

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**GISELE DOS SANTOS PETLA**

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PAPAÍNA E BROMELINA PARA  
HIDRÓLISE PROTEICA EM FARINHA DE TRIGO**

**PONTA GROSSA**

**2022**

**GISELE DOS SANTOS PETLA**

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PAPAÍNA E BROMELINA PARA  
HIDRÓLISE PROTEICA EM FARINHA DE TRIGO**

**Study of the use of Papain and Bromelain enzymes for protein  
hydrolysis in Wheat Flour**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Me. Luis Alberto Chavez Ayala

**PONTA GROSSA**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**GISELE DOS SANTOS PETLA**

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PAPAÍNA E BROMELINA PARA  
HIDRÓLISE PROTEICA EM FARINHA DE TRIGO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação  
apresentado como requisito para obtenção do título  
de Bacharel em Engenharia Química da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
(UTFPR).

Data de aprovação: 08/novembro/2022

---

Luis Alberto Chavez Ayala  
Mestrado em Tecnologia de Alimentos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

César Augusto Canciam  
Doutorado em Engenharia Química  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Luciano Moro Tozetto  
Mestrado em Engenharia de Produção  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**PONTA GROSSA**

**2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Me. Luis Alberto Chavez Ayala, por sempre ser prestativo, amigável e solícito, agradeço a oportunidade de desenvolvimento e ensinamentos na trajetória de pesquisa e desenvolvimento, sem ele os objetivos deste trabalho não seriam alcançados.

Aos meus pais Ruth e Elias por serem meus companheiros de vida e suporte para que eu trilhe um bom caminho e realize meus objetivos, agradeço pelo incentivo e esforço em todos os momentos de minha vida, vocês são minha inspiração.

A instituição Universidade Tecnológica Federal do Paraná por me proporcionar a oportunidade de realizar a pesquisa.

A Profa. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues pela contribuição, incentivo e opinião que me foram de grande valia.

A Profa. Dra. Alessandra Cristine Novak Sydney e A Profa. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto, agradeço pelas orientações e incentivos.

Ao Prof. Dr. César Augusto Canciam e Me. Luciano Moro Tozetto por aceitarem meu convite e contribuir com a banca, obrigada por estarem presentes.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se quisermos que tudo continue como está,  
é preciso que tudo mude”  
(Giuseppe Tomasi di Lampedusa, 1963)

## RESUMO

O glúten é o nome dado ao conjunto de centenas de proteínas de reserva encontrado no endosperma das sementes de cereais como o trigo, o centeio e a cevada. É uma proteína de difícil digestão comparada com as proteínas de outros grãos, e sua presença no trato digestivo pode inflamar a mucosa intestinal. A hidrólise do glúten em farinha de trigo pode ser aplicada na panificação para obtenção de maior extensibilidade e elasticidade da massa, mantendo seu valor nutricional. Os alimentos sem glúten disponíveis no mercado, em sua maioria, têm custo mais elevado, e são feitos com farinhas de baixo valor nutricional, contêm menos proteínas, fibras, vitaminas e ferro. Sendo a papaína e a bromelina enzimas proteases de origem vegetal, a papaína obtida do látex dos frutos do mamoeiro e a bromelina extraída do fruto abacaxi, as mesmas atuam a hidrólise das proteínas da farinha de trigo (glúten), modificando a rede proteica pela quebra das ligações peptídicas do glúten, a ação dessas enzimas depende da concentração e do tempo de reação no meio, com temperatura e pH propício a cada ação enzimática, o produto final pode ser utilizado em processos de fabricação de alimentos. Os resultados foram obtidos de acordo com a literatura consultada, com métodos simples de quantificação, visando reduzir a quantidade final de glúten. A enzima bromelina se mostrou mais rápida no tempo de hidrólise e de mais fácil controle em sua inativação, em relação a papaína se obteve uma hidrólise mais controlada e linear.

Palavras chave: glúten; papaína; bromelina; trigo.

## **ABSTRACT**

Gluten is the name given to the set of hundreds of storage proteins found in the endosperm of cereal seeds such as wheat, rye and barley. It is a protein that is difficult to digest compared to proteins in other grains, and its presence in the digestive tract can inflame the intestinal mucosa. The hydrolysis of gluten in wheat flour can be applied in baking to obtain greater extensibility and elasticity of the dough, maintaining its nutritional value. Gluten-free foods available on the market, in their majority, have a higher cost, and are made with low nutritional value flours, containing less protein, fiber, vitamins and iron. Papain and bromelain are protease enzymes of vegetable origin. Papain obtained from latex of papaya fruits and bromelain extracted from pineapple fruit act in the hydrolysis of wheat flour proteins (gluten), modifying the protein network by breaking down of gluten peptide bonds. The action of these enzymes depends on the concentration and reaction time in the medium, with temperature and pH favorable to each enzymatic action and the final product can be used in food manufacturing processes. The results were obtained according to the consulted literature, with simple quantification methods, aiming to reduce the final amount of gluten. The bromelain enzyme proved to be faster in the hydrolysis time and easier to control in its inactivation, compared to papain, a more controlled and linear hydrolysis was obtained.

Keywords: gluten; papain; bromelain; wheat.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 - O grão de trigo e sua constituição. ....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2 - Estrutura da enzima papaína.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3 - Fluxograma do processo de obtenção dos teores de glúten.....</b>	<b>30</b>
<b>Fotografia 1 – Etapas de processamento da massa .....</b>	<b>29</b>
<b>Gráfico 1 - Quantidade de massa de glúten restante ao longo do tempo para a enzima papaína.....</b>	<b>33</b>
<b>Gráfico 2-Quantidade de massa de glúten restante ao longo do tempo para a enzima bromelina .....</b>	<b>35</b>
<b>Gráfico 3 - Controle entre as enzimas de acordo com a massa de glúten restante ao longo do tempo após inativação enzimática .....</b>	<b>39</b>
<b>Gráfico 4 - Controle de hidrólise após inativação ao longo do tempo para a papaína.....</b>	<b>40</b>
<b>Gráfico 5 - Controle de hidrólise após inativação ao longo do tempo para a bromelina com o uso de ácido láctico .....</b>	<b>40</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1- Porcentagem de glúten úmido e seco nas amostras de controle .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 2 - Condições de temperatura, tempo e massa de glúten obtida para enzima papaína.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 3- Teor de glúten úmido obtido para atividade da enzima papaína.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 4 - Condições de temperatura, tempo e massa de glúten obtida para enzima bromelina .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 5 - Teor de glúten úmido obtido para atividade da enzima bromelina ...</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 6 - Potencial hidrogeniônico das soluções ao longo do processo .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 7- Tabela de massa de glúten restante após inativação enzimática a temperatura média de 18 °C .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 8- Comparativo de massa de glúten a temperatura média de 18 °C para a papaína, antes e depois da inativação enzimática .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 10 - Comparativo de massa de glúten a temperatura média de 18 °C para a bromelina, antes e depois da inativação enzimática .....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS/HIV	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AT	Alergia ao trigo
DC	Doença celíaca
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
KDA	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeos
PPM	Partes Por Milhão
SGNC	Sensibilidade ao trigo não celíaca

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Farinha de Trigo no Brasil .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Trigo e Glúten .....</b>	<b>17</b>
4.2.1 Gliadinas e Gluteninas .....	18
4.2.2 Legislação .....	19
<b>4.3 Enzimas.....</b>	<b>20</b>
<b>4.4 Proteases .....</b>	<b>21</b>
4.4.1 Papaína .....	21
4.4.2 Bromelina .....	22
<b>4.5 Quantificação de Glúten .....</b>	<b>23</b>
<b>4.6 Formação da Rede de Glúten .....</b>	<b>24</b>
<b>4.7 Inativação enzimática.....</b>	<b>25</b>
4.7.1 Inibidores enzimáticos .....	25
4.7.2 Ácido lático .....	25
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Matéria-prima.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2 Equipamentos.....</b>	<b>26</b>
5.2.1 Vidrarias .....	26
5.2.2 Equipamentos eletrônicos de medição.....	26
<b>5.3 Preparo das Amostras .....</b>	<b>26</b>
5.3.1 Amostras de controle .....	26
5.3.2 Testes de ajuste .....	27
5.3.3 Atividade enzimática .....	28
5.3.4 Ativação do glúten e amassamento .....	28
5.3.5 Atividades desenvolvidas .....	29
<b>5.4 Inativação Enzimática .....</b>	<b>30</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6.1 Resultados das Análises de Ajuste .....</b>	<b>31</b>

<b>6.2 Amostras de controle e metodologia .....</b>	<b>31</b>
6.2.1 Ensaio enzima papaína .....	32
6.2.2 Ensaio enzima bromelina .....	35
6.2.3 Inibição enzimática .....	38
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o homem tem buscado alimentos benéficos à saúde, garantindo assim a sua sobrevivência como espécie, a necessidade de nutrição e os avanços da ciência e da tecnologia têm facilitado os meios de melhor satisfazer essa necessidade (SUAS, 2012).

As reações alimentares podem ocorrer por três razões: alergia, intolerância ou sensibilidade, pesquisas investigam a incompatibilidade entre nosso DNA e o mundo ao nosso redor como o principal fator causador de problemas inflamatórios crônicos de saúde. Cerca de 99% de nossos genes foram formados antes do desenvolvimento da agricultura, aproximadamente 10.000 anos atrás, e a partir dessa incompatibilidade, estamos vendo reações alimentares como nunca vimos antes na história da humanidade (COLE; ADAMSON, 2021).

