limpo e colocada a – 30 °C por 30 min. (congelamento rápido) e a – 20 °C (congelamento lento) até o momento de preparação dos extratos, aproximadamente 22-31 dias.

As análises foram realizadas nos extratos preparados a partir das massas e nas próprias amostras (massas de pão fresca e congelada).

2.2 Microestrutura do grão de trigo

Os grãos de trigo foram fracionados transversalmente, para expor a superfície do endosperma, e aderidos nos suportes de alumínio com cera condutiva marca LKB, antes de serem recobertos com uma fina camada de ouro, em metalizador, modelo D2 Diode Sputtering System (International Scientific Instruments). As amostras foram observadas em microscópio Philips XL 30 com detector de elétrons secundários acoplado.

2.3 Equipamento

Utilizou-se o equipamento P/ACETM MDQ (Beckman Coulter, San Ramon, CA) com detector de absorção ultravioleta (UV), injetor e amostrador automáticos, conectado ao software 32 Karat[®] (Beckman Coulter, San Ramon, CA) para coleta dos dados – eletroferogramas. As análises foram realizadas no laboratório de Química de Cereais localizado em *Food and Agricultural Products Research Center*, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos.

2.4. Otimização do método de eletroforese capilar (EC) para determinar glutatona

2.4.1 Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração

Os padrões de glutatona (GSH, SigmaUltra, 98-100%) e glutatona dissulfeto (GSSG, BioChemika, $\geq 99\%$) foram utilizados para determinar a curva de calibração e para realizar os testes de repetitividade e reprodutibilidade do método.

Para determinar a curva de calibração utilizaram-se as seguintes concentrações, partindo de uma solução-estoque de 5 mM em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0): 15, 30, 50, 100, 200, 300 e 500 μM para GSH e 5, 15, 50, 100, 200, 300 e 500 μM para GSSG. Cada uma das concentrações foi testada em triplicata e após obtenção da média foi determinada a curva de calibração.

Para determinar a repetitividade do método foram preparadas 6 soluções distintas de GSH e de GSSG 100 μM no mesmo dia, pelo mesmo analista, e injetadas em EC em triplicata. Para calcular a repetitividade, utilizou-se a média destes valores em triplicata e o desvio padrão.

Para determinar a reprodutibilidade do método foram preparadas 6 soluções de GSH e de GSSG 100 μM em dias distintos (uma solução a cada dia), pelo mesmo analista, e injetadas em triplicata. A reprodutibilidade foi calculada usando a média destes valores em triplicata e o desvio padrão.

2.4.2 Preparação dos extratos

Os extratos de massa de pão fresca e congelada foram preparados conforma a Figura 3. A concentração final no extrato foi de 0,2 g de massa / 100 μL de tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).

O extrato de massa de pão congelada foi preparado com o degelo por aproximadamente 15 min. à temperatura ambiente (22°C), pesagem de 0,8 g de massa em cada um de 5 tubos distintos (5 mL) e adição de 1 mL de tampão bicarbonato 20 mM (pH 6) a cada tubo. Os tubos foram agitados em vortex por 30 min. O conteúdo foi transferido para tubos *ependorf* (1,5 mL), que foram centrifugados (5000 g, 4°C, 30 min). Os sobrenadantes (250 μL de cada tubo) foram ultrafiltrados (filtro Microcon, $< M_r$ 3000 kDa, Amicon, Beverly, MA, Estados Unidos) a 13900 g, 4°C por 50 min. e os filtrados recolhidos num

único tubo *ependorf*, que foi centrifugado (5000g , 4°C, 3 min.). Procedeu-se à liofilização (em torno de 15 horas). Alguns extratos foram congelados à – 20°C para posterior reconstituição e análise por EC. A reconstituição foi feita com 100 µL de tampão bicarbonato 20 mM (pH 6) e agitação em vortex por 15 min., logo antes da análise por eletroforese capilar.

O extrato de massa fresca foi preparado seguindo os mesmos passos de preparação do extrato de massa congelada, após manter a massa recém-elaborada a 4°C para atingir a temperatura de 22°C.