Glúten é o nome dado ao conjunto de proteínas de reserva encontrado no endosperma das sementes de cereais como o trigo, o centeio e a cevada, o trigo está na lista dos alimentos mais alergênicos, a alergia ao trigo (AT) tem prevalência estimada em menos de 0,5% da população em geral. Sendo o glúten um gatilho de um conjunto heterogêneo de patologias, incluindo a Doença celíaca, e a sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC), combinadas afetam cerca de 10% da população em geral. Ao observar as proteínas presentes no glúten podemos dividir em duas frações principais, de acordo com sua solubilidade em álcool, as gliadinas (solúveis) e as gluteninas (insolúveis) (YONAMINE; PINOTTI, 2020).

O glúten é difícil de digerir em comparação com as proteínas de outros grãos, portanto, sua presença no trato digestivo pode inflamar a mucosa intestinal, contribuindo para a síndrome do intestino permeável. Quando isso acontece, proteínas alimentares não digeridas, como glúten e endotoxinas bacterianas chamadas lipopolissacarídeos (LPS), podem passar para a corrente sanguínea, criando uma reação inflamatória fora do trato gastrointestinal, podendo desencadear uma resposta autoimune (COLE; ADAMSON, 2021).

Assim o sistema imunológico, que governa a inflamação, pode reagir exageradamente e atacar os órgãos, tecidos ou estruturas do corpo, ocasionando autoimunidade, que pode afetar todos os sistemas do corpo, especialmente o sistema digestivo como ocorre na doença celíaca ou na doença inflamatória intestinal (COLE; ADAMSON, 2021).

A doença celíaca (DC) é caracterizada como distúrbio sistêmico autoimune desencadeado pelas prolaminas presentes no trigo, na cevada, centeio e na aveia, o tratamento desta doença baseia-se na dieta restrita de trigo, centeio e cevada. Já a SGNC é uma forma de intolerância ao glúten com sintomas intestinais e extra intestinais que surgem logo após a ingestão de glúten e desaparecem após sua retirada, é uma patologia de natureza não alérgica e não autoimune que ocorre em indivíduos nos quais os diagnósticos de DC e AT foram descartados (YONAMINE; PINOTTI, 2020).

A dieta isenta de trigo para pessoas que possuem essas necessidades especiais na alimentação representa uma tarefa difícil, dada a diversidade de produtos que contêm trigo em sua composição, a falta de conhecimento sobre como substituí-lo nas receitas e também o elevado custo dos produtos prontos para o consumo. Os alimentos sem glúten disponíveis no mercado, em sua maioria, têm custo relativamente mais elevado, são feitos com farinhas não enriquecidas (principalmente de arroz), elas contêm menos proteínas, fibras, vitaminas e ferro, além de apresentarem maior índice glicêmico, maior teor de sódio, açúcares e gorduras quando comparados aos produtos convencionais (YONAMINE; PINOTTI, 2020).

Para que um produto possa ser comercializado como um alimento isento de glúten, este alimento deve obedecer aos limites estabelecidos pela Comissão do Codex Alimentarius, que diz que o limite que um celíaco pode ingerir de glúten é de 20 ppm para produtos naturalmente sem glúten e de 200 ppm para produtos derivados de ingredientes não fonte de glúten (BARBOSA; ABREU; ZENEBON, 2007, apud SALOMÃO, 2012, p.13).

Certas proteases podem ser aplicadas no controle da força do glúten, garantindo menor tempo de trabalho da massa na produção de pães e redução do teor de glúten para produção de bolos e biscoitos (MACEDO; MATOS, 2015, p.56). Esses preparados enzimáticos também podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, pacientes portadores de HIV/AIDS e na nutrição de esportistas, bem como em dietas para controle de peso (Frokjaer, 1994, apud CARREIRA *et al.* 2011, p.481).

As farinhas de trigo para uso industrial são classificadas de acordo com seu conteúdo de proteína, que pode variar entre 5 e 20%, essa variação se deve a fatores genéticos, ambientais e de manejo (KOBBLITZ, 2019).

As enzimas de origem vegetal, como a papaína (mamão) e a bromelina (abacaxi), nome atribuído a duas cisteína-proteases semelhantes extraídas do fruto

do abacaxizeiro (*Ananas comosus*), e do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*), entre as quais as mais importantes são a papaína e a quimopapaína. Essas proteases modificam a rede proteica pela quebra das ligações peptídicas, a extensão da quebra depende do tipo de protease utilizada, da sua concentração e do tempo de reação, a utilização de protease, nos processos de panificação fornece produtos mais macios, de menor densidade e de aparência agradável (KOBELITZ, 2019).

Na elaboração de pães e outros derivados do trigo, utiliza-se a papaína quando a hidrólise do glúten é desejada para obtenção de maior extensibilidade e maior elasticidade da massa, e para potencializar a atividade da maltose favorecendo o trabalho mecânico (POULTER e CAYGILL, 1985; FAO, 1990; FENNEMA, 1992, apud LIVERA, 2000, p.2). Segundo (KOBELITZ, 2019) a hidrólise do glúten de farinhas com alto teor de proteína dá origem a produtos com maior valor nutricional em comparação com o uso de farinhas de baixo conteúdo proteico, do ponto de vista nutricional, a hidrólise de proteínas favorece sua digestão e absorção pelo organismo.

Os hidrolisados de glúten podem substituir sólidos do leite em vários produtos de panificação, em massas para pão, acentuam o aroma e melhoram as características do miolo (MACEDO; MATOS, 2015)

A demanda de mercado por produtos sem glúten torna-se uma necessidade na prevenção e ocorrência de desordens bioquímicas nos consumidores minimizando a prevalência de doenças. De modo que tentativas de formulações são realizadas, a fim de produzir produtos isentos de glúten com propriedades tecnológicas comparáveis aos alimentos com glúten (NAQASH, 2017 apud NUNES, 2020).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Reduzir a formação do glúten em mistura de farinha e água, pela hidrólise enzimática utilizando papaína e bromelina.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analisar as melhores condições para a atividade enzimática para a papaína e bromelina em solução aquosa com a farinha de trigo;
- Analisar de forma quantitativa a quebra e diminuição de glúten nas amostras, através de análises gravimétricas;
- Comparar os resultados obtidos entre a papaína e a bromelina na diminuição da presença da proteína do glúten;



### 3. JUSTIFICATIVA

O glúten está presente constantemente em nossa rotina alimentar e possui grande aplicação na indústria de alimentos, porém com a maior conscientização e preocupação com a alimentação saudável e para sanar as necessidades na dieta de pessoas com restrições alimentares com a proteína do trigo, a indústria de alimentos livres de glúten vem crescendo a cada dia.

Ao observar o alto custo e pouca diversidade de produtos sem glúten, devido a necessidade do uso de farinhas e aditivos específicos para a fabricação de produtos livres de glúten, a possibilidade de utilização da farinha de trigo sob ação de enzimas proteolíticas para fazer a quebra da proteína do glúten, tornaria o processo mais viável. Sendo a farinha de trigo uma matéria prima usualmente utilizada nos processos de fabricação de alimentos e o seu menor valor comercial comparado a outras farinhas sem glúten. As enzimas escolhidas para fazer parte processo foram de baixo valor comercial, e fácil aquisição, com o objetivo de redução de custos no processo de produção, e por fim houve a comparação de qual o melhor desempenho enzimático na redução da proteína do glúten através de uma metodologia de aplicação simples e de fácil execução.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Farinha de Trigo no Brasil

Para Costa *et al.*, (2008) o trigo possui importante papel no aspecto econômico e nutricional da alimentação, sendo amplamente usado pela indústria. A cultura do trigo é predominante no inverno, o trigo é mais cultivado na região sul do Brasil, principalmente nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, embora também seja cultivado em São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul.

No Brasil de 1970 a 1984 a produção nacional atingiu aproximadamente dois milhões de toneladas. No período de 1986 até 1989, houve um aumento da área cultivada e da produção, atingindo quase a autossuficiência de produção de trigo nacional. Porém na década de 1990 houve o fim do amparo estatal e conseqüentemente a redução na produção, em 1994 a Argentina tornou-se um dos principais exportadores de trigo para o mercado brasileiro (COLLE, 1998).

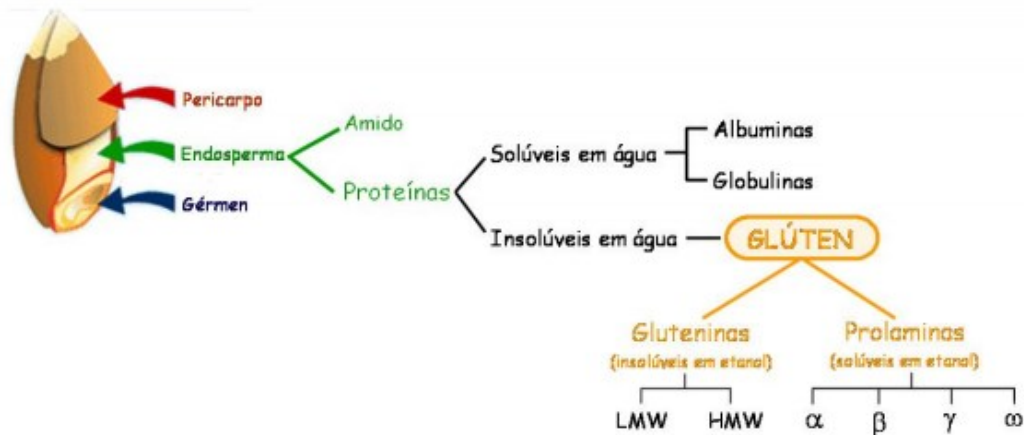
A maior parte dos grãos de trigo utilizados no Brasil tem a finalidade de uso em farinhas, e possuem procedência argentina, canadense e americana, sendo associado ao trigo nacional em proporções diversas (COSTA, 2008).