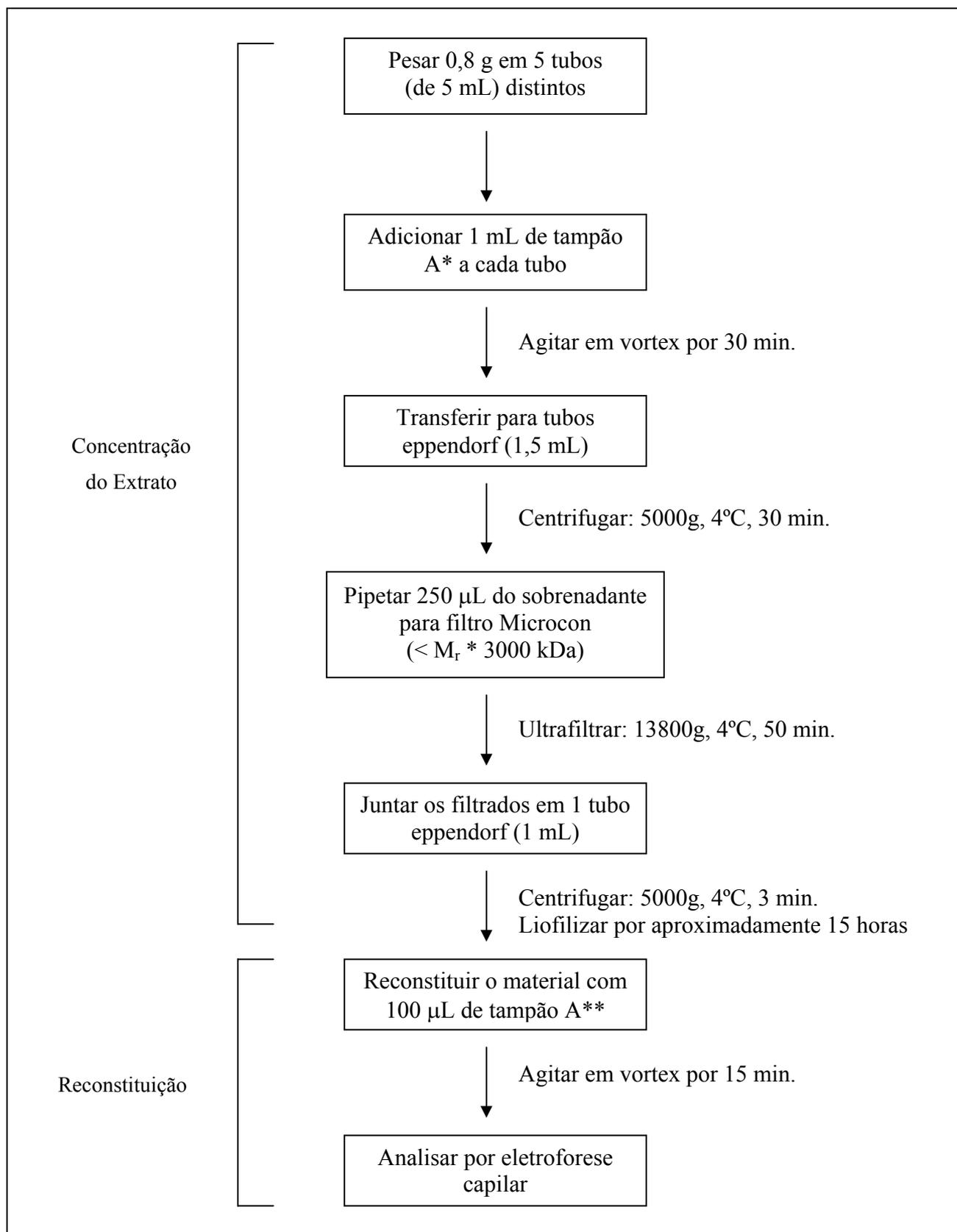


Figura 3. Fluxograma de preparação dos extratos de massa de pão

* M_r : Massa Molar; ** Tampão A: tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).

2.4.3 Definição das condições de análise

Os padrões e extratos foram separados em capilar de sílica fundida não recoberto (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) de 30 cm de comprimento (10 cm para o detector) e 50 μm de diâmetro interno (DI).

As condições de análise para as soluções padrão (glutaciona e glutaciona dissulfeto) e para os extratos foram:

- voltagem de operação: 15 kV
- pressão e tempo de injeção da amostra no capilar: 0,5 psi, 5 s.
- temperatura do termostato para o capilar: 25 °C.
- corrente elétrica: 6 μA
- comprimento de onda (λ) do detector: 200 nm.
- duração: 10 min.
- tampão de corrida: tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2).

Utilizou-se o tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), porque apresentou corrente elétrica estável ao sistema (6 μA), picos estreitos e bem definidos para os analitos. Optou-se pela injeção por pressão (5 s., 0,5 psi) para amostras e soluções padrão, já que a injeção por 10 s. não originou picos desejáveis (largos e de difícil definição de área). A voltagem constante de 15 kV foi escolhida por indicação para o equipamento de EC utilizado. Foi usado o comprimento de onda de absorção a 200 nm em detector de absorção ultravioleta (UV) devido à indicação na literatura (SERRU et al., 2001; CARRU et al., 2002). A temperatura ideal foi 25 °C, já que os peptídeos GSG e GSSG, de baixa massa molar, apareceram em curto espaço de tempo (2-3 min.) nos eletroferogramas.

Para acondicionar o capilar antes das injeções, este foi lavado com tampão de corrida durante 20 min. e injetou-se (0,5 psi, 5 s.) um branco (tampão bicarbonato 20 mM, pH 6,0) 2 vezes de 10 min. cada. Entre as injeções das soluções padrão e das amostras, o capilar foi enxaguado com solução de NaOH 0,1 N e água ultra-pura (MilliQ) por 2 min. cada.

Todas as soluções foram preparadas com água ultra pura (MilliQ). Antes da injeção no capilar, as soluções foram filtradas (filtro de 0,45 μm), o tampão foi sonicado por 10 min. e a solução de NaOH e a água MilliQ por 1 min. apenas.

2.5 Eletroferogramas das soluções padrão e dos extratos de farinha

Os eletroferogramas foram obtidos e armazenados em software 32 Karat[®] (Beckman Coulter, San Ramon, CA), acoplado ao equipamento de eletroforese capilar. As áreas dos picos e os tempos de migração dos analitos foram verificados neste software.

2.6 Concentrações de GSH e GSSG nos extratos e nas amostras

Foi aplicada a equação de reta para encontrar as concentrações de GSH e GSSG nos extratos de massas fresca e congelada. Estas concentrações foram aplicadas na seguinte equação para determinar as concentrações de GSH e GSSG por grama de amostra (massa fresca ou congelada):

$$\text{Concentração de glutathiona (nmol/g)} = \frac{C \times 10^3 \times 10^{-4}}{5 \times 0,8 \times 0,25} \quad \text{Eq. 1}$$

onde, C é a concentração de GSH ou GSSG no extrato ($\mu\text{mol/L}$) encontrada por eletroforese capilar, 10^3 é o fator para conversão em nmol, 10^{-4} corresponde ao volume de reconstituição final ($100 \mu\text{L} \times 10^{-6} \text{ L}/\mu\text{L}$), 5 é o número de vezes que pesou-se 0,8 g nos tubos (que posteriormente foram unidos num único tubo, correspondendo assim a uma só amostra), 0,8 g é a massa de farinha usada e 0,25 refere-se à alíquota de 250 μL recuperada após a filtração.

2.7 Análise estatística

Foram realizadas análises de média (medida de tendência central), desvio padrão, desvio padrão relativo e coeficiente de variação (medidas de dispersão) e estabelecidos gráficos de dispersão linear (curvas de calibração) e suas respectivas equações da reta. Para comparar as concentrações de GSSG entre as massas fresca e congelada, utilizou-se ANOVA, com intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Foi utilizado o software Statistica[®], versão 6.0 (2001). Os limites de repetitividade (r) e de reprodutibilidade (R) foram calculados pela equação: $r = 2,8 \cdot s_r$ e $R = 2,8 \cdot s_R$, respectivamente, sendo s_r o desvio-padrão de repetitividade (ou de reprodutibilidade) associado aos resultados considerados (s_r ou $s_R = s \cdot t$, onde s é o desvio padrão e t é o valor t de Student).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Escolha da amostra

A cultivar BRS 208 foi escolhida por ter uma força de glúten indicada para a fabricação de pão tipo francês e de fôrma (DOTTO et al., 2001) e pelo seu alto teor protéico (12,75 %), considerando a elaboração de massas de pão fresca e congelada neste trabalho. A força de glúten calculada foi 296×10^{-4} J, cujo valor mínimo de 180×10^{-4} J é indicado para classificar a farinha para panificação (BRASIL, 2001). O número de queda foi 504 segundos, sendo o valor mínimo para panificação igual a 200 segundos (BRASIL, 2001).

3.2 Microestrutura do grão de trigo

As micrografias do grão de trigo cultivar BRS 208, safra 2003, são apresentadas nas Figuras 4 e 5. Pode-se observar a textura compacta característica do endosperma com alto teor de proteínas. A ausência de espaços aéreos e a compactação resultante ocorrem devido à forte ligação entre os grânulos de amido e a matriz de proteínas (Figura 4b). Esta textura foi localizada principalmente na parte externa e distal, enquanto que, no centro dos grãos e próximo do germe, a textura observada mostra-se um pouco mais relaxada ou farinácea (Figura 4a). Nota-se que os grãos de amido estão mais esféricos nesta região (Figura 4a) do que no endosperma compacto. A microestrutura confirma a qualidade da cultivar de trigo utilizada como apropriada para panificação, com alto teor de proteína.

A Figura 5 apresenta a nítida camada simples de aleurona (apenas uma única camada de células), característica do grão de trigo.

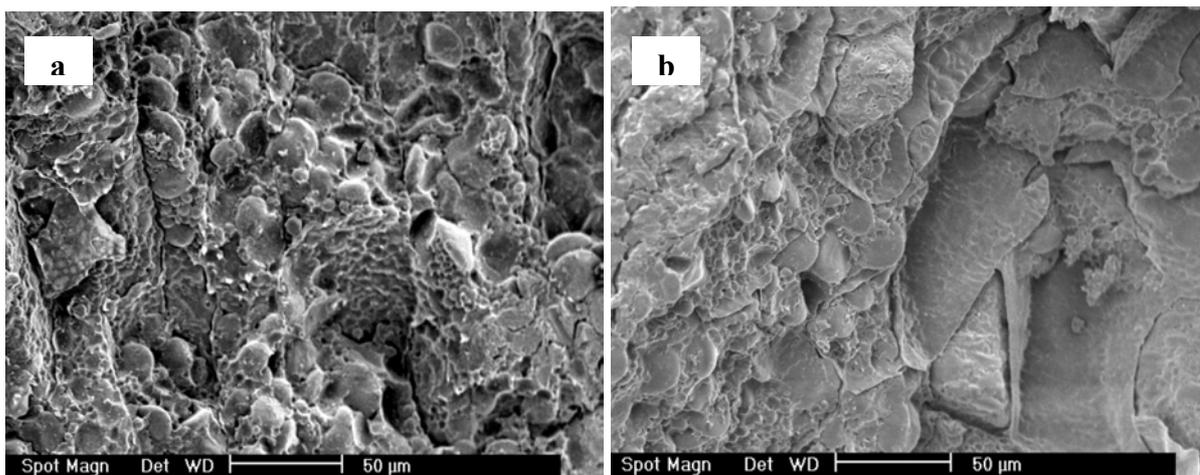


Figura 4. Micrografia do endosperma amiláceo (a) parte central, apresentando textura farinácea com grânulos de amido definidos e soltos e (b) parte distal do grão, com textura compacta com grânulos de amido fortemente aderidos à na matriz de proteínas e as estruturas não são muito bem definidas.

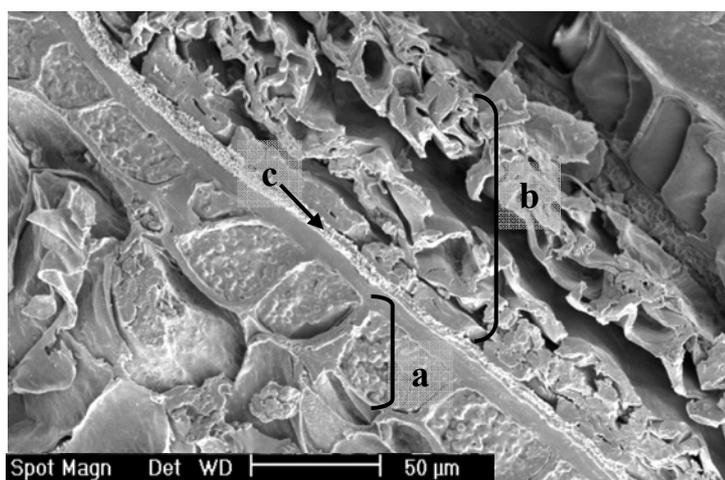


Figura 5. Micrografia da parte externa e camada de aleurona do grão de trigo (a). Verifica-se a camada simples de aleurona. Outras estruturas: (b) pericarpo e (c) revestimento da semente.

3.3 Otimização do método de eletroforese capilar (EC) para determinar glutatona

3.3.1 Preparação dos padrões e determinação da curva de calibração

A Figura 6 mostra o eletroferograma com os picos das soluções dos padrões GSH e GSSG a 300 μM .

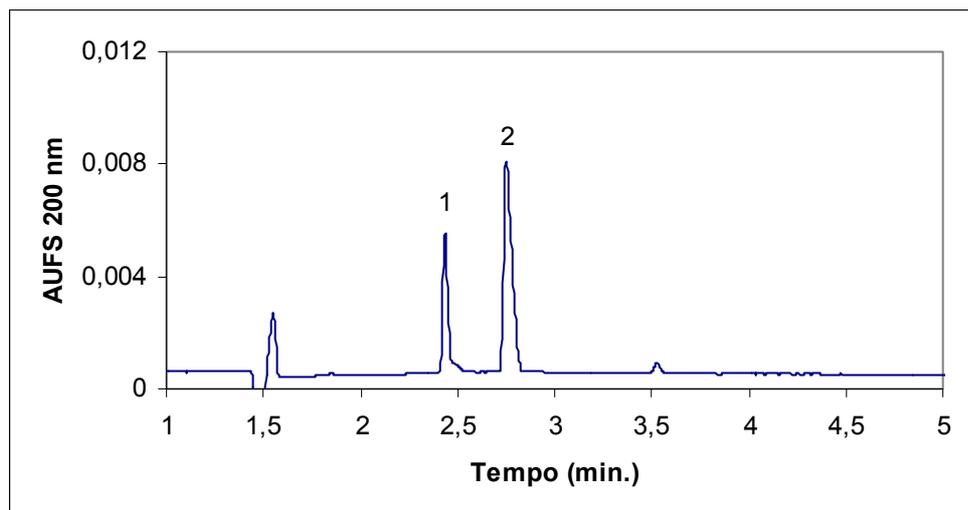


Figura 6. Eletroferograma das soluções de GSH 300 μM (1) e GSSG 300 μM (2) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 μm), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 μA , 25 $^{\circ}\text{C}$, detecção a 200 nm.