### 4.2 Trigo e Glúten

A fração proteica do trigo, que gera o glúten, é formada por dois constituintes, a glutenina sendo uma proteína fibrilar, capaz de se dispor na forma de rede, e a gliadina, proteína globular que interage com a glutenina. Essas proteínas dão à farinha a propriedade de formar uma massa visco elástica com capacidade de reter o ar, e a força do glúten é obtida da concentração dessas proteínas e da sua composição (KOBBLITZ, 2019).

Estas proteínas presentes no grão de trigo estão classificadas em dois grupos: as prolaminas (gliadina, solúveis em etanol) e as gluteninas (insolúveis em etanol) como podemos visualizar na figura 1. A proporção entre as prolaminas e gluteninas no glúten é aproximadamente a mesma, sendo estimado o teor de prolaminas no glúten cerca de 50% (PITÉ, 2007).

Figura 1 - O grão de trigo e sua constituição.



Fonte: Pitè (2007)

Na panificação a rede do glúten forma ligações do tipo pontes de dissulfeto, e quanto maior o número dessas ligações, mais difícil será trabalhar a massa. A quantidade de proteína na farinha e a proporção de seus constituintes determinam as características de extensibilidade e elasticidade da massa e do produto final. Uma massa com pouco glúten será pegajosa e grudenta, produzindo um pão duro com pouco crescimento, como acontece com algumas massas sem glúten. E uma massa de bolo com muito glúten gerará um produto pouco macio, incapaz de se expandir pela ação do gás produzido pelo fermento químico (KOBELITZ, 2019). De modo geral as farinhas do tipo I possuem teor de proteína de no mínimo 7,5% (BRASIL, 2005).

#### 4.2.1 Gliadinas e Gluteninas

Para Araújo *et al.*, (2010) o glúten é constituído por frações de gliadina e de glutenina, que é a parte insolúvel em água da farinha de trigo, totalizam 85% da fração proteica. O trigo é o único cereal que apresenta gliadina e glutenina em quantidade adequada para formar o glúten. No entanto, essas proteínas podem ainda estar presentes em outros cereais, como cevada, centeio e aveia, nas formas, respectivamente, de hordeína, secalina e avenina.

A gliadina é responsável pelo aumento de volume do pão e também por sua redução, ou seja, sua extensibilidade, as soluções concentradas de gliadina têm por característica a alta viscosidade e a baixa elasticidade. Diferentemente da gliadina, a glutenina, se hidratada, possuindo características elásticas semelhantes a um tipo de borracha e tem baixa viscosidade, ambas as proteínas, quando em contato com

alguma fonte de hidratação somada à ação mecânica, desenvolvem uma rede entrelaçada proteica conhecida como rede de glúten (SILVA, 2021).

A Comissão do Codex Alimentarius diz que um alimento é totalmente isento de glúten quando o conteúdo total de prolaminas (gliadinas) presentes no trigo, aveia, centeio e na cevada não ultrapassam 1mg/100g em base seca. Sabe-se que a fração mais tóxica do glúten é a gliadina (CAPERUTO, 1999, apud SALOMÃO, 2012, p.13).

O termo prolaminas se refere a composição em aminoácidos, e o elevado teor em prolina e glutamina. As prolaminas são também designadas por  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ - prolaminas de acordo com a sua mobilidade em eletroforese a valores de pH baixo e de acordo com a sua sequência de aminoácidos (PITÉ, 2007).

#### 4.2.2 Legislação

No Brasil não existe uma lei que determina os limites adequados de gluten nos alimentos, utiliza-se então as orientações descritas internacionalmente do Codex Alimentarius que estabelece a quantidade máxima de glúten em um alimento considerado livre de glúten (NUNES, 2020).

A Comissão do Codex Alimentarius recomenda, um teor máximo de 20 ppm (20 mg/kg) para os alimentos naturalmente sem glúten, e 100 ppm para os alimentos que contêm trigo, cevada, centeio e/ou aveia e aos quais foi retirado o glúten com o objetivo de cumprir as necessidades dietéticas dos doentes celíacos (PITÉ, 2007).

Segundo (QUINTANA, 2011 apud SALOMÃO, 2012, p.21). Existem duas Leis Federais que dizem a respeito da rotulagem de alimentos com ou sem glúten, são elas a Lei 8543/1992 e a 10.674/2003.

A Lei 8543 de 1992 estabelece:

Art. 1º Todos os alimentos industrializados que contenham glúten, como trigo, aveia, cevada, malte e centeio e/ou seus derivados, deverão conter, obrigatoriamente, advertência indicando essa composição.

§ 2º A advertência deve ser impressa nos rótulos e embalagens dos produtos industrializados em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura.

Já a Lei 10.674 de 2003 determina a obrigação dos rótulos, bulas e em materiais de publicidade escrever: "Contêm Glúten" ou "Não Contêm Glúten", estabelecendo:

Art. 1º Todos os alimentos industrializados deverão conter em seu rótulo e bula, obrigatoriamente, as inscrições "contêm Glúten" ou "não contém Glúten", conforme o caso.

§ 1º A advertência deve ser impressa nos rótulos e embalagens dos

produtos respectivos assim como em cartazes e materiais de divulgação em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura.

§ 2º As indústrias alimentícias ligadas ao setor terão o prazo de um ano, a contar da publicação desta Lei, para tomar as medidas necessárias ao seu cumprimento.

### 4.3 Enzimas

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos, acelerando a velocidade das reações se clivando moléculas ou se unindo com a finalidade de formar novos compostos, sem sofrer qualquer alteração ao final do processo, são constituídas por diversos aminoácidos, ligados entre si por ligação peptídica e são encontradas em todos os seres vivos, tais como leveduras, fungos, bactérias, células e organelas citoplasmáticas (SAGRILLO *et al.*, 2018).

A fonte vegetal possui enzimas intracelulares, e é de mais fácil manipulação, uma vez que a maceração de folhas e frutos é de simples execução (VITOLLO; FILHO, 2017).

Segundo Motta, (2011) vários fatores podem modificar a atividade catalítica de uma enzima, como temperatura, concentração do íon hidrogênio (pH), concentração da enzima e inibidores. E Sagrillo *et al.* (2018) ressalva que as enzimas atuam em diversos processos biológicos em condições suaves de temperatura e pH, para que não haja a perda de sua capacidade catalítica, ou seja, geralmente a elevação da temperatura aumenta a velocidade de uma reação enzimática, pois aumenta a agitação das moléculas, favorecendo o choque entre elas. Porém, essa condição deve ser controlada, porque, caso contrário, a agitação vai se tornando tão intensa com o aumento da temperatura que as ligações que estabilizavam a estrutura da enzima (ligações de hidrogênio, ligação covalente) se rompem e ocorre a desnaturação da proteína.

Se uma enzima sofrer desnaturação ou for dissociada, se separando em subunidades, geralmente a atividade catalítica é perdida. As reações catalisadas por enzimas acontecem em um bolsão da enzima, denominado sítio ativo, a molécula que se liga no sítio ativo e sobre a qual a enzima age é chamada substrato (NELSON; COX; 2019).

As enzimas são sensíveis a variações bruscas de pH, podendo haver alteração estrutural da enzima devido à repulsão de cargas. Cada enzima possui um pH ótimo para desempenhar sua função. (SAGRILLO *et al.*, 2018). Temperaturas mais

altas podem levar à perda da estrutura nativa da enzima, por alterar as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional e se rompidas as ligações de hidrogênio, se desencadeia alterações estruturais, levando a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida, assim desnaturando a enzima (ALTERTHUM, 2020).

O composto com o qual a enzima opera e a reação é acelerada, chama-se substrato, que usualmente se liga à superfície da enzima enquanto reage, essa parte específica da enzima durante a reação é chamada de sítio ativo (BETTELHEIM *et al.*, 2016).

#### 4.4 Proteases

De acordo com Koblitz (2019) as proteases têm principal função biológica a hidrólise de proteínas e estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e no transporte de proteínas através de membranas. Para Sagrillo *et al.*, (2018), a indústria de alimentos é uma das que mais se beneficia com o uso de enzimas para sua produção industrial, são as proteases melhorando a cor e o sabor do pão.

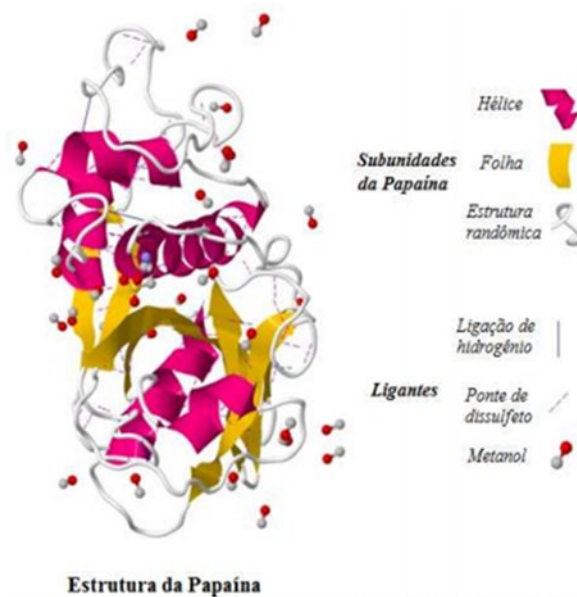
Em panificação, a presença de proteases auxilia na hidrólise do glúten, reduzindo a necessidade de trabalho mecânico da massa. As proteases vegetais como a papaína e a bromelina são bastante empregadas na indústria de alimentos por serem consideradas seguras para o consumo humano e podendo assim serem empregadas no preparo de diversos alimentos. A atividade dessas proteases é maior nos vegetais verdes, se comparado com as mesmas espécies em estado mais avançado de maturação. A papaína, a bromelina estão entre as mais importantes cisteína-proteases e representam cerca de 5% do mercado mundial de proteases (KOBBLITZ, 2019).

##### 4.4.1 Papaína

A papaína é uma protease obtida do látex do mamão (*Carica papaya*) caracterizada na figura 2, e classificada como cisteína-protease com atividade ótima a 65 °C, pH entre 5 e 7 e temperatura de desnaturação entre 80 e 90 °C. Possui massa molecular de 23,4 kDa e maior atividade em proteínas miofibrilares (PAYNE, 2009,

apud ROBERTO, *et al.* 2020 p.189). Esta enzima possui uma alta estabilidade em baixas temperaturas, não apresentando perdas significativas de atividade, podendo ser armazenada a 4 °C por meses, porém ela é pH dependente, perdendo a estabilidade em condições ácidas (LIMA *et. al.*, 2001).

**Figura 2 - Estrutura da enzima papaína.**



**Fonte: Varca (2014)**

Em função de sua aplicação industrial, estabilidade e facilidade de extração, em alimentos derivados do trigo o uso da papaína é utilizado no controle da qualidade da farinha, para obter o produto desejado, interferindo nas propriedades reológicas do glúten polímero formado, as principais mudanças se manifestam sobre a viscoelasticidade, capacidade de retenção de gases e propriedades térmicas (HAMER, 1995, apud LIVEIRA, 2000).

#### 4.4.2 Bromelina

O termo bromelina é o nome coletivo para enzimas proteolíticas (proteases), essas enzimas são encontradas em tecidos de talos, frutos e folhas de plantas da família *Bromeliaceae*, sendo o abacaxi o mais conhecido (VITOLLO; FILHO; 2017). O abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro, mesmo com diminuição de sua atividade proteolítica na maturação,

já no mamão, a papaína é encontrada em níveis elevados apenas no fruto verde, sua concentração de protease desaparece com o seu amadurecimento (SILVA, 2012).

A enzima bromelina vem sendo amplamente caracterizada na literatura, classifica-se como enzima proteolítica da classe das hidrolases, capazes de romper a ligação peptídica das proteínas e peptídeos. A especificidade das proteases é ampla e classificada de acordo com a constituição de seu sítio ativo em três grupos principais: serina protease, ácido aspártico protease e cisteína protease, sendo que a bromelina se enquadra neste último grupo (SANTOS, 1995).

O uso da atividade proteolítica da bromelina está relacionado com a produção de fármacos e a sua utilização na indústria alimentícia, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágenos hidrolisados, nas indústrias têxteis, para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes (FRANCA-SANTOS *et al.*, 2009).

Para Silva (2021), a utilização desta proteína para as diversas aplicações biotecnológicas depende da estabilidade das enzimas nos sistemas, sendo necessário um estudo que defina as condições que não propiciem a desnaturação enzimática. A bromelina é uma cisteína-protease (20 a 33,2 kDa) com atividade máxima a 65 °C, pH entre 5 e 9 e a temperatura de desnaturação está entre 70°C e 75 °C, ela possui maior atividade proteolítica sobre as fibras do colágeno (PAYNE, 2009, apud ROBERTO, *et al.* 2020 p.189). A bromelina é menos termoestável que a papaína, perdendo rapidamente sua atividade em temperaturas superiores a 70°C (KOBLOITZ, 2019).

#### **4.5 Quantificação de Glúten**

Nos métodos para a análise de glúten encontra-se diferentes problemas, tais como natureza heterogênea dos alimentos, composição variável do glúten e dificuldade de quantificar produtos processados aquecidos ou se o glúten estiver parcialmente hidrolisado, e ainda pode haver reação cruzada com outras prolaminas do arroz ou milho (BICUDO, 2010).

A quantificação do glúten em alimentos era inicialmente feita através de métodos colorimétricos (método do Biureto e de Lowry) ou com base na determinação de azoto total (método de Kjeldhal), com o tempo foram desenvolvidos métodos mais



sofisticados (PITÉ, 2007). Os métodos mais modernos para determinar as gliadinas contidas no glúten podem ser, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometria de massa (Western Blotting), reação em cadeia de polimerase (PCR), (SILVA, 2010 apud SALOMÃO, 2012).

No método eletroforese e Western Blotting, as proteínas são transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana tipicamente de nitrocelulose, onde se usa como sonda anticorpos específicos para a proteína, sendo bastante sensível para a detecção e tipificação das proteínas do glúten por comparação com marcadores de massa molecular existentes para o trigo, centeio, cevada e aveia, a detecção e visualização tanto das várias frações de prolaminas como de prolaminas hidrolisadas (PITÉ, 2007).

O método ELISA pode ser empregado na triagem das prolaminas hidrolisadas da cevada e do trigo, além de possuir uma sensibilidade de 1,5 ppm de gliadina para alimentos livre de glúten (BARBOSA; ABREU; ZENEON, 2007, apud SALOMÃO, 2012).

O emprego do método de PCR pode ser utilizado na detecção do DNA do trigo para confirmar a análise de alimentos onde o método de ELISA não for conclusivo. A espectrometria de massa é utilizada para triagem, enquanto a cromatografia líquida de alta resolução é altamente específica, uma vez que as prolaminas dos cereais são conhecidas, porém esse método tem sensibilidade e especificidade mais baixa do que os imunológicos (ELISA), possuem custo mais elevado, maior tempo e apresentam resultados não confiáveis quando o alimento foi processado ou aquecido (BICUDO, 2010).

Embora existam diversos métodos para detecção de glúten, alguns são de alto custo e exigem materiais e equipamentos específicos. Neste caso, o método quantitativo utilizado foi através da obtenção da massa de glúten, com a medição e quantificação direta da parte de interesse do estudo, sendo um método simples e de fácil execução.

#### **4.6 Formação da Rede de Glúten**

O glúten pode ser definido como uma massa emborrachada que permanece quando a massa de trigo é lavada, a lavagem remove os grânulos de amido que são

solúveis em água. O sólido seco contém em torno de 75-85% de proteína e 5-10% de lipídios (WIESIR, 2007).

Quando a farinha de trigo é misturada com água e sofre homogeneização mecânica, ocorre a hidratação das proteínas gliadina e glutenina presentes na farinha de trigo, dessa forma cria-se uma rede de proteína contínua e visco elástica, as moléculas se ligam através de pontes de hidrogênio, ligação de van der waals e pontes dissulfeto. (GOESAERT *et al.*, 2005 citado por VALCARCEL YAMANI).

Para Ribeiro (2009), quando o trabalho mecânico começa a ser feito para formar o glúten, as proteínas insolúveis da farinha de trigo agem no meio, sendo a glutenina sendo responsável pela extensibilidade, pois apresenta cadeias ramificadas, e a gliadina é responsável pela consistência e viscosidade da massa, por apresentar cadeia molecular mais simples e apresentando pouca resistência a extensão.

## **4.7 Inativação enzimática**

### 4.7.1 Inibidores enzimáticos

Segundo Motta (2011), os inibidores enzimáticos são as substâncias que diminuem a velocidade da reação de enzimas, sendo classificada como irreversível e reversível, segundo a estabilidade da ligação entre o inibidor e a molécula de enzima, sendo qualquer molécula que se ligue à cadeia polipeptídica de uma enzima, diminuindo a velocidade da reação.

A estrutura do sítio ativo da enzima pode ser afetada por qualquer agente capaz de provocar mudanças na conformação da proteína, dependendo assim das características do meio, como pH e temperatura. A velocidade da reação enzimática diminui à medida que o pH se afasta do valor ideal de cada enzima (MARZZOCO; TORRES; 2018).

### 4.7.2 Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico inodoro, têm um sabor suave e é não volátil, utilizado nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxteis e cosméticas, apresentando propriedades umectante, emulsificante, adjuvante de sabor, atua como agente inibidor de deterioração bacteriana, conservante e redutor de pH (DATTA *et al.*, 1995).

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Matéria-prima**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de panificação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, as amostras foram preparadas com farinha de trigo do tipo I.