A partir das curvas de calibração para GSH e GSSG (Figuras 7 e 8) obtiveram-se as equações da reta: $y = 4,5588 + 0,0758x$ para GSH e $y = -4,577 + 0,0383x$ para GSSG, onde y representa a concentração (μM) do padrão e x corresponde à área do pico corrigida (área do pico / tempo de migração). Os coeficientes de correlação (r) das curvas de calibração foram 0,9977 para GSH e 0,9994 para GSSG ($p < 0,005$). Houve boa correlação linear entre o pico e a quantidade de GSH e GSSG nas faixas de 15 a 500 $\mu\text{mol/L}$ e 5 a 500 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

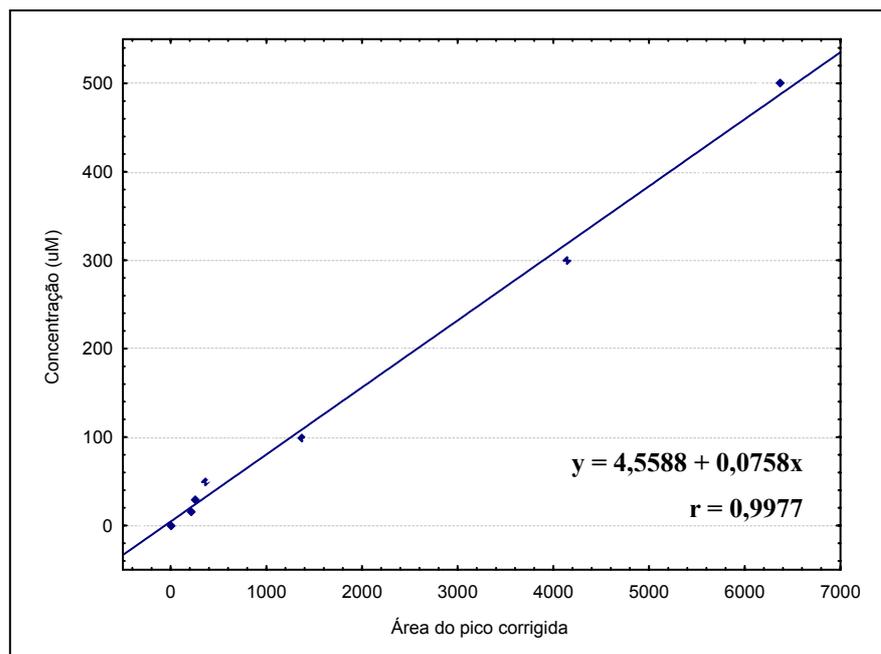


Figura 7. Curva de calibração de glutathione (GSH) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 µm), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 µA, 25°C, detecção a 200 nm.

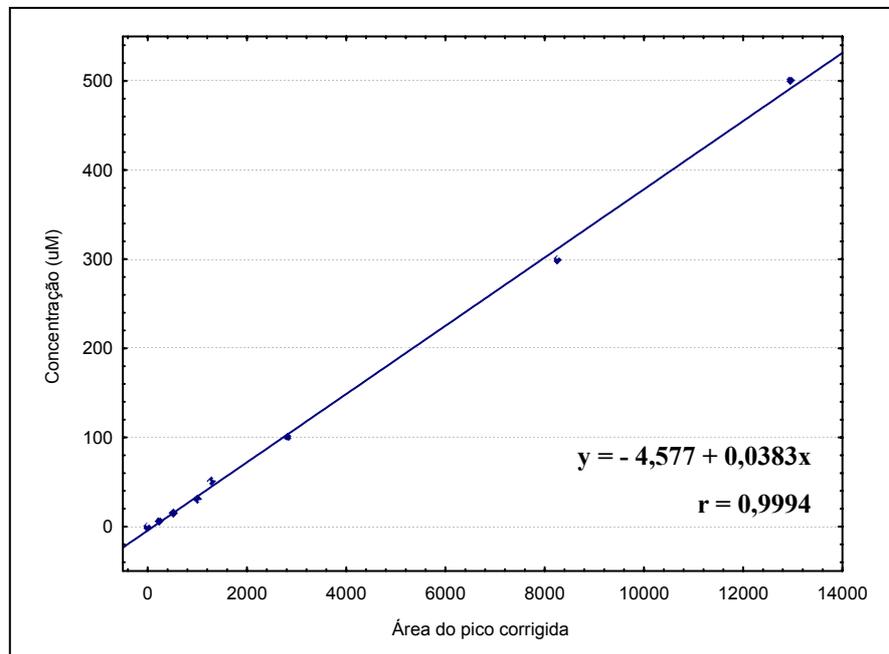


Figura 8. Curva de calibração de glutathione dissulfeto (GSSG) em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 µm), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 µA, 25°C, detecção a 200 nm.

Os limites mínimos de quantificação foram de 15 μM para GSH e 5 μM para GSSG.

O limite de repetitividade calculado indicou que ao serem feitas duas medições de concentração dos analitos na mesma amostra, no mesmo dia, pelo mesmo analista, a diferença entre as concentrações não poderia ser maior que $1,23 \times 10^{-5}$ μM para GSH e 98,28 μM para GSSG para serem aceitas na média.

Quanto aos valores de coeficiente de variação (CV%), o método apresentou melhor repetitividade entre as medições para GSH ($1,3046 \times 10^{-6}$) em relação a GSSG (7,2627). O mesmo ocorreu com a reprodutibilidade: GSH ($1,1909 \times 10^{-6}$ %) e GSSG (3,4635 %).

Considerando o limite de reprodutibilidade, conclui-se que quando duas medições de concentração dos analitos forem realizadas na mesma amostra, em dias distintos, pelo mesmo analista, a diferença não deveria ser maior que $1,07 \times 10^{-5}$ μM para GSH e 36,06 μM para GSSG entre as concentrações para serem aceitas na média.

Os resultados indicam que o método pode ser aplicado para análises sensíveis de GSH e GSSG com boa repetitividade e reprodutibilidade.

3.3.2 Preparação dos extratos

O tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0) foi escolhido para preparar os extratos de massa de pão fresca e congelada, já que os eletroferogramas mostraram picos dos padrões (glutaciona e glutaciona dissulfeto) mais estreitos e definidos.