As enzimas bromelina e papaína foram utilizadas em forma de pó. A enzima papaína foi adquirida na sua forma pura, em comércio de reagentes químicos pela internet. A enzima bromelina foi adquirida em comércio local, derivada do caule do abacaxi com atividade de 2.500 GDU/g. O ácido láctico 80%, grau alimentício foi adquirido de loja de insumos cervejeiros pela internet.

### **5.2 Equipamentos**

#### **5.2.1 Vidrarias**

Nos experimentos foram utilizados béckers de 250 mL e vidrarias auxiliares como bastão de vidro, espátula e peneiras.

#### **5.2.2 Equipamentos eletrônicos de medição**

As medidas de temperatura foram realizadas por termômetro digital, nas medidas de peso foram utilizadas as balanças analíticas do laboratório de físico química e laboratório de panificação, para medidas de pH utilizou-se o dispositivo pHmetro de bancada calibrado com solução tampão, a estufa e refrigerador utilizados do laboratório de panificação.

### **5.3 Preparo das Amostras**

#### **5.3.1 Amostras de controle**

Baseado nos métodos 38-10 e 38-12A da AACC (2013) citada por (Embrapa, 2009) foram utilizados para obter teores quantitativo e qualitativo de glúten da farinha de trigo, a massa foi preparada misturando-se manualmente uma mistura de farinha

e água que após sovada, formou uma rede de glúten. A massa foi lavada sob uma corrente de água para remover o amido, as partes solúveis em água foram retiradas, e a quantidade de glúten, que não é solúvel em água foi expressa como uma porcentagem do material da amostra original e representou o teor de glúten úmido da amostra, esse volume foi então submetido a um processo de secagem para determinar o teor de glúten seco.

Segundo Embrapa (2009) o percentual de glúten nas amostras de controle foi calculado utilizando as equações (1) e (2):

$$\text{Glúten \% úmido} = 100 \times \frac{\text{peso glúten úmido}}{\text{peso inicial da amostra}} \quad (1)$$

$$\text{Glúten \% seco} = 100 \times \frac{\text{peso glúten seco}}{\text{peso inicial da amostra}} \quad (2)$$

As amostras de controle foram preparadas com a farinha de trigo diluída em meio aquoso na mesma proporção das demais amostras (20 % de água para 50 g de farinha), com a finalidade de quantificação da porção de glúten a ser obtida sem a ação enzimática, o controle foi realizado em todos os experimentos para comparação dos resultados.

### 5.3.2 Testes de ajuste

Os testes preliminares foram realizados como parâmetro para identificar a quantidade de glúten obtida em cada condição de temperatura, concentração e tempo, baseados nos métodos 38-10 e 38-12A da AACC (2013), as amostras inicialmente foram mantidas em estufa por 1 h, 2 h e 4 h, esses ensaios foram utilizados como ajuste para determinar a concentração de cada enzima ideal a ser utilizada nas amostras, foram testadas concentrações da enzima papaína e bromelina a 1% e 0,1% em estufa com temperatura de aproximadamente 40°C, por 2 horas e 4 horas, os mesmos testes foram realizados a temperatura ambiente. Os tempos de agitação, amassamento, sova e secagem foram padronizados para todas as amostras.

### 5.3.3 Atividade enzimática

Para o preparo das amostras, cada grupo recebeu a proporção de água na mistura em relação a farinha de trigo de 20 %, obtendo assim melhor atuação enzimática, de modo que a massa não ficasse muito líquida ou seca para a realização dos ensaios.

A adição das enzimas papaína e bromelina tiveram a finalidade de redução na quantidade de glúten na massa, após a realização dos testes de ajuste a proporções das enzimas foram fixadas em 0,05 gramas ou 0,1 % em relação a quantidade de 50 gramas de farinha de trigo, a fim de se obter um tempo hábil para medição do glúten no meio em um intervalo de tempo condizente a um processo de panificação, os procedimentos foram repetidos para as enzimas papaína e bromelina de forma separada, após os testes de ajuste notou-se que a bromelina agia de forma muito mais rápida na hidrólise da massa do que a papaína, então os tempos para ação enzimática foram ajustados de acordo com a quantidade obtida de glúten ao fim do amassamento.

As retiradas para quantificação do glúten foram ajustadas com uma diferença de 10 em 10 minutos entre as amostras para a enzima papaína, e de 1 em 1 minuto para enzima bromelina, as retiradas das amostras para amassamento foram feitas até o tempo em que as mesmas não apresentassem mais quantidade possível de quantificação pelo método realizado.

### 5.3.4 Ativação do glúten e amassamento

Após o fim do tratamento enzimático houve a sova da massa das amostras até o ponto de véu, onde a massa pode ser finamente esticada sem se romper, ponto perfeito para o desenvolvimento adequado do glúten, as sovas da massa têm a finalidade de ativação do glúten, formando assim a rede de glúten, para que assim fosse possível sua análise e quantificação. O tempo médio empregado nessa etapa foi de 5 minutos e posterior lavagem de 10 minutos em água corrente.

### 5.3.5 Atividades desenvolvidas

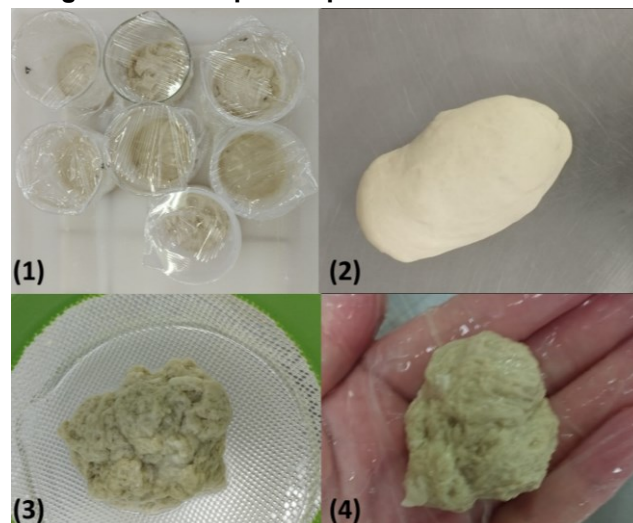
O processo de preparação das amostras (figura 4), como objetivo de se obter a quantificação do glúten após a ação proteolítica das enzimas papaína e bromelina foi realizado pelas seguintes etapas, como pode ser visualizado na figura 3:

Etapa 1: foram adicionados em béqueres 20 mL de água e adicionados 0,05 gramas de enzima, agitou-se a mistura com bastão de vidro até a completa homogeneização, acrescentou-se 50 gramas de farinha de trigo e houve novamente a agitação com bastão de vidro até a completa homogeneização, por aproximadamente 2 minutos até a obtenção da massa, depois de homogeneizadas as amostras foram cobertas com papel filme, com a finalidade de não perderem umidade durante o processo.

Etapa 2: após o tempo de espera para ação enzimática de cada amostra, iniciou-se individualmente o processo de amassamento para ativação da rede de glúten, por um tempo de 5 minutos, repetidos igualmente para todas as amostras.

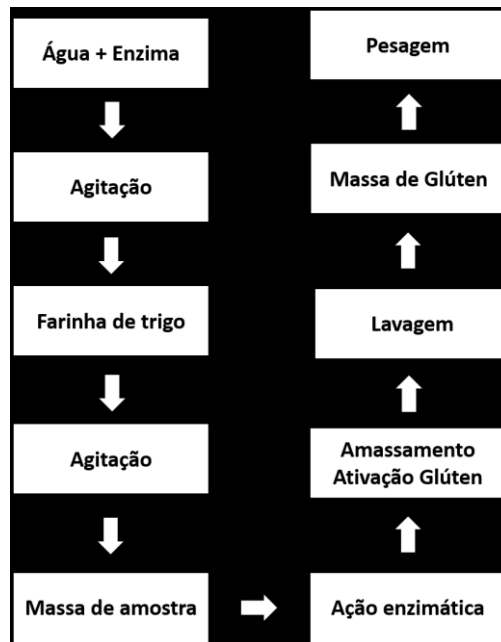
Etapa 3 e 4: imediatamente a massa obtida foi levada para a lavagem com vigoroso amassamento, pelo tempo aproximado de 10 minutos, ao fim da lavagem foi conferido que a água não apresentava resquícios ou coloração de farinha ao fim do processo, obtendo assim apenas a massa de glúten restante na amostra, essa massa de glúten foi deixada em peneira para escorrer o excesso de líquido por mais 5 minutos, para posterior pesagem da massa de glúten úmida.

**Fotografia 1 – Etapas de processamento da massa**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 3 - Fluxograma do processo de obtenção dos teores de glúten**



Fonte: Autoria própria (2022)

#### 5.4 Inativação Enzimática

Para simular as condições de um processo de panificação, na etapa de crescimento da massa as temperaturas não podem ser muito elevadas, para evitar o cozimento da massa antes do tempo, considerando também que a enzima papaína é estável a baixas temperaturas, a escolha da inativação enzimática foi por via ácida. Dentre os ácidos possíveis a serem utilizados nesse processo, foram selecionados os que poderiam ser utilizados no processo de panificação, sem modificar o sabor final do produto, por isso o ácido láctico foi empregado nos ensaios.

O processo de inativação das enzimas papaína e bromelina ocorreram de forma isolada dos demais ensaios, para analisar o comportamento da atividade enzimática após a adição do ácido láctico. As amostras foram preparadas com as mesmas proporções dos demais ensaios com a diferença da adição do ácido láctico dissolvido em solução aquosa no momento anterior de se realizar o amassamento da amostra para posterior ativação e lavagem do glúten.

Após o preparo da amostra e dado o tempo de espera de 10 minutos, tempo padrão fixado para todas as amostras realizadas para papaína, e de 1 minuto para enzima bromelina, após esse tempo de espera inicial, adicionou-se as amostras 5 ml

de água com 5 gotas de ácido láctico ao meio, iniciando imediatamente o processo de homogeneização por 2 minutos com bastão de vidro, após esse procedimento a amostra foi coberta com papel filme e deixada em repouso até atingir o tempo excedente para iniciar o processo de amassamento e lavagem para obtenção da massa de glúten. As medidas de pH foram feitas durante o processo para cada enzima utilizada.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Resultados das Análises de Ajuste

Os ensaios de ajuste foram feitos em triplicata, com o uso da enzima papaína e bromelina a 1% e 0,1% com temperatura de 40°C em estufa, por 2 horas e 4 horas, todas as amostras não demonstraram vestígios de glúten na última etapa do processo de amassamento e lavagem. Proporções maiores das enzimas foram testadas, porém resultou em tempos mais rápidos de hidrólise, dificultando a formação do glúten da massa e sova da massa, e prejudicou a quantificação final do glúten após lavagem.

### 6.2 Amostras de controle e metodologia

Segundo Ribeiro (2009) as farinhas com teores de glúten úmido que se encontram entre 24 e 36% e teores de glúten seco entre 7,5 e 14%, são recomendadas para uso em panificação. Após as análises realizadas, com os resultados obtidos pela tabela 1, constatou-se que os valores das amostras de controle estão de acordo com o parâmetro da literatura.

**Tabela 1- Porcentagem de glúten úmido e seco nas amostras de controle**  
Amostra de controle

Massa de Glúten	peso úmido (g)	% úmido	peso seco (g)	% seco
	19	27,12	8,22	11,73
	17	24,27	7,02	10,02
	23	32,83	9,07	12,95
Média	19,67	28,08	8,10	11,57
Desvio padrão	3,06	4,36	1,03	1,47

Fonte: Autoria própria (2022)



Na análise de glúten das amostras de controle, foram obtidos para glúten úmido um valor médio de 28,08 % e para teor de glúten seco um valor de 8,10 %, sendo resultados com proximidade aos encontrados por Ribeiro (2009), com média de 25,08% para glúten úmido e 8,18 % para glúten seco, após 36 horas de condicionamento em estudos semelhantes.

### 6.2.1 Ensaio enzima papaína

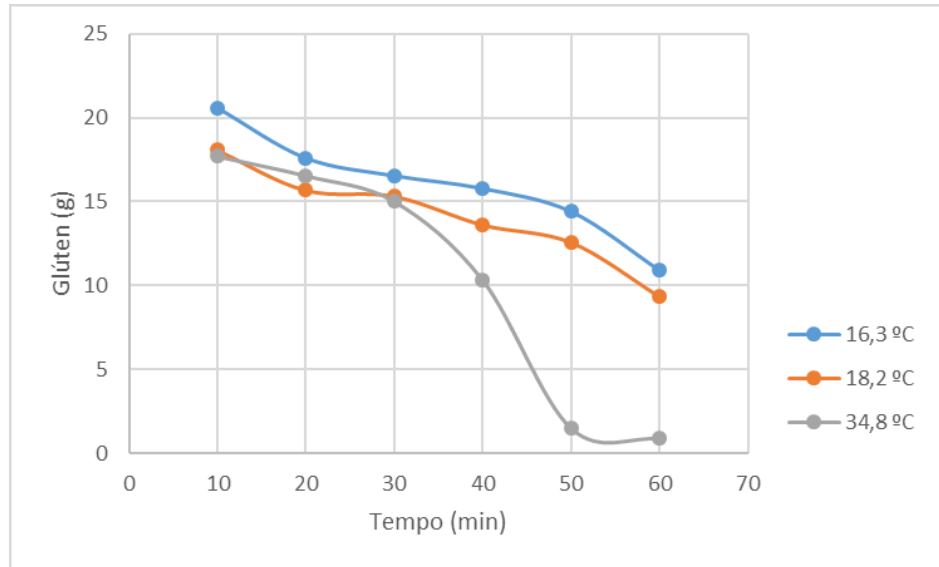
Para os ensaios da enzima papaína os resultados obtidos com um intervalo de 10 minutos entre as medições, a quantidade de massa de glúten restante nas amostras em diferentes temperaturas podem ser observadas na tabela 2:

**Tabela 2 - Condições de temperatura, tempo e massa de glúten obtida para enzima papaína**

Temperatura		16,3 °C	18,2 °C	34,8 °C
Ensaio	Tempo (min)	Massa de glúten (g)	Massa de glúten (g)	Massa de glúten (g)
1	10	20,6	18,07	17,69
2	20	17,61	15,68	16,54
3	30	16,55	15,32	15,01
4	40	15,79	13,62	10,33
5	50	14,41	12,57	1,51
6	60	10,91	9,34	0,89

**Fonte: Autoria própria (2022)**

A quantidade de glúten removida foi diminuindo com o tempo e com o aumento da temperatura, assim como observado na tabela 2, a comparação das curvas das quantidades de glúten obtidas conforme o aumento de temperatura foi observado pelo gráfico 1:

**Gráfico 1 - Quantidade de massa de glúten restante ao longo do tempo para a enzima papaína**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Os teores úmidos foram calculados para os ensaios da enzima papaína os dados obtidos para cada temperatura se encontram na tabela 3:

**Tabela 3- Teor de glúten úmido obtido para atividade da enzima papaína**

Temperatura	16,3 °C		18,2 °C		34,8 °C	
Tempo (min)	Glúten (g)	Glúten úmido (%)	Glúten (g)	Glúten úmido (%)	Glúten (g)	Glúten úmido (%)
10	20,6	29,41	18,07	25,80	17,69	25,25
20	17,61	25,14	15,68	22,38	16,54	23,61
30	16,55	23,63	15,32	21,87	15,01	21,43
40	15,79	22,54	13,62	19,44	10,33	14,75
50	14,41	20,57	12,57	17,94	1,51	2,16
60	10,91	15,57	9,34	13,33	0,89	1,27

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Os teores de glúten úmido finais nas amostras foram decrescentes ao longo do tempo, estando dentro do esperado para a reação enzimática, sendo observado uma maior atividade com a elevação da temperatura da reação.

### 6.2.2 Ensaio enzima bromelina

A atividade enzimática da bromelina foi medida em um espaço mais curto de tempo, de 1 em 1 minuto devido a sua rápida ação proteolítica na massa de amostra, os resultados obtidos foram observados na tabela 4:

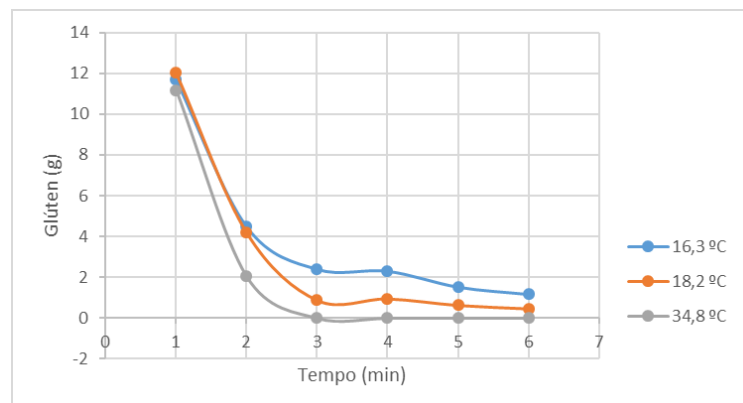
**Tabela 4 - Condições de temperatura, tempo e massa de glúten obtida para enzima bromelina**

Temperatura		16,3 °C	18,2 °C	34,8 °C
Ensaio	Tempo (min)	Massa de glúten (g)	Massa de glúten (g)	Massa de glúten (g)
1	1	11,69	12,03	11,18
2	2	4,5	4,2	2,05
3	3	2,41	0,88	0
4	4	2,32	0,95	0
5	5	1,54	0,63	0
6	6	1,18	0,46	0

Fonte: Autoria própria (2022)

Após a obtenção da massa de glúten restante nas amostras foi possível analisar a partir dos dados da tabela 4, o comportamento do gráfico para a enzima bromelina referente ao gráfico 2:

**Gráfico 2-Quantidade de massa de glúten restante ao longo do tempo para a enzima bromelina**



Fonte: Autoria própria (2022)

Os ensaios apresentaram alguns desvios na quantidade final do glúten nas amostras, a reação ocorreu de forma muito mais rápida que a enzima papaína, e os teores de glúten restantes nas amostras foram mais difíceis de quantificar, era perceptível uma massa mais líquida e com as redes de força de glúten fragilizadas, os resultados para a enzima bromelina com diferentes temperaturas empregadas nos ensaios foram de acordo com a tabela 5:

**Tabela 5 - Teor de glúten úmido obtido para atividade da enzima bromelina**

Temperatura		16,3 °C		18,2 °C		34,8 °C	
Ensaio	Tempo (min)	Massa de glúten (g)	Glúten úmido (%)	Massa de glúten (g)	Glúten úmido (%)	Massa de glúten (g)	Glúten úmido (%)
1	1	11,69	16,69	12,03	17,17	11,18	15,96
2	2	4,5	6,42	4,2	6,00	2,05	2,93
3	3	2,41	3,44	0,88	1,26	0	0
4	4	2,32	3,31	0,95	1,36	0	0
5	5	1,54	2,20	0,63	0,90	0	0
6	6	1,18	1,68	0,46	0,66	0	0

**Fonte: Autoria própria (2022)**

A enzima bromelina obteve uma redução de glúten mais rápida no uso da farinha de trigo que a papaína, apresentando pouca diferença de comportamento nas reações com temperaturas mais elevadas, chegando ao total da hidrólise do glúten nas amostras em um espaço curto de tempo em todos os ensaios realizados.