Utilizou-se a liofilização para concentrar os extratos. A reconstituição destes foi feita com tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0), permitindo a identificação dos picos em EC. Isto foi necessário, porque as concentrações de GSH e GSSG nas massas de pão são pequenas e a detecção por absorção ultravioleta (UV) é sensível apenas em nível de $\mu\text{mol/L}$ (ZHANG, HU E CHEN, 2005), não sendo possível detectar concentrações mais baixas, como nmol/L , por exemplo.

Optou-se pelo uso de uma membrana filtrante Microcon YM-3 (3 kDa NMWL - Limite Nominal de Massa Molar) para melhor identificação dos picos dos analitos (peptídeos) no eletroferograma. Na ultrafiltração, as enzimas, proteínas e outras moléculas (lipídios, amido...) com massa maior que 3000 kDa são removidas. A filtração também minimiza as mudanças oxidativas de glutaciona à glutaciona dissulfeto (PICCOLI et al., 1994). Este procedimento também é mais rápido e mais eficiente em manter a formação de GSSG tão baixa quanto possível durante a preparação da amostra (CARRU et al., 2002).

3.4 Eletroferogramas dos extratos

As Figuras 9 e 10 mostram os eletroferogramas das análises dos extratos de massa de pão fresca (2 g/mL) e massa de pão congelada (2 g/mL). Observa-se o rápido aparecimento do pico de GSSG (2-3 min.), o que permite a análise de maior número de amostras em pequeno espaço de tempo.

O tempo para a análise completa por EC foi reduzido a 14 min., incluindo o enxágüe do capilar entre as injeções das amostras, em relação aquele dos tradicionais métodos de HPLC, que necessitam de 20 a 40 min. de análise (REED et al., 1980; LI, BOLLECKER E SCHOFIELD, 2004).

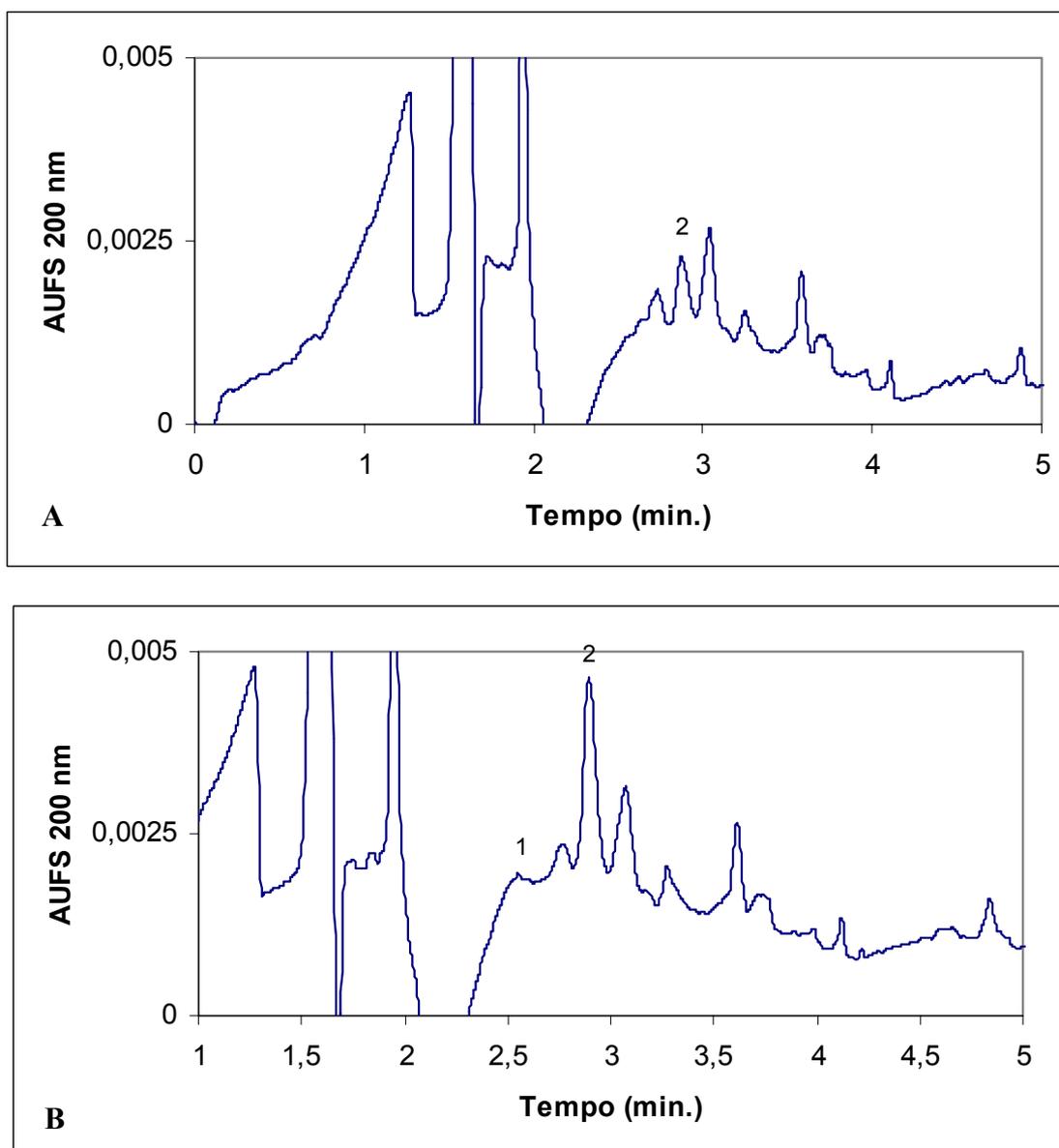


Figura 9. Eletroferogramas dos extratos de massa de pão fresca em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). A: extrato (1,87 g/mL); B: extrato (1,87 g/mL) + solução padrão GSH (166,67 μ M) e GSSG (83,33 μ M). Pico 1: GSH; Pico2: GSSG. Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 μ m), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 μ A, 25 $^{\circ}$ C, detecção a 200 nm.