### 6.2.3 Inibição enzimática

A inativação enzimática foi realizada para analisar o comportamento das enzimas após o uso do ácido láctico, os resultados obtidos de acordo com a tabela 6, realizados com a temperatura de 18,5 °C foram:

**Tabela 6 - Potencial hidrogeniônico das soluções ao longo do processo**

Componente	pH	pH
	Bromelina	Papaína
Água destilada	5,52	5,52
Ácido láctico	0,47	0,47
Água+ Enzima	5,25	5,21
Massa	6,09	6,15
Massa + Ácido	2,79	2,21

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Com a adição do ácido láctico para inativação enzimática em tempo pré-determinado para cada enzima, e esperado o tempo de repouso de cada ensaio obtivemos os seguintes resultados da tabela 7:

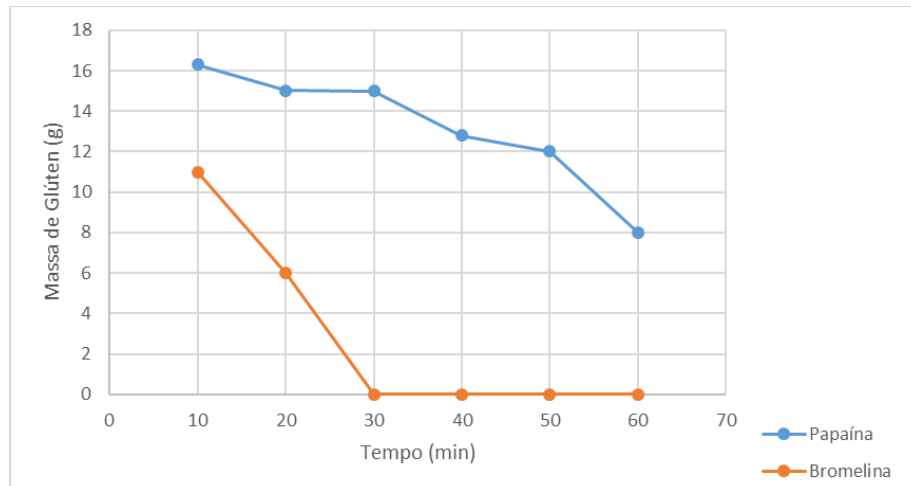
**Tabela 7- Tabela de massa de glúten restante após inativação enzimática a temperatura média de 18 °C**

Ensaio	Papaína		Bromelina	
	Tempo (min)	Massa de glúten (g)	Tempo (min)	Massa de glúten (g)
1	10	16,30	10	11
2	20	15,03	20	6
3	30	15	30	0
4	40	12,80	40	0
5	50	12	50	0
6	60	8	60	0

**Fonte: Autoria própria (2022)**

O comportamento das enzimas bromelina e papaína no decorrer do tempo após a adição de ácido seguiram os padrões do gráfico 3:

**Gráfico 3 - Controle entre as enzimas de acordo com a massa de glúten restante ao longo do tempo após inativação enzimática**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

Em todos os ensaios de inativação enzimática foi notada uma atividade enzimática remanescente após um período de tempo, a diminuição na velocidade da reação enzimática foi constatada em todos os ensaios. Comparando os resultados obtidos anteriormente na faixa de temperatura aproximada de 18 °C para as enzimas papaína (tabela 8) e bromelina (tabela 9), e após a ação enzimática, para analisar se houve essa diminuição de velocidade na reação enzimática:

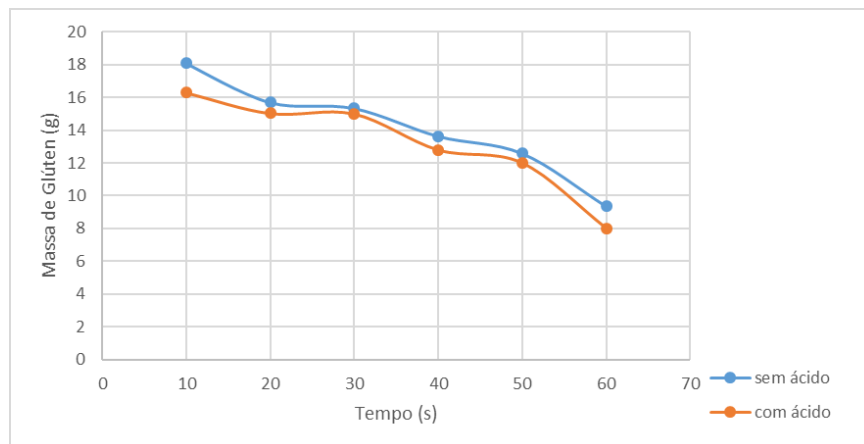
**Tabela 8- Comparativo de massa de glúten a temperatura média de 18 °C para a papaína, antes e depois da inativação enzimática**

Ensaio Papaína	Tempo (min)	Massa de glúten (g)	Inativação
			Massa de glúten (g)
1	10	18,07	16,30
2	20	15,68	15,03
3	30	15,32	15
4	40	13,62	12,80
5	50	12,57	12
6	60	9,34	8

**Fonte: Autoria própria (2022)**



**Gráfico 4 - Controle de hidrólise após inativação ao longo do tempo para a papaína**



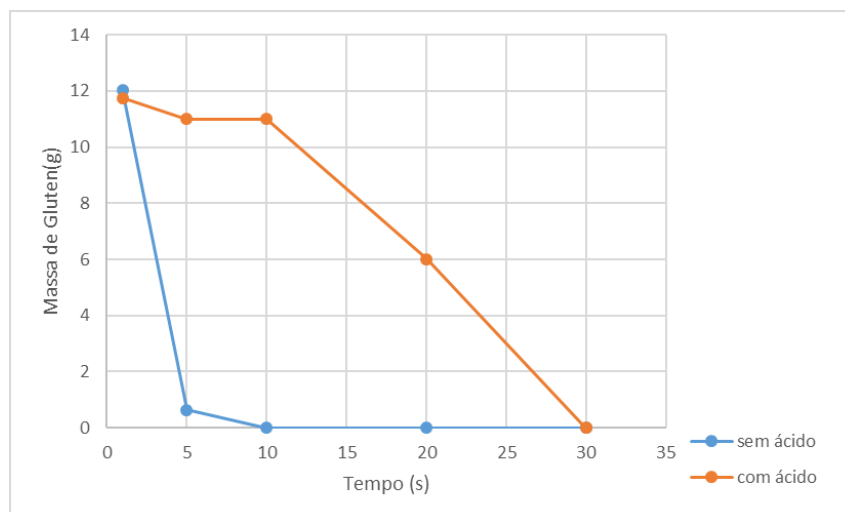
Fonte: Autoria própria (2022)

**Tabela 9 - Comparativo de massa de glúten a temperatura média de 18 °C para a bromelina, antes e depois da inativação enzimática**

Ensaio Bromelina	Tempo (min)	Massa de glúten (g)/ 18,2 °C	Inativação
			Massa de glúten (g)
1	1	12,03	11,74
2	5	0,63	11
3	10	0	11
4	20	0	6
5	30	0	0

Fonte: Autoria própria (2022)

**Gráfico 5 - Controle de hidrólise após inativação ao longo do tempo para a bromelina com o uso de ácido láctico**



Fonte: Autoria própria (2022)

Após analisar os gráficos 4 e 5, podemos concluir que a papaína não obteve melhoras em seu comportamento de inativação enzimática, após a adição do ácido láctico, mesmo com o pH final da mistura em torno de 2,21. Para os ensaios da enzima bromelina o comportamento da reação foi nitidamente mais lento e controlado, mesmo ainda existindo ação enzimática após a adição do ácido láctico nas amostras, o tempo da reação basicamente triplicou após a inibição ácida.

A semelhança entre as curvas com e sem a inativação enzimática foi notada para a enzima papaína, podemos concluir que a enzima papaína é mais estável a reduções de pH que a enzima bromelina, sendo necessário para barrar a atuação da enzima papaína maiores concentrações de ácido, ou que outro método de inativação enzimática seja empregado. Entretanto para a enzima bromelina o uso do ácido láctico nas amostras resultou em uma curva de quantificação de glúten com comportamentos totalmente distintos, ficando claro que o uso do ácido láctico retardou a velocidade da ação da bromelina e houve um ganho de tempo significativo até a total hidrólise do glúten nas amostras.

## 7. CONCLUSÃO

As amostras de controle obtiveram percentual condizente com a literatura, ao que classifica as farinhas de tipo I, os teores de glúten seco e úmido foram satisfatórios e dentro do padrão para o método empregado.