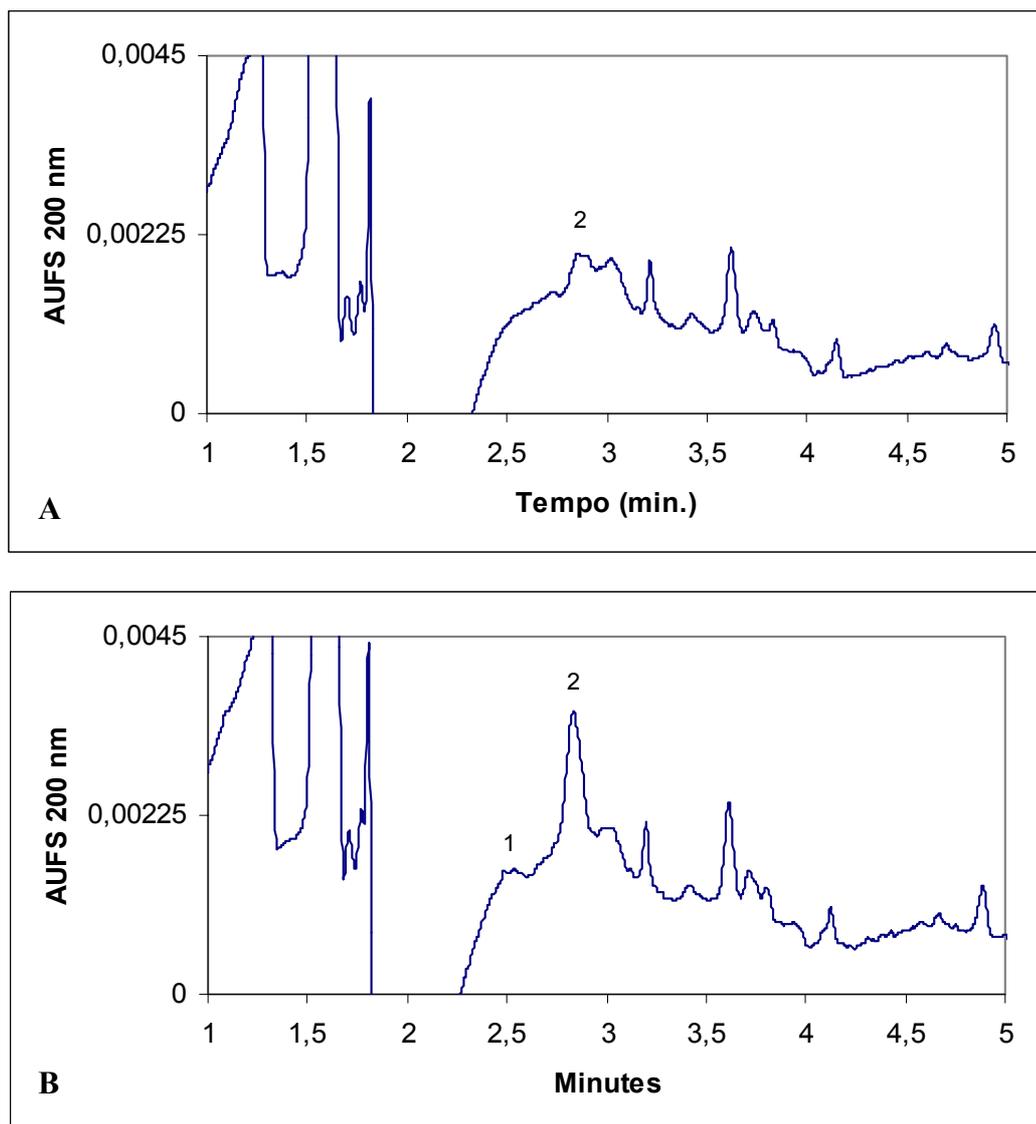


Figura 10. Eletroferogramas dos extratos de massa de pão congelada em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0). A: extrato (1,87 g/mL); B: extrato (1,87 g/mL) + solução padrão GSH (166,67 μ M) e GSSG (83,33 μ M). Pico 1: GSH; Pico2: GSSG. Injeção: 0,5 psi, 5 s. Condições de corrida: capilar de 30 cm (10 cm para o detector; DI = 50 μ m), tampão borato 100 mM + Tris (pH 8,2), 15 kV, 6 μ A, 25 $^{\circ}$ C, detecção a 200 nm.

Não foi possível identificar glutathiona (GSH) nos extratos de massa fresca e congelada (somente evidente na Figura 9B e 10B, com adição de solução padrão de GSH). Assim, se pressupõe que apenas glutathiona dissulfeto (GSSG) está presente nestes extratos, mas a detecção por UV pode não ser sensível suficiente, já que é baixa a concentração de GSH nestes extratos.

A Tabela 1 demonstra que não há diferença significativa, analisando tanto o extrato quanto a amostra. O processo de congelamento poderia ter provocado um aumento nos teores de GSSG, devido à morte das leveduras, liberação e oxidação de GSH na matriz da massa de pão, mas isto não aconteceu.

Tabela 1. Comparação entre as concentrações de GSSG nos extratos de massa de pão fresca e congelada

Concentração de GSSG	Massa fresca	Massa congelada
Extrato (μM)	106,02 ^a	90,90 ^a
Amostra (nmol/g de massa)	10,60 ^a	9,09 ^a

Nota: Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os picos de GSH não foram identificados nos eletroferogramas das massas, provavelmente devido à complexidade da matriz massa de pão, seja pela presença de gordura ou de agente oxidante (ácido ascórbico) utilizados na formulação. Esta complexidade, pode ter provocado a oxidação da glutathiona durante o procedimento de preparação do extrato ou até mesmo durante o período de congelamento. A liberação de moléculas reduzidas das leveduras, como GSH e GSSG (INOUE E BUSHUK, 1991; INOUE et al., 1994), durante o congelamento, têm efeito no enfraquecimento das massas, devido à clivagem das ligações dissulfeto entre as proteínas da farinha de trigo (REED E PEPPLER, 1973) para formarem outras ligações SS com GSH e GSSG.

3.5 Concentrações de GSH e GSSG presentes nos extratos e nas amostras

A Tabela 2 apresenta as médias das concentrações de GSH e GSSG nos extratos das massas fresca e congelada. O número de repetições (n) está especificado ao lado de cada tipo de extrato na tabela.

Tabela 2. Concentrações de GSH e GSSG nos extratos de massas de pão

Extrato de massa de pão	Concentração GSH (μM)	Concentração GSSG (μM)
Fresca (n = 5)	nd *	106,02
Congelada (n = 4)	nd *	90,90

Nota: * nd = não detectável.

A Tabela 3 mostra as médias das concentrações de GSH e GSSG nas amostras de massas de pão fresca e congelada e os seus respectivos desvios padrão. Os valores revelam baixos desvios padrão entre as medições, demonstrando que o método é reproduzível.

Tabela 3. Concentrações de GSH e GSSG nas amostras de massa de pão

Amostras de massa de pão		GSH	GSSG
Fresca (n = 5)	Concentração (nmol/g de massa)	nd *	10,60
	Desvio padrão	-	1,99
	Desvio padrão relativo	-	1,79
Congelada (n = 4)	Concentração (nmol/g de massa)	nd *	9,09
	Desvio padrão	-	2,09
	Desvio padrão relativo	-	1,81

Nota: * nd = não detectável.

Chen e Schofield (1995) estudaram o efeito de melhoradores oxidantes na dinâmica da glutathiona e confirmaram uma rápida perda de GSH e um aumento dos níveis de GSSG durante os estágios iniciais de mistura da massa. Os níveis de PSSG (glutathiona ligada às proteínas) também aumentaram devido aos oxidantes. A adição de ácido ascórbico (oxidante) à massa, neste trabalho, pode ser uma provável explicação para a identificação de apenas GSSG nos eletroferogramas dos extratos das massas, não esquecendo que o congelamento também pode ter influenciado neste ponto.

Os níveis naturais de tióis livres na farinha de trigo são relativamente baixos (KUNINORI E MATSUMOTO, 1964; ARCHER, 1972). Ewart (1988) verificou que a

qualidade do pão começou a cair apenas quando adicionou-se 200-300 nmol de GSH/g de farinha. Pode ser sugerido que os níveis naturais destes compostos não afetam as propriedades reológicas da massa e a performance de panificação. No entanto, se este nível for maior que o normal e se mais de 150 nmol de GSH/g for adicionado, a massa enfraquecerá (DONG E HOSENEY, 1995). Portanto, o teor de compostos de glutatona deve ser tomado como um controle da qualidade padrão de farinhas (LI, BOLLECKER E SCHOFIELD, 2004), principalmente as destinadas à panificação.

Nakamura e Kurata (1997) verificaram que a adição de GSH e GSSG, ambas à concentração de 93,6 nmol/g de farinha, reduziu drasticamente a dureza da massa de pão, tornando-a quase impossível de medir. GSH é um tripeptídeo com dois resíduos de aminoácidos carregados negativamente. O grupo mais reativo é o SH da cadeia lateral da cisteína, um agente redutor, que pode clivar as ligações SS nas proteínas e criar grupos SH livres, levando à redução na dureza da massa. Esta redução também pode ser consequência da adição de GSSG, que poderia ser, em parte, devido ao aumento das reações SH-SS entre as moléculas de proteína na massa. Kline e Sugihara (1968) sugeriram que o enfraquecimento da massa de pão sob congelamento foi em parte causada pela perda de substâncias redutoras das células mortas de levedura.

As quantidades de GSSG encontradas neste estudo são menores do que as utilizadas por Nakamura e Kurata (1997) e provavelmente não afetarão a dureza das massas de pão. Assim, a eletroforese capilar é uma técnica muito útil para identificar variedades de trigo e prever sua qualidade da panificação em relação aos teores de glutatona e glutatona dissulfeto.

4 CONCLUSÃO

- Foi estabelecido um método de eletroforese capilar para determinar GSH e GSSG em massas de pão fresca e congelada, utilizando detecção por absorção ultravioleta.
- O método desenvolvido apresentou boa linearidade, repetitividade e reprodutibilidade para GSH e GSSG.
- A determinação dos analitos ocorre em curto período de tempo (2-3 min.), sendo mais rápida do que em métodos como HPLC.
- Apenas GSSG foi identificada nas massas e seus valores foram 10,60 e 9,09 nmol/g em massas de pão fresca e congelada respectivamente.
- Não houve diferença significativa no teor de GSSG entre massas fresca e congelada.
- Conforme verificado, os níveis de GSSG encontrados nas massas não prejudicariam a performance da panificação.
- A EC é uma técnica muito útil para identificar variedades de trigo e predizer sua qualidade para panificação em relação aos teores de GSH e GSSG.
- É necessário melhorar a extração de GSH a partir das massas de pão (fresca e congelada) para verificar se há ou não a presença de GSH nestas amostras ou se esta substância foi oxidada ou modificada durante a preparação do extrato ou da mistura.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**. 10 ed. Saint Paul: AACC, 1995.
2. AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**. 10 ed. Saint Paul: AACC, 2000. (CD-ROM).
3. ACNielsen. **Os produtos mais quentes do mundo: informações sobre o crescimento de alimentos e bebidas**. Relatório executivo de notícias, ACNielsen Global Services, 2002.
4. ARCHER, M. J. Relationship between free glutathione content and quality assessment parameters of wheat cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 855-865, 1972.
5. BÁGUENA, R. et al. Viability and performance of pure yeast strains in frozen wheat dough. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1690-1694, 1991.
6. BELITZ, H. D.; GROSH, W. **Food Chemistry**. Berlin: Springer, 1999.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprovar o regulamento técnico de identidade e de qualidade do trigo. Instrução Normativa nº 7, de 15 de agosto de 2001. D.O.U., 21 de agosto de 2001.
8. CARRU, C. et al. Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. **Electrophoresis**, v.23, p.1716-1721, 2002.
9. CHEN, X.; SCHOFIELD, J. D. Determination of protein-glutathione mixed disulfides in wheat flour. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 2362-2368, 1995.
10. CHEN, X.; SCHOFIELD, J. D. Changes in the glutathione content and breadmaking performance of white wheat flour during short-term storage. **Cereal Chemistry**, v.73, n.1, p.1-4, 1996.
11. DONG, W. HOSENEY, R. C. Effect of certain breadmaking oxidants and reducing agents on dough rheological properties. **Cereal Chemistry**, v.72, p.58-64, 1995.
12. DOTTO, S. R. et al. **Cultivar de trigo BRS 208: produtividade, rusticidade e qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.
13. EL-HADY, EL-SAMAHY, S. K.; BRÜMMER, J.-M. Effect of oxidants, sodium-stearoyl-2-lactylate and their mixtures on rheological and baking properties of nonprefermented frozen doughs. **Lebensm.-Wiss. Technol**, v. 32, p. 446-454, 1999.
14. EWART, J. A. D. A hypothesis for the structure and rheology of glutenin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.19, p.617-623, 1968.