Nos ensaios realizados pela enzima papaína foi possível observar um aumento na velocidade da ação enzimática com o emprego de maior temperatura em estufa, havendo redução significativa de glúten no meio comparado com o mesmo período de tempo dos ensaios feitos em temperatura ambiente.

Para os ensaios realizados com a enzima bromelina observou-se um comportamento de enfraquecimento da rede de glúten muito mais rapidamente que nos ensaios da enzima papaína. Após analisar os teores finais de glúten em diferentes temperaturas para a enzima bromelina podemos concluir que não houve uma mudança muito significativa na ação da enzima com o aumento de temperatura em estufa, demonstrando um comportamento mais termoestável que a papaína.

Na inativação enzimática, as medições de pH da enzima papaína se demonstraram levemente mais ácidas em todas as etapas do ensaio que a enzima bromelina, após todas as análises, é inegável que a enzima bromelina se mostrou mais eficiente que a enzima papaína em um espaço curto de tempo para a redução dos níveis de glúten nas amostras, empregando uma ação extremamente rápida sobre a proteína vegetal da farinha de trigo. Porém a enzima papaína mostrou características promissoras se o objetivo for apenas a redução de teores de glúten no meio, com uma reação de hidrólise do glúten controlada mais facilmente que a bromelina.

Pode-se levar em conta que o produto final para uso em processos de fabricação alimentícia terá menores teores de glúten e conseqüentemente serão necessários mais estudos do seu comportamento para uso como matéria prima nos processos de panificação e demais produtos da indústria alimentícia.

## REFERÊNCIAS

AACC (American Association of Cereal Chemists). **Approved methods**: 38-10; 38-12A. Washington, 2013. Disponível em: <https://www.cerealsgrains.org/resources/methods/Pages/default.aspx>. Acesso em 02 out. 2022.

ALTERTHUM, F. **Biotecnologia industrial**: Fundamentos. 2.ed. São Paulo: Blucher, 2020.

ARAÚJO, H. M. C.; ARAÚJO, W. M. C.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P. Doença Celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. v.23, n.3, p. 467-474, 2010. Disponível em: <https://www.Revista de Nutrição,scielo.br/j/rn/a/CWKQ7fDBKfF7g88gRvy4jMG/?lang=pt>. Acesso em: 03 ago. 2021.

BETTELHEIM, F. A.; BROWN, W. H.; CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S. O. **Introdução à Bioquímica**: Tradução da 9ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2016.

BICUDO, M. O. P. **Avaliação da presença de glúten em produtos pacificados para celíacos – estudo de caso**. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.8, de 2 de junho de 2005**. Aprova o regulamento técnico para identidade e qualidade da farinha de trigo. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005. Disponível em: [https://sistemasweb.agricultura.gov.br/conjurnormas/index.php/INSTRU%C3%87%C3%83O\\_NORMATIVA\\_N%C2%BA\\_8,\\_DE\\_2\\_DE\\_JUNHO\\_DE\\_2005](https://sistemasweb.agricultura.gov.br/conjurnormas/index.php/INSTRU%C3%87%C3%83O_NORMATIVA_N%C2%BA_8,_DE_2_DE_JUNHO_DE_2005). Acesso em 02 out. 2022.

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; LIMA, L. G.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. Perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 481–489, 2011. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/10754>. Acesso em: 29 jul. 2021.

COLE, W.; ADAMSON, E. **O espectro da inflamação**. Rio de Janeiro: Alta Books, 2021.

COLLE, C. A. **A cadeia produtiva do trigo no Brasil**: contribuição para a geração de emprego e renda. Porto Alegre/RS: IEPE/UFRGS, 1998.

COSTA, M. G. da; *et al.* **Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados**. **Food Science and Technology**. 2008, v. 28, n. p. 220-225. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100031>. Acesso em 16 out. 2022.

DATTA R, Tsai SP, BONSIGNORE P, MOON SH, FRANK JR. **Technologic and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Reviews.** **16**, 221-231, 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/16/2-3/221/504306>. Acesso em: 11 out. 2022.

EMBRAPA, **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS.** Organização e Método. Passo Fundo, 2009. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do112\\_5.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do112_5.htm). Acesso em: 02 out. 2022.

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES; R. P. M. **Estudos bioquímicos da enzima bromelina do Ananas comosus (abacaxi).** Revista Scientia Plena. Aracajú, v. 5, n. 11, p. 1-6, 2009.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica dos Alimentos - Teoria e Aplicações Práticas**, 2ª edição. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2019.

LAMPEDUSA. T. di. **O Leopardo**, São Paulo: Editora Difel, 3ª. Edição, 1963.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL: processos fermentativos e enzimáticos.** Edgard Blücher, vol. 3. 2002. São Paulo/SP.

LIVERA, A. V. S. **Uso de papaína bruta de mamão verde (Carica papaya L.) integral como amaciante de carne.** 2000. 85 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/45354>. Acesso em: 26 jul. 2021.

MACEDO, P.D.G.; MATOS, S.P.D. **Bioquímica dos Alimentos: Composição, Reações e Práticas de Conservação.** 1ª edição. São Paulo: Érica, 2015.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica.** 4ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 392 p.

MOTTA, V. **Bioquímica**, 2ª edição. Rio de Janeiro: MedBook, 2011. 488p.

NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NOGUEIRA, T. A. **Estudo do efeito do gel de papaína como agente cicatrizante em lesões cutâneas de camundongos diabéticos.** Niterói, 2016. 116f. Tese (Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) - Universidade Federal Fluminense, 2016. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/handle/1/6056/THA%C3%84SA%20AMORIM%20NOGUEIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 jul. 2021.

NUNES, G. M. **Massas alimentícias sem glúten de farinhas formuladas à base de arroz e feijão;** 2020, 122 f. Dissertação (Pós-Graduação Tecnologia dos Alimentos), São Cristóvão, SE.

PITÉ, M. R. **Validação de um método alternativo de análise de glúten em géneros alimentícios, o ELISA-R5: comparação com o atual método oficial de análise.** 2007, 100 f. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007. Disponível em:

[https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/245/1/3671\\_TESE\\_Marina\\_Pite.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/245/1/3671_TESE_Marina_Pite.pdf). Acesso em: 3 ago. 2021.

RIBEIRO, M. N. **Influência do tempo de condicionamento do trigo na qualidade tecnológica da farinha.** p.45. 2009. 79 p. UFCE Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2009. Disponível em: <https://silo.tips/download/influencia-do-tempo-de-condicionamento-do-trigo-na-qualidade-tecnologica-da-fari>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ROBERTO, C. D.; CARVALHO R. V.; CRUZ, P. L.; FLORES, R. V.; PANNO, P. H. C. **Proteases extraídas de fontes vegetais aplicadas no amaciamento da carne.** Tópicos especiais em ciência e tecnologia de alimentos. Vitória, v. 1, p. 180-193, Editora Edufes, 2020.

ROSS, A.C.; CABALLERO, B.; COUSINS, R.J.; TUCKER, K.L.; ZIEGLER, T.R. **Nutrição Moderna de Shils na Saúde e na Doença.** Barueri (SP): Editora Manole, 2016.

SAGRILLO, F. S.; DIAS, F.R. F.; TOLENTINO, N.M.D. C. **Processos Produtivos em Biotecnologia.** Pinheiros (SP): Editora Saraiva, 2018.

SALOMÃO, R. P. **Determinação Qualitativa e Quantitativa de Glúten em Farinha de Trigo, Aveia e Arroz /** Ruth Pereira Salomão. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2012. Disponível em: <https://cepein.femanet.com.br/BDigital/arqTccs/0811290220.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2021.

SANTOS, S.A. **Efeito do tempo na composição físico-química. Química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro Ananas comosus (L.) merr. cv. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração.** Lavras: ESAL, (1995) 47p. (Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos).

SILVA, J. L. M. D. **Panificação: da moagem do grão ao pão assado.** Barueri (SP): Editora Manole, 2021.

SUAS, M. **Panificação e Viennoiserie - Abordagem profissional.** São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2012.

VALCARCEL Y., B. **Substituição parcial de farinha de trigo por farinha de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.), quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) e maca (*Lepidium meyenii* W.) na elaboração de panetone.** 2015. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-14122015->

170439/publico/Beatriz\_Valcarcel\_Yamani\_DO\_corrigida.pdf. Acesso em: 2 ago. 2021.

VARCA, G. H. C. **Desenvolvimento de hidrogel nanoestruturado contendo complexo de papaína e ciclodextrina**. 2014. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-30062017-114133/publico/2014VarcaDesenvolvimento.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2021.

VITOLO, M.; FILHO, J.A.R.: **Guia Para Aulas Práticas de Biotecnologia de Enzimas e Fermentação**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2017.

WIESIR, H. **Chemistry of gluten proteins**. *Food Microbiol.*, Illinois, v. 24, n. 2, p. 115-119, 2007. Disponível em: <https://aor.ca/wp-content/uploads/2021/12/Gluten-protein-chemistry-review-2007.pdf>. Acesso em: 15 out. 2022.

YONAMINE, G.H.; PINOTTI, R. **Alergia alimentar: alimentação, nutrição e terapia nutricional**. Barueri (SP): Editora Manole, 2020.