15. EWART, J. A. D. Thiols in flour and breadmaking quality. **Food Chemistry**, v.28, p.207-218, 1988.
16. GROSH, W.; SARWIN, R. Quantification of free and protein-bound glutathione in wheat flours and doughs. In: **Gluten proteins**, Detmold: Association of Cereal Research, 1993.
17. GUTKOSKI, L. C. et al. Efeitos de ingredientes na qualidade da massa de pão de fôrma congelada não fermentada durante o armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.3, p.460-467, 2005.
18. INOUE, Y.; BUSHUK, W. Studies on frozen dough. I. Effects of frozen storage and freeze-thaw cycles on baking and rheological properties. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 627-631, 1991.
19. INOUE, Y. et al. Studies on frozen dough. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. **Cereal Chemistry**, v. 71, p. 118-121, 1994.
20. JONES, I. K.; CARNEGIE, P. R. Rheological activity of peptides, simple disulphides and simple thiols in wheaten dough. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 20, p. 60-64, 1969.
21. JONES, I. K.; CARNEGIE, P. R. Binding of oxidized glutathione to dough proteins and a new explanation, involving thiol disulphide interchange, of the physical properties of dough. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 22, p. 358-364, 1971.
22. KLINE, L.; SUGIHARA, T. F. Frozen bread doughs. I. Prepared by the straight dough method. **Baker's Digest**, v.42, n.5, p.44-50, 1968.
23. KUNINORI, T.; MATSUMOTO, H. Glutathione in wheat and wheat flour. **Cereal Chemistry**, v.42, p.252-259, 1964.
24. LI, W.; BOLLECKER, S. S.; SCHOFIELD, J. D. Glutathione and related thiol compounds. I. Glutathione and related thiol compounds in flour. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.205-212, 2004.
25. NAKAMURA, M. KURATA, T. Effect of L-ascorbic acid on the rheological properties of wheat flour-water dough. **Cereal Chemistry**, v.74, n.5, p.647-650, 1997.
26. PALMER, E. Food companies are buying into frozen dough. **Milling & Baking News**, v. 73, p. 28-30, 1994.
27. PICCOLI, G. et al. Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. **Journal of Chromatography A**, v.676, p.239-246, 1994.
28. REED, G.; PEPLER, H. J. **Yeast Technology**. Westport: The AVI Publishing Company, 1973. 378p.

29. REED, D.J. et al. High-Performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p.55-62, 1980.
30. SARWIN, R.; LASKAWY, G.; GROSCHE, W. Changes in the levels of glutathione and cysteine during the mixing of doughs with *L-threo*- and *D-erythro*-ascorbic acid. **Cereal Chemistry**, v.70, p.553-557, 1993.
31. SCHOFIELD, J. D.; CHEN, X. Analysis of free reduced and free oxidized glutathione in wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v.21, p.127-136, 1995.
32. SERRU, V. et al. Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. **Clinical Chemistry**, v.47, n.7, p.1321-1324, 2001.
33. URIYAPONGSON, J. **The effects of additives on dough rheological properties of pre-proofed frozen dough and baking quality of bread sticks**. 2002. 117 f. Tese (Doutorado em Filosofia), Oklahoma State University, Stillwater, 2002.
34. ZHANG, J.; HU, Z.; CHEN, X. Quantification of glutathione and glutathione disulfide in human plasma and tobacco leaves by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Talanta**, v.65, p.986-990, 2005.

CONCLUSÃO GERAL

- Foram estabelecidos métodos de eletroforese capilar para detectar glutathione (GSH) e glutathione disulfide (GSSG) em farinha de trigo e massas de pão fresca e congelada, usando detector de absorção ultravioleta.
- As condições de preparo dos extratos possibilitou a detecção de GSH e GSSG apenas depois de concentrá-los usando a técnica de liofilização e posterior reconstituição em tampão bicarbonato 20 mM (pH 6,0).
- É necessário verificar se o tempo de preparação dos extratos de farinha e de massa de pão influencia nas determinações de GSH ou GSSG, por exemplo, aumentando as concentrações de GSSG por processos de oxidação com o oxigênio do ar ou da água.
- Provavelmente as maiores concentrações de GSSG encontradas nas massas fresca e congelada, em relação à concentração na farinha, se devem a ingredientes presentes na formulação das massas, como ácido ascórbico (oxidante). O processo de mistura e da massa também propicia a oxidação da glutathione (GSH), uma vez que há grande disponibilidade de grupos sulfidril livres nas proteínas da farinha de trigo.
- Apesar de grande quantidade dos compostos serem retirados dos extratos analisados após a filtração usando membrana de poros muito pequenos ($M_r = 3000$ kDa), a gordura e o malte podem ter interferido na obtenção dos picos por eletroforese capilar ou ainda mascarado o pico de glutathione (GSH), que não foi verificado nos eletroferogramas dos extratos de massas de pão.
- Os resultados deste trabalho poderão ser aplicados para melhorar o controle de qualidade de farinhas de trigo e massas de pão, principalmente das congeladas. Com a utilização do método de eletroforese capilar aqui descrito, isto seria muito mais rápido, fácil e utilizando mínimas quantidades de amostras em relação a outras técnicas já existentes.

- Os níveis de GSSG foram maiores nas massas fresca (10,60 nmol/g) e congelada (9,09 nmol/g) quando comparados àqueles na farinha (2,69 nmol/g). Isto pode comprovar que o processo de mistura e a presença de oxidantes na massa poderiam ter provocado certo grau de oxidação na GSH livre.

SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

- Analisar os padrões GSH e GSSG e os extratos de farinha, massa de pão fresca e congelada utilizando eletroforese capilar com detector de fluorescência, que apresenta maior sensibilidade que o detector com detecção por absorção ultravioleta (UV).
- Determinar as quantidades de GSH e GSSG em farinhas de trigo provenientes de diferentes cultivares, o que poderia auxiliar na classificação das melhores farinhas para a utilização em panificação.
- Verificar se a quantidade de GSH e GSSG presentes na farinha de trigo pode influenciar (reduzir) a qualidade dos pães feitos de massas frescas – comparação entre farinhas de trigo com diferentes concentrações de GSH e GSSG.
- Utilizar o método desenvolvido para determinar os analitos em massas de pão formuladas sem adição de oxidantes (ácido ascórbico).
- Utilizar um padrão interno nas análises para reduzir as flutuações na sensibilidade do detector, na injeção da amostra, e aumentar a repetitividade e reprodutibilidade